

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Kamilla Faria Maciel

**Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões
periapicais experimentais**

BELO HORIZONTE
2015

KAMILLA FARIA MACIEL

Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais experimentais

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

Co-orientadora: Profa. Dra. Leda Quercia Vieira

FACULDADE DE ODONTOLOGIA - UFMG

BELO HORIZONTE

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

M152p
2015
T

Maciel, Kamilla Faria
Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais
experimentais / Kamilla Faria Maciel. – 2015.

121f. : il.

Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho
Co-orientadora: Leda Quercia Vieira

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

1. Artrite reumatóide. 2. Doenças periapicais. 3. Citocinas.

I. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Vieira, Leda Quercia.
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Odontologia. IV. Título.

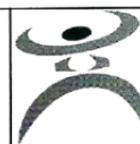
BLACK D047

Biblioteca da Faculdade de Odontologia - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais experimentais

KAMILLA FARIA MACIEL

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

Aprovada em 30 de setembro de 2015, pela banca constituída pelos membros:


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


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


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


Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza
Pontificia Universidade Católica


Prof(a). Evandro Neves Abdo
UFMG


Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar
UFMG

Belo Horizonte, 30 de setembro de 2015.



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA KAMILLA FARIA MACIEL

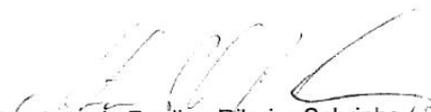
Realizou-se, no dia 30 de setembro de 2015, às 14:00 horas, Sala de defesa de tese - FO/UFMG (3403), da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada *Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais experimentais*, apresentada por KAMILLA FARIA MACIEL, número de registro 2011711945, graduada no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho - Orientador (UFMG), Prof(a). Leda Quercia Vieira (Universidade federal de minas gerais), Prof(a). Taia Maria Berto Rezende (Universidade Católica de Brasília), Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Pontifícia Universidade Católica), Prof(a). Evandro Neves Abdo (UFMG), Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar (UFMG).

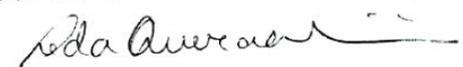
A Comissão considerou a tese:

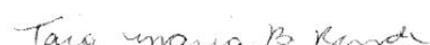
Aprovada

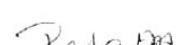
Reprovada

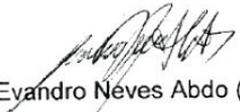
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 30 de setembro de 2015.


Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho (Doutor)


Prof(a). Leda Quercia Vieira (Doutora)


Prof(a). Taia Maria Berto Rezende (Doutora)


Prof(a). Paulo Eduardo Alencar de Souza (Doutor)


Prof(a). Evandro Neves Abdo (Doutor)


Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar (Doutora)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Cláudio e Rogéria, meus primeiros e eternos mestres, que sempre me apoiaram e incentivaram.

Ao meu marido, Stéfani, um grande companheiro e incentivador. Você foi fundamental nesta conquista. Nunca me esquecerei de seu apoio e amor!

À minha irmã, que sempre torceu por mim, pelo amor e cuidado.

À minha avó, Maria Aparecida – in memoriam - por cuidar de mim, mesmo que de outro plano.

À Delma, pelo suporte dado durante todo o percurso.

Aos meus amigos, pelo carinho e incentivo.

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

Amo vocês!!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus, por me permitir chegar até aqui.

Ao Professor Doutor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, pela sabedoria, incentivo, compreensão, inspiração, humanismo e orientação. Obrigada pela amizade e todo o aprendizado!

À Professora Doutora Leda Quercia Vieira, pelos conhecimentos, paciência e disponibilidade, em todas as etapas desta caminhada.

À Professora Doutora Taia Maria Berto Rezende, pelo exemplo de profissional, parceria, carinho e dedicação aos trabalhos.

À Professora Doutora Tarcília Aparecida da Silva, pelo aprendizado e disponibilidade.

Ao Ricardo Reis Oliveira, pela parceria, carinho, amizade e paciência.

À Luciana Carla Neves de Brito, pelo carinho, amizade, suporte, dedicação, trabalho e parceria.

À Mirna Souza, ao Bruno César Parpinelli e ao Celso Martins Queiroz Júnior, por todo o trabalho, parceria e amizade.

À Flávia Barbosa, Marcela Espaladori e Júlia Braga, amigas para a vida, que fizeram a caminhada mais suave e descontraída. Obrigada pelo carinho!

Meus sinceros agradecimentos.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia - LAGI, pela parceria nos trabalhos e paciência.

Aos colegas do Laboratório de Virologia, pelo carinho, compreensão e suporte.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios - MOA, que com tanta presteza e carinho foram fundamentais para esta conquista.

A todos os colegas do curso, por contribuírem para a minha formação, pela ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos Professores do doutorado, que tanto contribuíram para minha formação pessoal e profissional. Em especial ao Professor Dr. Luiz de Macêdo Farias e à Professora Dra. Paula Prazeres Magalhães, pelo suporte, aprendizado e carinho.

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

À agência de fomento FAPEMIG, pelo auxílio financeiro.

A todos que de alguma forma contribuíram para mais esta conquista! Todos foram muito importantes nesta caminhada!

Meus singelos e sinceros agradecimentos.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais experimentais

A infecção dos sistemas de canais radiculares levará à conseqüente indução de uma lesão periapical, estando muitos mediadores inflamatórios envolvidos nesse processo. A IL-17 tem demonstrado impacto no processo de remodelação óssea, especialmente em casos de artrite, apresentando-se em altos níveis. Contudo, pouco se sabe a respeito do seu real papel na patogênese das periapicopatias. Neste estudo, procurou-se avaliar o papel da IL-17A na reabsorção óssea perirradicular, em infecções endodônticas experimentais em camundongos C57BL/6 e IL-17RA KO, bem como o efeito dessa infecção na artrite reumatóide experimental. Para se induzir a infecção endodôntica, cepas padrão de *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Fusobacterium nucleatum* foram inoculadas nos canais radiculares do primeiro molar superior esquerdo desses animais. O modelo de artrite induzida por antígeno (AIA) foi desenvolvido em ambas as linhagens animais para posteriormente realizar-se a infecção endodôntica. Os animais foram sacrificados 14 e 21 dias após a infecção endodôntica, em ambos os casos. Foi realizada a análise histológica das articulações dos animais e da expressão gênica das citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, RANK, RANKL, TGF- β , IL-10 e IL-4, nos dentes e tecidos perirradiculares adjacentes à infecção, por meio do qPCR. O modelo de AIA crônica conseguiu ser estabelecido nos animais IL-17RA KO e C57BL/6, observando-se um escore de destruição articular maior nos animais selvagens. Quanto à expressão gênica das citocinas, níveis basais de TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10 e IL-17A, bem como TGF- β , IL-10 e IL-4 foram observados nos animais C57BL/6 e IL-17RA KO, respectivamente, no 14^o e 21^o dias. No 14^o dia, os animais C57BL/6 apresentaram uma diminuição da expressão de IL-6 e um aumento de IL-17A. No 21^o dia, a expressão gênica de IL-1 β e IL-17A estava aumentada, enquanto a expressão de IL-6, RANK, RANKL e IL-4 se encontrava diminuída. IL-17RA KO apresentaram aumento de RANK no 14^o dia e diminuição de IL-6 no 14^o e 21^o dias, onde observou-se aumento de TNF- α e IL-1 β e, uma diminuição de IFN- γ , IL-6, RANK e RANKL. Conclui-se que a IL-17 não é absolutamente necessária para a artrite autoimune e que a produção de outros mediadores pró-inflamatórios é suficiente para compensar a sua perda. A infecção endodôntica interfere nessa expressão, seja nos animais

IL17RA KO ou nos C57BL/6, mas de maneira IL-17 dependente, sugerindo uma possível regulação da IL-4 nestes últimos.

Palavras-chave: lesão periapical, artrite reumatóide, citocinas, qPCR

Financiamento: FAPEMIG

ABSTRACT

13

ABSTRACT

Role of IL-17 in the immunopathogenesis of experimental periapical lesions

The infection of the root canal system will lead to consequent induction of an apical periodontitis, with many inflammatory mediators involved in this process. IL-17 has been shown to impact bone remodeling process especially in cases of arthritis, presenting at high levels. However, little is known about its role in the pathogenesis of apical periodontitis. This study aimed to evaluate the role of IL-17A in periradicular bone resorption in experimental endodontic infections in C57BL/6 and IL-17RA KO mice and the effect of these experimental infection in rheumatoid arthritis. To induce endodontic infection, strains of *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* and *Fusobacterium nucleatum* were inoculated in the first upper left molar root canals of mice. The model of antigen-induced arthritis (AIA) was developed in both animal to further held endodontic infections. Animals were sacrificed 14 and 21 days after endodontic infection in both cases. Histological analysis was performed on the animals joints and gene expression of IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, RANK, RANKL, TGF- β , IL-10 and IL-4 of tooth and periapical lesions by qPCR. The AIA model could be established in IL-17RA KO and C57BL/6 mice, observing a greater joint destruction score in C57BL/6. Regarding the gene expression of cytokines, basal levels of TNF- α , IFN- γ , TGF- β , IL-10 and IL-17A as TGF- β , IL-10 and IL-4 were observed in C57BL/6 and IL-17RA KO mice, respectively, in 14 and 21 days. On the 14th day, C57BL/6 mice showed a decreased expression of IL-6 and IL-17A increased. At day 21, the expression of IL-17A and IL-1 β were increased, and IL-6, RANK, RANKL and IL-4 decreased. IL-17RA KO mice showed an increase of RANK on day 14 and IL-6 decreased in 14 and 21 days, where there was an increase of TNF- α and IL-1 β and a decrease of IFN- γ , IL-6, RANK and RANKL. We conclude that IL-17 is not absolutely necessary to autoimmune arthritis and the production of other pro-inflammatory mediators is sufficient to compensate its loss. The endodontic infection interfere in this expression, either in IL17RA KO and C57BL/6 mice in an IL-17 dependent manner, suggesting a possible regulation of IL-4 in these latter.

Keywords: apical periodontitis, rheumatoid arthritis, cytokines, qPCR

Funding: FAPEMIG

LISTAS (TABELAS, ILUSTRAÇÕES, ABREVIATURAS E SIGLAS)

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequência dos <i>primers</i>	49
---	-----------

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Delineamento: AR concomitante com lesão periapical	46
Figura 2: <i>Score</i> articular: C57BL/6 controle e C57BL/6 AIA não infectados e infectados em 14 e 21 dias	53
Figura 3: <i>Score</i> articular: IL-17RA KO AIA não infectados e infectados em 14 e 21 dias	53
Figura 4: <i>Score</i> articular: C57BL/6 controle, IL-17RA KO, C57BL/6 AIA e IL-17RA KO AIA infectados em 14 e 21 dias	54
Figura 5: Características histopatológicas das articulações de joelhos em camundongos C57BL/6, IL-17RA KO, C57BL/6 AIA e IL-17RA KO AIA com 14 dias após redesafio articular	55
Figura 6: Características histopatológicas das articulações de joelhos em camundongos C57BL/6, IL-17RA KO, C57BL/6 AIA e IL-17RA KO AIA com 21 dias após redesafio articular	56
Figura 7: Expressão do mRNA das citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, RANK, RANKL, TGF- β , IL-10 e IL-4 nos dentes e tecidos periapicais de camundongos C57BL/6 e IL-17RA KO com infecção endodôntica experimental, utilizando-se qPCR	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Th: Célula T auxiliar

CD4: Grupamento de diferenciação 4

Treg: Célula T regulatória

TNF: Fator de necrose tumoral

IFN: Interferon

IL: Interleucina

SCR: Sistema de canais radiculares

PMN: Polimorfonucleares

NK: Células matadoras naturais

RANK: Receptor ativador do fator nuclear kappa B

RANKL: Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B

TGF: Fator de crescimento transformador

MMP: Metaloproteinase de matriz

G-CSF: Fator estimulador de colônias de granulócitos

OPG: Osteoprotegerina

LPS: Lipopolissacarídeo

ROS: Espécies reativas de oxigênio

NO: Óxido nítrico

ICAM: Molécula de adesão intercelular

CCR5: Receptor de quimiocina C tipo 5

-/-: Nocaute

MHC: Complexo principal de histocompatibilidade

AR: Artrite reumatóide

ACPAs: Anticorpos protéicos anti-citrulinação

PAD: Peptidil arginina deaminase
AIA: Artrite induzida por antígeno
KO: Nocaute
BHI: Infusão de cérebro e coração
nm: Nanômetro
UFC: Unidade formadora de colônia
mL: Mililitro
mg: Miligrama
kg: Quilograma
µl: Microlitro
mBSA: Albumina bovina sérica metilada
PBS: Tampão fosfato-salino
CFA: Adjuvante Completo de Freund
IFA: Adjuvante Incompleto de Freund
EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético
HE: Hematoxilina-eosina
qPCR: Reação em cadeia da polimerase em tempo real
cDNA: DNA complementar
mRNA: RNA mensageiro
DNTPs: Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DTT: Dithiothreitol
DEPC: Dicarbonato de dietila
HPRT: Hypoxanthinephosphoribosyltransferase
Ct: *Threshold Cycle*
CIA: Artrite induzida por colágeno
PGIA: Artrite induzida por proteoglicanos

ROR γ t: *Retinoic acid receptor gamma t*

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. Introdução	25
2. Revisão de literatura	28
2.1 Resposta imune pulpar e periapical	28
2.2 Citocinas e alterações perirradiculares	30
2.3 Artrite reumatóide	37
3. Objetivos	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4. Materiais e métodos	44
4.1 Delineamento do estudo	44
4.2 Aspectos éticos	44
4.3 Microrganismos	44
4.4 Reativação e manutenção dos microrganismos	44
4.5 Padronização do inóculo microbiano	45
4.6 Animais	45
4.7 Infecção endodôntica experimental	45
4.8 Modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)	46
4.9 Avaliação da articulação	46
4.10 Avaliação da expressão de citocinas nas lesões perirradiculares	47
4.11 Extração e quantificação do RNA	47
4.12 Obtenção do cDNA	47

4.13	Reação em cadeia da polimerase em tempo real	48
4.14	Análise estatística	50
5.	Resultados	52
6.	Discussão	62
7.	Conclusão	68
8.	Perspectivas	70
9.	Referências	72
	Anexo A – Parecer do Comitê de ética	91
	Anexo B – Atividades desenvolvidas durante o curso de doutorado	92
	Artigos científicos	97

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O tecido pulpar é envolto pelos tecidos duros dentários que formam uma barreira física contra os agentes patogênicos. O rompimento da integridade desta barreira permite a entrada de elementos nocivos à polpa, que levam à sua inflamação, com conseqüente destruição tecidual e o desenvolvimento de lesões periapicais (Sundqvist, 1994; Jontell *et al.*, 1998; Balto *et al.*, 2002).

A interação entre os irritantes químicos, mecânicos, microbianos e a resposta de defesa do hospedeiro resulta na liberação de inúmeros mediadores, que são capazes de estimular respostas imunes na região periapical (Takahashi, 1998). Frente a uma agressão microbiana, a extensão da destruição tecidual dependerá da sua virulência, assim como da resistência dos tecidos do hospedeiro (Kettering & Torabinejad, 1995). Os elementos microbianos ativam várias formas de respostas imunes no hospedeiro, atuando como antígenos que estimulam a instalação de uma resposta local (Jontell *et al.*, 1998; Stashenko *et al.*, 1998; Balto *et al.*, 2002). Sabe-se que o desenvolvimento, bem como o controle de uma resposta imunológica, depende, em grande parte, da produção local de inúmeras citocinas que direcionam o tipo de resposta do hospedeiro (Dale *et al.*, 2001).

Em lesões periapicais, assim como em outras doenças inflamatórias, de acordo com o conceito de desenvolvimento das células T *helper* (Th) CD4⁺, existem pelo menos quatro subtipos diferentes de resposta Th: Th1, Th2, Th17 e Treg (Diveu *et al.*, 2008; McGeachy & Cua, 2008; Queiroz-Junior *et al.*, 2010; Garlet *et al.*, 2010a). A do tipo 1 (Th1) é caracterizada pela produção de TNF- α , IFN- γ , IL-2 e IL-1, evidenciando um perfil inflamatório e, a do tipo 2 (Th2), pela produção de IL-4, IL-5 e IL-13, revelando um perfil anti-inflamatório (Ribeiro-Sobrinho *et al.*, 2002; Čolíc *et al.*, 2009; Teixeira-Salum *et al.*, 2010). Estas respostas possuem regulação cruzada, sendo suas citocinas antagônicas (Mosmann & Coffman, 1989).

A recente caracterização das células Th17 como uma linhagem distinta das células CD4⁺ contribuiu para um melhor conhecimento sobre a resposta imune do hospedeiro, anteriormente baseada na dicotomia Th1/Th2. As células Th17 produzem as citocinas: IL-17, IL-21 e IL-22, estando relacionadas com a indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias (Čolíc *et al.*, 2009; Gugliani & Khader,

2010), sendo a IL-17 considerada uma ponte entre a resposta adaptativa e inata (Yu & Gaffen, 2008).

Evidências científicas demonstram que a IL-17 tem impacto na remodelação óssea, especialmente em casos de artrite (Nakae *et al.*, 2003; Gaffen, 2004; Yu *et al.*, 2007), sendo seu papel em doenças orais ainda pouco estudado. Na artrite, observam-se níveis elevados de IL-17 nos fluidos sinoviais dos pacientes, o que exerce efeito direto sobre as células ósseas. Em modelos murinos de artrite, ao se bloquear a IL-17A observa-se a redução da inflamação e da destruição óssea (Nakae *et al.*, 2003; Röhn *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2012). Por outro lado, sua sobre-expressão exacerba a doença (Yu *et al.*, 2007).

Relatos iniciais indicam que os níveis da IL-17 encontram-se elevados em casos de periodontite e lesões periapicais crônicas (Johnson *et al.*, 2004; Takahashi *et al.*, 2005; Vernal *et al.*, 2005; Čolíc *et al.*, 2007). Em 2009, Oseko e colaboradores sugeriram que a IL-17 estaria envolvida no processo de formação de lesões periapicais. Contudo, pouco se sabe a respeito do seu real papel na patogênese das periapicopatias.

Muitos estudos vêm sendo conduzidos procurando-se compreender a dinâmica dos mecanismos imunes que se processam no ápice radicular de dentes portadores de infecções (Stashenko *et al.*, 1998; Kawashima & Stashenko, 1999; Kawashima *et al.*, 2007; De Rossi *et al.*, 2008; Brito *et al.*, 2012; Tavares *et al.*, 2013; Ferreira *et al.*, 2015). Neste estudo, utilizando-se modelos animais, procurou-se avaliar o papel da IL-17A na reabsorção óssea, decorrente da resposta imune perirradicular em infecções endodônticas experimentais e, quando associadas a modelos de artrite induzida por antígeno

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Resposta imune pulpar e periapical

A contaminação bacteriana do tecido pulpar pode levar à sua destruição e consequente indução de uma lesão periapical (Sundqvist, 1994; Jontell *et al.*, 1998; Balto *et al.*, 2002). A resposta de defesa do hospedeiro contra os agentes irritantes oriundos do sistema de canais radiculares (SCR) infectados induz a liberação de muitos mediadores inflamatórios que, ao prevenir a invasão dos patógenos para os tecidos periradiculares, paradoxalmente, leva à destruição localizada do tecido do hospedeiro (Takahashi, 1998).

Frente a uma agressão microbiana, a extensão da destruição tecidual dependerá da virulência, assim como da resistência dos tecidos do hospedeiro. O nível de resposta pulpar aos irritantes microbianos varia de uma inflamação leve à necrose pulpar (Kettering & Torabinejad, 1995).

Muitos dos efeitos patogênicos microbianos sobre os tecidos periapicais operam de forma indireta, via estimulação de mediadores solúveis derivados do hospedeiro, como as citocinas (Silva *et al.*, 2007). Diversos estudos vêm sendo realizados para identificar os mediadores inflamatórios envolvidos na atividade de reabsorção óssea, permitindo melhor compreensão da etiopatogenia das lesões periapicais (Stashenko *et al.*, 1987; Kawashima *et al.*, 1999; Vernal *et al.*, 2006; Fukada *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2015; Bamberira *et al.*, 2015).

A resposta inflamatória periapical, em muitos aspectos recapitula a resposta inflamatória pulpar, exceto pela destruição óssea (Stashenko *et al.*, 1998). Estudos demonstram que semelhante ao que ocorre na polpa, nessa região irá instalar-se um infiltrado inflamatório constituído por linfócitos T e B, PMN, macrófagos, plasmócitos (Stern *et al.*, 1981; Tani-Ishii *et al.*, 1995; Kawashima *et al.*, 1996), células NK, eosinófilos e mastócitos (Artese *et al.*, 1991; Kawashima *et al.*, 1996). Além de outras células do tecido conjuntivo não inflamatório, tais como fibroblastos, células do endotélio vascular e do epitélio proliferativo, osteoblastos e os osteoclastos (Yu & Stashenko, 1987; Silva *et al.*, 2008). As células T têm um papel central na resposta imune celular (Takahashi, 1998). Kawashima e colaboradores (1996) sugeriram que

a progressão de lesões periapicais, com reabsorção óssea, requer a participação das células T *helper*.

O processo de remodelação óssea se desenvolve com base em dois processos antagônicos, mas acoplados: a formação e a reabsorção, podendo haver predomínio de um sobre o outro em casos onde ocorre alteração deste equilíbrio. Esse acoplamento é mantido em longo prazo por um complexo sistema de controle que inclui hormônios, fatores físicos e fatores humorais locais, permitindo a renovação e remodelação óssea. Esta atividade é consequência, em sua maior parte, da ação de dois tipos celulares principais, característicos do tecido ósseo: os osteoblastos e os osteoclastos (Vieira, 1999).

Em modelos animais de indução de periapicopatias, em especial nos camundongos, observou-se que inicialmente ocorre uma fase aguda, com indução de reabsorção óssea periapical, onde se observa um predomínio de citocinas pró-inflamatórias, seguida de uma fase crônica, com mudanças no perfil das citocinas ali liberadas (Stashenko *et al.*, 1987; Stashenko *et al.*, 1994; Dinarello, 1996).

Os avanços em engenharia genética e o desenvolvimento de camundongos imunodeficientes (nocautes) nos anos 90 contribuíram para o surgimento de novos conceitos e modelos de pesquisa em imunologia (Mak *et al.*, 2001). Tais avanços vêm contribuindo para o esclarecimento de muitas dúvidas relacionadas à patogênese das alterações perirradiculares, principalmente quanto à participação das respostas efetoras e sua modulação pelo sistema imune do hospedeiro. Dentre essas respostas destacam-se: os efeitos bacterianos sobre a imunidade não específica, prevenindo ou reduzindo a inflamação periapical (Marcato *et al.*, 2008); as respostas imunes específicas, prevenindo a disseminação de infecções endodônticas (Teles *et al.*, 1997; Hou *et al.*, 2000) e a regulação imune dos processos inflamatórios periapicais (Sasaki *et al.*, 2000).

Portanto, as lesões perirradiculares são consequência da presença microbiana no SCR infectados, estimulando uma rede de mecanismos imunológicos, que culminam com a instalação de células imunocompetentes nos tecidos circunjacentes e reabsorção óssea.

2.2 Citocinas e alterações perirradiculares

Citocinas são proteínas regulatórias que desempenham importante papel na modulação das respostas imunes, incluindo ativação, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose dos linfócitos, sendo secretadas por diferentes tipos celulares. As citocinas são mensagens intercelulares representando um mecanismo chave pelo qual as células envolvidas nas respostas imunológicas se comunicam (Seymour & Taylor, 2004; Burska *et al.*, 2014).

As citocinas são secretadas pelas células da imunidade inata e adaptativa, sendo muitas vezes pleiotrópicas e redundantes. O pleiotropismo refere-se à capacidade de agir sobre diferentes tipos celulares, permitindo mediar efeitos biológicos diversos. A redundância refere-se à propriedade de muitas delas produzirem os mesmos efeitos funcionais, compensando quando há supressão de um gene ou atividade antagonista contra uma única citocina (Abbas *et al.*, 2012).

A interação entre os irritantes químicos, mecânicos, microbianos e a resposta de defesa do hospedeiro resulta na liberação de inúmeros mediadores que, através do SCR, são capazes de estimular reações imunológicas na região periapical. Essas reações incluem respostas imunes mediadas por células, por meio das ações dos linfócitos T e das citocinas, assim como resposta imune humoral, mediada por anticorpos (Takahashi, 1998). As citocinas representam um papel de grande importância na resposta imuno-inflamatória, apresentando propriedades anti e pró-inflamatórias (Lang *et al.*, 2000).

O desenvolvimento, assim como o controle de uma resposta imunológica, depende, em grande parte, da produção local de inúmeras citocinas, as quais podem determinar o seu perfil (Dale *et al.*, 2001). Em 1998, Stashenko e colaboradores, diante de evidências da regulação pela rede de citocinas sobre a expressão e a ação de mediadores pró-inflamatórios e da reabsorção óssea, propuseram um modelo para a ação desta sobre a inflamação periapical. Nesse modelo, as citocinas sintetizadas pelo subgrupo Th1 estimulariam a produção de IL-1 e outras citocinas pró-inflamatórias que ativariam a reabsorção óssea perirradicular. Atualmente, sabe-se que a atividade de reabsorção óssea está também correlacionada à expressão do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e seu ligante, o RANKL, além da atividade das citocinas envolvidas na resposta Th1 (Vernal *et al.*, 2006; Fukada *et al.*, 2009) e Th17 (Oseko *et al.*, 2009).

Diversos estudos procuram identificar esses mediadores inflamatórios envolvidos no desenvolvimento das lesões perirradiculares, inclusive os relacionados à atividade de reabsorção óssea (Stashenko *et al.*, 1987; Kawashima & Stashenko, 1999; Vernal *et al.*, 2006; Fukada *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2015; Bambirra *et al.*, 2015).

A família da IL-17, pertencente à resposta Th17, consiste em citocinas que participam tanto da resposta inflamatória aguda quanto da crônica. Desde a identificação da IL-17A (também chamada IL-17 ou CTLA8) em 1993, cinco outros membros desta família – IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (também chamada IL-25) e IL-17F – foram reconhecidos baseado na homologia da sequência de seus aminoácidos (Rouvier *et al.*, 1993; Gu *et al.*, 2013). A citocina mais investigada desta família, a IL-17A, é uma citocina pró-inflamatória que possui papel essencial na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas e está implicada em várias condições inflamatórias, como doenças autoimunes, desordens metabólicas e câncer (Ouyang *et al.*, 2008, Gu *et al.*, 2013). Ela atua nas células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e células dendríticas, induzindo a produção de citocinas e quimiocinas. Além disso, é responsável pelo recrutamento de neutrófilos e granulopoiese (Yu *et al.*, 2007; Guglani & Khader, 2010). Sua produção em excesso leva ao dano tecidual (Ouyang *et al.*, 2008; Korn *et al.*, 2009, Gu *et al.*, 2013). As células TCD4⁺ sofrem diferenciação através de uma gama de citocinas que incluem IL-6, IL-1 β , IL-21, IL-23 e TGF- β . Tais citocinas podem levar à ativação do ROR γ t (Korn *et al.*, 2009, Gu *et al.*, 2013).

Embora produzida principalmente pelas células T, a IL-17 ativa muitos dos eventos sinalizados por citocinas da resposta imune inata, tais como: TNF- α e IL-1 β , sendo considerada uma molécula de ligação entre essa resposta e a resposta imune adaptativa (Yu *et al.*, 2007; Yu & Gaffen, 2008). A IL-17 também regula a expressão do fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) e IL-6 (Yu *et al.*, 2007).

Evidências científicas demonstram que a IL-17 tem importante papel em várias condições inflamatórias (Tesmer *et al.*, 2008; Gu *et al.*, 2013) e na remodelação óssea, especialmente em casos de artrite (Gaffen, 2004; Yu *et al.*, 2007; AlShwaimi *et al.*, 2013). Seus níveis se mostram elevados em fluidos sinoviais de pacientes com artrite reumatóide, exercendo efeito direto nas células ósseas. Bloqueando-se a IL-17 em modelos murinos de artrite, observou-se redução da inflamação e da

destruição óssea. Entretanto, a presença em excesso dessa citocina exacerba a doença (Yu *et al.*, 2007).

Estudos recentes demonstram a presença de células Th17 nas periodontites crônicas (Cardoso *et al.*, 2009) e relatam também que as citocinas do tipo Th17 são produzidas em lesões periapicais (Takahashi *et al.*, 2005; Vernal *et al.*, 2005; Ohyama *et al.*, 2009). Curiosamente, estudos experimentais em murinos demonstraram que camundongos deficientes para IL-17 podem apresentar aumento (Yu *et al.*, 2007; AlShwaimi *et al.*, 2013) ou diminuição das lesões ósseas (Oseko *et al.*, 2009) em resposta a patógenos periodontais.

Tem sido relatado que as células T estão envolvidas na destruição óssea via produção de IL-17, que por sua vez é descrita como uma indutora da produção de RANKL (Kotake *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2006). A capacidade das células Th17 produzirem IL-6 e regularem a produção de IL-1 β e TNF- α pode gerar um ciclo de amplificação da inflamação, com o consequente aumento da expressão de metaloproteinases (MMP) e RANKL (Beklen *et al.*, 2007).

O RANKL se expressa em níveis mais elevados nos ossos e tecidos linfóides, estimulando a diferenciação dos osteoclastos no tecido ósseo (Lacey *et al.*, 1998). O RANKL possui uma série de efeitos sobre as células imunes, incluindo a inibição da apoptose de células dendríticas (Wong *et al.*, 1997). Em condições homeostáticas, os níveis de RANKL e osteoprotegerina (OPG) precisam se equilibrar. Na presença de um estímulo inflamatório, a expressão de RANKL aumenta nos tecidos periodontais e periapicais, estimulando a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea patológica (Menezes *et al.*, 2008; Graves *et al.*, 2011).

A identificação do sistema OPG/RANKL/RANK como mediador final da osteoclastogênese, representa um grande avanço na biologia óssea. Ela pôs fim a uma longa pesquisa para o fator específico produzido por células pré-osteoblásticas e células do estroma, ambas necessárias e suficientes para o desenvolvimento dos osteoclastos. A diferenciação e a ativação dos osteoclastos são movidas pela interação de RANK, com seu ligante, RANKL (Graves *et al.*, 2011). A clonagem e caracterização inicial de OPG como um receptor solúvel chamariz, pertencente à superfamília de receptores de TNF, foi o primeiro passo que levou a um esclarecimento deste sistema. Posteriormente, RANKL foi identificado como o mediador chave da osteoclastogênese, expresso tanto de forma transmembrana, quanto de forma solúvel (Khosla, 2001). Camundongos nocautes para o RANKL

apresentam osteopetrose severa com defeitos de erupção dentária. Esses animais apresentam também uma completa ausência de osteoclastos diferenciados, além de defeitos na diferenciação de células T e B (Kong *et al.*, 1999; Khosla, 2001).

A IL-6 é uma citocina que possui atividades que podem aumentar ou suprimir a destruição óssea inflamatória. É produzida localmente nos ossos após a estimulação pela IL-1 e TNF- α . A IL-6 estimula a formação de precursores dos osteoclastos por G-CSF e eleva o número dessas células, *in vivo*, levando a aumentos sistêmicos na reabsorção óssea. No entanto, dados sugerem que a IL-6 também tem significativa atividade anti-inflamatória (Balto *et al.*, 2001; Prso *et al.*, 2007).

As principais fontes celulares de IL-6 são monócitos, macrófagos, linfócitos Th2, células B ativadas e PMN. Além disso, células epiteliais, endoteliais e fibroblastos também liberam IL-6. O G-CSF estimula o crescimento e a diferenciação de granulócitos, monócitos, eritrócitos e megacariócitos de células progenitoras e também ativa granulócitos e macrófagos maduros (Radics *et al.*, 2003).

Ao contrário do TNF- α , que age diretamente sobre os precursores dos osteoclastos, a IL-1 e a IL-6 estimulam a reabsorção óssea indiretamente pelo aumento da produção de RANKL pelos osteoblastos, células mesenquimais e linfócitos. Este efeito indireto e pró-osteoclastogênico da IL-6 é substancialmente maior e, portanto, é mais importante fisiologicamente e patologicamente, que o efeito anti-osteoclastogênico que a IL-6 exerce diretamente sobre precursores dos osteoclastos (Taki *et al.*, 2007).

Stashenko e colaboradores (1994) observaram em modelos murinos de indução de lesão perirradicular, que a necrose pulpar se inicia no segundo dia após a exposição pulpar, seguida da destruição óssea periapical, observada em torno do sétimo dia, ocorrendo um período de destruição óssea rápida entre o sétimo e o vigésimo dia. Detectaram, utilizando a técnica de imunocoloração, IL-1 α e TNF- α em polpas infectadas depois de dois dias de exposição pulpar e altos níveis dessas citocinas nas lesões periapicais iniciais em torno de sete dias.

O TNF- α é um potente mediador imunológico das respostas inflamatórias agudas e crônicas, com capacidade de aumentar a reabsorção óssea (Birkedal-Hansen, 1993). É considerado o principal mediador da resposta inflamatória aguda induzida por bactérias Gram-negativas e outros microrganismos infecciosos. O estímulo mais importante para ativar a produção de TNF pelos macrófagos é o LPS,

embora as células T ativadas, NK e mastócitos também possam secretar essa citocina. O IFN- γ produzido pelas células T e pelas NK aumenta a síntese do TNF pelos macrófagos estimulados por LPS (Abbas *et al.*, 2012). Em 2007, De Sá e colaboradores sugeriram que, apesar do TNF- α não apresentar papel relevante na patogênia do abscesso dental sintomático, ele tem papel de destaque durante a inflamação crônica em tecidos. Kawashima e colaboradores (2007) demonstraram que a expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-1 α e IL-10 aumenta em lesões periapicais experimentalmente induzidas em animais após duas semanas de exposição dos SCR à microbiota oral.

A IL-1 tem como principal função, semelhante ao TNF, a de servir como mediadora da resposta inflamatória do hospedeiro às infecções e a outros estímulos. Atua sobre as células endoteliais induzindo a expressão de moléculas de superfície que medeiam a adesão leucocitária. A IL-1 atua, em conjunto com o TNF, na imunidade inata. Os macrófagos são a principal fonte de produção de IL-1, estando os neutrófilos e células endoteliais também envolvidos na sua produção. Existem duas formas de IL-1, *alfa* (α) e *beta* (β). A maioria de IL-1 encontrada na circulação humana é IL-1 β (Abbas *et al.*, 2012).

Além de mediar a produção de potentes moléculas inflamatórias, tais como as prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação de plaquetas e citocinas, e regular positivamente as moléculas de adesão das células endoteliais, a IL-1 afeta diversos processos imunológicos inatos. A IL-1 tem sido implicada como mediadora central durante os processos de destruição óssea e tecidual (Nicolas *et al.*, 2004; Fujisaki *et al.*, 2007).

O IFN- γ promove a diferenciação das células T CD4⁺ *naives* (virgens) em uma subpopulação Th1 e inibe a proliferação das células Th2. Ativa os neutrófilos e provoca a ação citotóxica das células NK. O IFN- γ é a principal citocina ativadora de macrófagos e exerce funções críticas na imunidade inata e na imunidade adaptativa mediada por células. O IFN- γ estimula os macrófagos a destruírem os microrganismos fagocitados, exacerbando sua ação microbicida, possibilitando a síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Sasaki *et al.*, 2004; Abbas *et al.*, 2012). A expressão do IFN- γ desencadeia-se primeiramente pela IL-12 e é regulada negativamente pela IL-10 (Čolíc *et al.*, 2010), podendo também ter sua produção suprimida pela IL-17A (Cruz *et al.*, 2006).

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

As lesões periapicais ocorrem como uma reação tecidual à infecção microbiana. Consistem de um infiltrado de células inflamatórias composto, em sua maioria, por neutrófilos, que são observados em todos os estágios do desenvolvimento da lesão (De Rossi *et al.*, 2008). Com a exposição ao antígeno, os macrófagos tanto iniciam quanto incrementam a resposta imune ao secretarem inúmeras citocinas pró-inflamatórias (IL-12, IL-1, TNF- α e IL-6), regulatórias (IL-10) e quimiocinas, que influenciam o recrutamento de monócitos, neutrófilos e linfócitos (Kornman *et al.*, 1997; Kawashima *et al.*, 2007). Os macrófagos presentes nestas alterações são importante fonte de IL1- α , IL1- β e TNF- α . O IFN- γ , que é produzido por linfócitos T e células NK, está associados à ativação destas células (Metzger, 2000).

De Rossi e colaboradores (2008) avaliaram citocinas pró e anti-inflamatórias no desenvolvimento das lesões perirradiculares. Observaram nos camundongos IFN- $\gamma^{-/-}$ que as lesões periapicais eram maiores do que as dos animais selvagens, e que, pelo menos individualmente, o IFN- γ endógeno teria efeito protetor na patogênese de reabsorção óssea periapical tardia *in vivo*, corroborando os dados *in vitro* de Sasaki e colaboradores (2004). Constataram que as citocinas IL-4 e IL-10 têm diferentes funções na modulação da destruição óssea. E que, camundongos deficientes para a IL-10 apresentam lesões periapicais maiores do que as dos deficientes para IL-4. A IL-4, aparentemente, não demonstrou nenhum efeito significativo na modulação da lesão periapical, pois as lesões eram similares às dos animais controle selvagens. Esses autores evidenciaram que inúmeros mecanismos se envolvem nas mudanças patológicas associadas a lesões periapicais agudas e crônicas. Seus trabalhos sugeriram que, pelo menos individualmente, o IFN- γ , a IL-10, o ICAM-1 e o CCR5 desempenham importantes papéis na patogênese das alterações perirradiculares, atuando como supressores endógenos no desenvolvimento das alterações periapicais.

A IL-10 é produzida por monócitos, macrófagos e linfócitos (Moore *et al.*, 1993; Mosmann *et al.*, 1994) e foi originalmente identificada pela sua habilidade de

antagonizar a imunidade celular (De Waal *et al.*, 1991). Dentre as suas características destaca-se a imunossupressão, deprimindo a ativação de células mononucleares e prevenindo a produção de mediadores da inflamação (De Waal *et al.*, 1991; Fiorentino *et al.*, 1991). A IL-10 inibe a capacidade de apresentação de antígenos em monócitos, pela regulação negativa do MHC de classe II nessas células (De Waal *et al.*, 1991) e a expressão de moléculas co-estimuladoras, *in vitro* (Willems *et al.*, 1994). Seus efeitos biológicos seriam consequência de sua habilidade em inibir muitas das funções dos macrófagos ativados, como por exemplo, a produção de IL-12 e TNF- α (Abbas *et al.*, 2012).

Sasaki e colaboradores (2000) examinaram o efeito da IL-4 e da IL-10 na destruição óssea estimulada por infecção em camundongos nocautes para IL-4 (IL-4^{-/-}) e IL-10 (IL-10^{-/-}) e em camundongos selvagens, utilizando um modelo *in vivo* de inflamação periapical. Concluíram que a IL-10, mas não a IL-4, é um importante supressor endógeno de reabsorção óssea estimulada por infecção *in vivo*, agindo provavelmente pela inibição da expressão de IL-1 α .

Outras moléculas também têm papel importante nesta rede de mecanismos. O TGF- β é uma citocina regulatória com potente efeito imunossupressor, sabidamente associada aos efeitos inibitórios da reabsorção óssea e à inibição da produção de citocinas do tipo 1 (Th1) (Teixeira-Salum *et al.*, 2010). Seu efeito inibitório foi descrito pela primeira vez em 1986 por Kehrl e colaboradores. Observou-se que ele impedia a proliferação de células B e T. Entretanto, a evidência definitiva de seu papel veio com a análise das respostas à infecção em camundongos deficientes para esse gene (Wan & Flavell, 2008).

Atualmente, sabe-se que o TGF- β inibe a proliferação e diferenciação das células T e a ativação dos macrófagos. Atua também em outras células, como os leucócitos polimorfonucleares e as células endoteliais, em grande parte contrabalanceando os efeitos das citocinas pró-inflamatórias. Camundongos deficientes para o gene TGF- β 1 desenvolvem lesões inflamatórias descontroladas, sugerindo que essa citocina é necessária para a manutenção da homeostase (Stashenko *et al.*, 1998; Wan & Flavell, 2008).

Teixeira-Salum e colaboradores (2010) avaliaram os níveis de NO, IL-4, TGF- β , TNF- α e IFN- γ em lesões periapicais, determinando sua possível associação com parâmetros clínicos e radiográficos. Concluíram que os granulomas periapicais apresentam um ambiente regulatório caracterizado por alta expressão de TGF- β e

pouca de citocinas pró-inflamatórias, enquanto os cistos radiculares exibem uma resposta inflamatória mista (Th1 e Th2), com a presença de IFN- γ , TNF- α e IL-4.

Vários laboratórios têm usado o modelo de patologia pulpar e periapical em camundongos induzindo a exposição pulpar e a infecção com microrganismos provenientes do ambiente oral. Nesses modelos, a destruição do osso periapical começa em torno do sétimo dia. Um período de rápida destruição óssea ocorre entre o sétimo e o décimo quinto dia (fase ativa), com diminuição da reabsorção em seguida (fase crônica) (Tani-Ishi *et al.*, 1995; Kawashima & Stashenko, 1999). Esse fenômeno provavelmente ocorre porque, nas fases iniciais, o sistema imune tende a eliminar e a controlar a infecção usando os efetores inflamatórios apropriados, caracterizados por carência de antígenos específicos com toxicidade ao hospedeiro. Numa fase posterior, a resposta imune aparece associada a uma toxicidade mínima, representando uma tentativa de conter os agentes infecciosos que não foram eliminados anteriormente (Manetti *et al.*, 1993). Portanto, a melhor compreensão desses aspectos oferecerá melhores condições para se estudar as várias facetas dessa patogenia.

2.3 Artrite reumatóide

Uma condição de grande relevância na clínica médica é a artrite reumatóide (AR). Os relatos de existência dessa doença destrutiva das articulações acompanham a história da humanidade. A artrite reumatóide acomete aproximadamente 1% da população mundial, levando comumente a índices significativos de incapacidade funcional e, conseqüentemente, a uma pior qualidade de vida (Nakae *et al.*, 2003; Farquharson *et al.*, 2012). Sua prevalência aumenta com a idade, sendo três vezes maior em mulheres entre a quarta e a sexta décadas de vida (Gabriel, 2001; Firenstein, 2003; Neovius *et al.*, 2011).

A AR é uma doença inflamatória crônica, sistêmica e progressiva, de caráter autoimune, na qual ocorre a indução da proliferação da membrana sinovial, erosão da cartilagem articular, infiltração de células inflamatórias nos espaços periarticulares e destruição óssea (Firenstein, 2003; Scott *et al.*, 2010; Culshaw *et al.*, 2011).

A inflamação articular tem início na membrana sinovial, presente na camada interna da cápsula articular, formada por sinoviócitos que secretam o líquido sinovial.

Na sinóvia reumatóide, ocorre uma hiperplasia dessa camada de células, paralelamente a uma migração de linfócitos T e mastócitos na camada sub-sinovial, além de um rico infiltrado neutrofílico, predominantemente, no líquido sinovial (Bingham, 2002; Smolen & Steiner, 2003; Firestein, 2005; Scott *et al.*, 2010). Esse quadro, por sua vez, provoca um aumento na produção de mediadores pró-inflamatórios, como IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IFN- γ e IL-17A, em detrimento dos anti-inflamatórios, que culmina na erosão da cartilagem, osso e perpetuação da AR (Bingham, 2002; Steiner, 2003; Firestein, 2005; Scott *et al.*, 2010; Culshaw *et al.*, 2011).

Amplamente identificado nos tecidos sinoviais de pacientes com AR, o TNF- α induz alterações que se correlacionam diretamente com a progressão da doença (Chu *et al.*, 1991). Essa citocina participa ativamente da migração e ativação celular nessa condição inflamatória, o que resulta na liberação de enzimas proteolíticas e outras citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8), além de estimular a proliferação dos sinoviócitos e induzir a formação de *pannus* (Brennan *et al.*, 1989; Grimbacher *et al.*, 1998).

A AR é diagnosticada com base na história clínica do paciente, no exame físico e na contagem de células do sangue (eosinófilos, proteína C-reativa, imunoglobulina de fator reumatóide). Em adição, métodos imaginológicos (radiografias e ressonância magnética) são utilizados para se investigar as articulações. A doença se manifesta através de sinais típicos, tais como: articulações inchadas, quentes, dolorosas e rígidas. A atividade inflamatória leva a problemas nos tendões, erosão e destruição da superfície da articulação que resulta em deformidades que prejudicam a amplitude do movimento, além de sintomatologia dolorosa (Mikuls *et al.*, 2009; Persson, 2012).

Evidências científicas demonstram que a IL-17 tem importante papel na remodelação óssea, especialmente em casos de artrite (Gaffen, 2004; Yu *et al.*, 2007). Nesta doença, observam-se níveis elevados de IL-17 nos fluidos sinoviais desses pacientes, o que exerce efeito direto sobre as células ósseas. Em modelos murinos de artrite, ao se bloquear a IL-17A observa-se a redução da inflamação e da destruição óssea (Nakae *et al.*, 2003; Röhn *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2012). Por outro lado, sua sobre-expressão exacerba a doença (Yu *et al.*, 2007).

Durante os últimos anos, uma associação entre artrite reumatóide e doenças bucais tem sido debatido. Os mecanismos de destruição do osso alveolar na doença periodontal e superfícies articulares são semelhantes àqueles observados na AR.

Uma superprodução de citocinas e MMP parece ser comum nestas doenças (Bartold *et al.*, 2005). Ambas apresentam altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e TNF- α , e baixos níveis de citocinas regulatórias, tais como IL-10 e TGF- β (Arend & Dayer, 1990).

Alguns estudos demonstram a presença de células Th17 nas periodontites crônicas (Cardoso *et al.*, 2009), bem como observaram a presença de citocinas do tipo Th17 em lesões periapicais (Takahashi *et al.*, 2005; Vernal *et al.*, 2005; Ohyama *et al.*, 2009; Oseko *et al.*, 2009; Henriques *et al.*, 2011). Curiosamente, estudos em modelos murinos demonstraram que camundongos deficientes para IL-17 podem apresentar tanto aumento (Yu *et al.*, 2007; AlShwaimi *et al.*, 2013) quanto diminuição das lesões periapicais (Oseko *et al.*, 2009) em resposta a patógenos periodontais

A IL-17 é uma citocina pró-inflamatória que medeia inúmeras respostas inflamatórias crônicas, incluindo angiogênese, recrutamento de células inflamatórias e indução de mediadores pró-inflamatórios por tecidos epiteliais e endoteliais (Ouyang *et al.*, 2008; Queiroz-Junior *et al.*, 2010). Embora estudos sobre o papel da IL-17 nas doenças periapicais e periodontais tenha se iniciado apenas recentemente, alguns trabalhos sugerem que a IL-17 participa da progressão de lesões crônicas localizadas como naquelas observadas na AR (Marçal *et al.*, 2010), assim como em doenças sistêmicas graves, tais como o diabetes (Kramer & Gaffen, 2007).

Apesar dos inúmeros estudos sobre a AR, o fator de desencadeamento da doença ainda parece ser uma incógnita. Existem evidências de que agentes infecciosos associados à predisposição genética ou outras condições, possam induzir uma resposta inflamatória com produção de auto-anticorpos nessa doença (Smolen & Steiner, 2003; Scott *et al.*, 2010; Culshaw *et al.*, 2011).

Recentes pesquisas com foco na infecção por *Porphyromonas gingivalis*, identificaram na resposta imune a esta infecção, um fator explicativo de por que indivíduos com periodontite podem desenvolver AR (Albandar & Rams, 2002; Silman & Pearson 2002). No passado, estas duas doenças foram estudadas de forma independente, com tentativas focadas na compreensão dos mecanismos das doenças individualmente e estratégias terapêuticas em potencial (Bartold *et al.*, 2005; de Pablo *et al.*, 2009). Uma importante via envolve a expressão regulada positivamente pelo RANKL e pelos fibroblastos, que é um fator essencial para a

formação de osteoclastos (Crotti *et al.* 2003; Haynes *et al.*, 2003; Cantley *et al.*, 2009; Bartold *et al.*, 2010).

A descoberta dos anticorpos protéicos anti-citrulinação (ACPAs) como marcadores mais sensíveis e específicos para a doença, resultou de observações de que os auto-anticorpos anti-queratina podem ser detectados em 40-55% dos pacientes com AR. Estes anticorpos anti-queratina reconhecem um epítopo contendo a citrulina, uma forma deaminada de arginina (Van Venrooij & Pruijn, 2000; Farquharson *et al.*, 2012). Estes ACPAs presentes nos pacientes com AR, estão associados com a progressão da doença, podendo ser detectável até dez anos antes do seu aparecimento clínico. Proteínas citrulinadas podem ser criadas pelas enzimas de peptidil arginina deaminase (PAD), que substituem um resíduo de arginina na amina com um grupo oxigênio para formar a citrulina (Farquharson *et al.*, 2012).

Em 2004, Rosenstein e colaboradores introduziram a hipótese de que a *Porphyromonas gingivalis*, que é o único microrganismo que expressa PAD, permitiria aos indivíduos com periodontite serem expostos a antígenos citrulinados, estando em risco de desenvolver a AR. Assim, *P. gingivalis* geraria rapidamente, no hospedeiro, peptídeos citrulinados por clivagem proteolítica. Estudos têm mostrado que a *P. gingivalis* contém uma variedade de proteínas endógenas citrulinadas que não estão presentes em outros agentes patogênicos orais. A infecção bacteriana oral por *P. gingivalis*, pode, portanto, desempenhar um papel na citrulinação peptídica e desenvolvimento da AR (Kinloch *et al.*, 2008; Persson, 2012). Há poucos, se houver, outros estudos que relacionaram bactérias específicas como potencialmente causadores de AR. Assim, *P. gingivalis* pode estar diretamente ligada a AR através citrulinação e indução de anticorpos antipeptidil citrulina que reagem com as autoproteínas citrulinadas humanas. Esta pode ser a prova mais convincente de que um patógeno associado à periodontite tem um impacto no desenvolvimento e progressão de outra doença (Persson, 2012).

Entretanto, ainda não foi elucidada a possibilidade deste mecanismo ocorrer em lesões periapicais, nas quais essa bactéria é comumente recuperada. Além disso, não se sabe se a doença reumatóide seria um fator complicador para o desenvolvimento e manutenção dessas lesões. Ou, se lesões perirradiculares podem atuar no desenvolvimento e manutenção da AR.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais induzidas em modelos murinos.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar, através da histologia, o efeito da infecção endodôntica na artrite reumatóide experimental. Comparar os grupos experimentais entre si;
- Avaliar o perfil da resposta imune em lesões periapicais induzidas em camundongos selvagens (C57BL/6) e IL-17RA KO, dosando-se as citocinas RANK, RANKL, IL-6, IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, TGF- β , IL-10 e IL-4, por meio do PCR em tempo real e, adicionalmente, comparar os grupos experimentais entre si.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Neste estudo utilizaram-se dois modelos animais: um para indução de AR e outro para indução de lesão periapical. Estabeleceram-se quatro grupos experimentais (n=5):

Grupo I: animais C57BL/6 com infecção endodôntica

Grupo II: animais IL-17RA KO com infecção endodôntica

Grupo III: animais C57BL/6 AIA: modelo de artrite + infecção endodôntica

Grupo IV: animais IL-17RA KO AIA: modelo de artrite + infecção endodôntica

4.2 Aspectos éticos

Este trabalho foi previamente aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais. Parecer nº 240/2012.

4.3 Microrganismos

Para se induzir as infecções endodônticas utilizaram-se os microrganismos: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611) e *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953).

4.4 Reativação e manutenção dos microrganismos

As amostras congeladas foram recuperadas em 5 mL de caldo BHI suplementado com extrato de levedura, hemina e menadiona, incubado a 37°C, por 48 horas, em câmara de anaerobiose contendo atmosfera de 85% de N₂, 10% de H₂ e 5% de CO₂ (Forma Scientific, Inc., Marietta, OH, USA). Decorrido esse tempo de incubação, as amostras foram repicadas em ágar BHI suplementado com sangue de carneiro, extrato de levedura, hemina e menadiona (Sutter *et al.*, 1979). Após confirmação, pelo método de Gram, da pureza das amostras, estas foram mantidas em câmara de anaerobiose. Durante toda a fase experimental, as bactérias utilizadas também foram mantidas em freezer a -80°C.

4.5 Padronização do inóculo microbiano

Para a padronização dos inóculos microbianos utilizaram-se culturas em fase exponencial, determinando-se a absorbância em espectrofotômetro (Spectrun série SP-2100), em comprimento de onda de 600 nm, obtendo-se uma concentração de 10^8 UFC/mL a ser inoculada no SCR dos animais.

4.6 Animais

Utilizaram-se camundongos C57BL/6 e IL-17RA KO de ambos os gêneros, com 8 semanas de idade. Cada grupo experimental foi composto por 5 camundongos. Os animais foram alimentados com dieta comercial (Nuvital, Curitiba, PR, Brasil) e água, *ad libitum*.

4.7 Infecção endodôntica experimental

Antes de qualquer procedimento, os animais foram anestesiados intraperitonealmente utilizando-se 100 mg/kg de ketamine hydrochloride (Dopalen, Division Vetbrands Animal Health, Jacareí, SP, Brasil) e 10 mg/kg de xilazine 4% (Anasedan, Agribands do Brasil LTDA, Paulínia, SP, Brasil) administrados com seringas do tipo tuberculínicas (Silva *et al.*, 2008). O anestésico e o analgésico foram misturados na proporção de 10 mL de ketamine para 7,5 mL de xilazine (Maltos *et al.* 2004).

A abertura coronária foi realizada no primeiro molar superior do lado esquerdo, utilizando-se brocas carbide de $\frac{1}{4}$ (Dentsply-Maillefer), esteréis, sem irrigação, acopladas à caneta de baixa rotação, estéril, ligada a um aparelho de rotação controlada (Driller, São Paulo, Brasil). Todos os procedimentos operatórios foram realizados sob a bancada de um microscópio de uso odontológico (Alliance, SP, Brasil). Após sua localização, o canal palatino teve o tecido pulpar desorganizado utilizando-se limas tipo Kerr #08 e #10 (Dentsply-Maillefer). Em seguida, 20 μ l das culturas bacterianas, correspondendo a 10^8 UFC/mL, foram inoculados nos canais com o auxílio de seringas do tipo tuberculínicas. Todos os dentes foram selados com Coltosol® após os procedimentos. O grupo controle foi constituído pelo primeiro molar superior do lado direito de cada animal, quando se realizaram os mesmos procedimentos acima descritos, sem, contudo, inocular os microrganismos. Os animais foram avaliados no décimo quarto e no vigésimo primeiro dias após a infecção.

4.8 Modelo de artrite induzida por antígeno (AIA)

AIA foi induzida como descrita por Wengner e colaboradores (2007). Camundongos C57BL/6 e IL-17RA KO foram imunizados no vigésimo primeiro dia com uma injeção de 100mg de albumina bovina sérica metilada (mBSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) dissolvida em 50 µl de PBS, emulsificada em 50 µl de adjuvante completo de freund (CFA) (Sigma-Aldrich) e suplementada com 4 mg/mL da cepa H37RA da *Mycobacterium tuberculosis* inativada pelo calor (Difco, Detroit, MI). No décimo quarto dia, outra imunização foi realizada com mBSA emulsificada em 50 µl de adjuvante incompleto de freund (IFA) (Sigma-Aldrich). Em paralelo, 200 ng da toxina da bactéria *Bordetella pertussis* (Calbiochem, La Jolla, CA) foi injetada intraperitonealmente. O primeiro desafio articular foi realizado no dia 0, após a segunda imunização com a injeção de 100 mg de mBSA dissolvido em 20 µl de PBS, no joelho direito dos camundongos. Vinte e oito dias após, os camundongos foram redesiados com uma segunda injeção intra-articular de 100 mg de mBSA dissolvido em 20 µl de PBS. Os joelhos direitos (escore articular) e primeiros molares superiores esquerdos (qPCR) foram analisados 14 e 21 dias após a infecção endodôntica experimental, que ocorreu dois dias após o redesafio articular (FIGURA 1). Os controles negativos incluíram camundongos com imunização sistêmica com mBSA (segundo o protocolo descrito acima), mas desafiados com injeção de PBS nas articulações dos joelhos esquerdos, bem como animais não manipulados. Uma vez que não houve diferença entre os grupos controles, em nenhum dos parâmetros observados, todos foram agrupados em um só grupo controle.

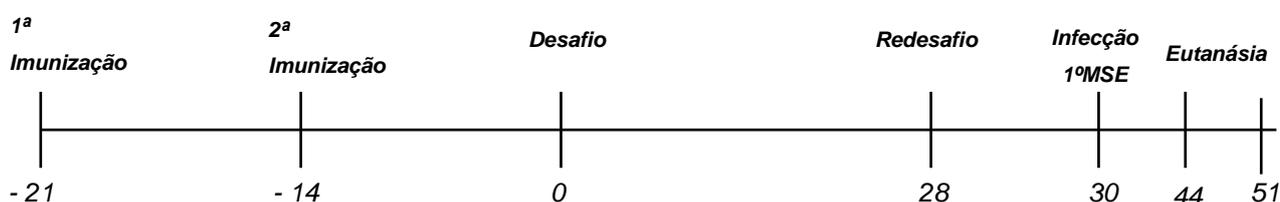


FIGURA 1 - Delineamento: AR concomitante com lesão periapical

4.9 Avaliação da articulação

Avaliaram-se as alterações articulares nos grupos experimentais, no 14º e 21º dias, removendo-se os joelhos e promovendo-se a avaliação histológica dos mesmos. As amostras foram fixadas em formol tamponado a 10% (pH 7.4),

descalcificadas por 30 dias em EDTA 14%, embebidas em parafina, cortadas e coradas em HE. Duas seções da articulação do joelho foram microscopicamente observadas por um único patologista, em ensaio sob ocultação, avaliando-se diferentes parâmetros, tais como: gravidade da hiperplasia sinovial, intensidade e extensão do infiltrado inflamatório e erosão óssea. Os valores foram somados para se obter um índice de artrite (variando de 0 a 9) (Queiroz-Junior *et al.*, 2010).

4.10 Avaliação da expressão de citocinas nas lesões perirradiculares

O método escolhido para avaliação da expressão gênica foi a reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), a qual, pela amplificação do cDNA obtidos a partir do mRNA, permitiu quantificar exatamente o número de cópias de cada mRNA presente nas amostras.

4.11 Extração e quantificação do RNA

Após o sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o dente e o tecido adjacente aos molares, submetidos ao procedimento operatório (experimental e controle), foram removidos e macerados separadamente para extração do RNA total, pelo método do TRIzol (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA), de acordo com instruções do fabricante. A quantificação do RNA foi feita em espectrofotômetro (Nanodrop ND-1000) (600nm) e o grau de pureza das amostras obtidas determinado pelo valor da relação 260/280.

4.12 Obtenção do cDNA

A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir do RNA total, utilizando-se um *mix* contendo desoxirribonucleotídeos fosfatados (DNTPs), Oligo-dT₁₅ (Promega Corp.), Dithiothreitol (DTT), água tratada com DEPC e tampão da enzima transcriptase reversa (Promega Corp., Madison WI). Doze microlitros de *mix* e 1µg de RNA de cada amostra foram adicionados a cada tubo. As amostras foram levadas ao termociclador Thermo Hybaid (PCR Express - UK) sob as condições padrão para cDNA: 70°C por 5 minutos, 4°C por 5 minutos, pausa para adição de 3 µl da solução contendo a enzima (50U), 23°C por 5 minutos, 37°C por 1 hora, 90°C por 5 minutos e 5°C até o recolhimento das mesmas. Foi utilizado um volume final de 25 µl por reação. O cDNA foi armazenado em *freezer* a -20°C até sua utilização.

4.13 Reação em cadeia da polimerase em tempo real

Numa primeira fase da análise da expressão gênica, utilizaram-se várias diluições dos iniciadores do gene normalizador Hypoxanthinephosphoribosyltransferase (HPRT) e do cDNA para determinar as concentrações ideais de cada amostra. Em seguida, diferentes diluições dos iniciadores específicos para cada uma das citocinas – IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, RANK, RANKL, TGF- β , IL-10 e IL-4 (TABELA 1) – foram analisadas para determinar a concentração ótima dos mesmos em cada reação (Overbergh *et al.*, 2003). Estas concentrações foram utilizadas em todos os experimentos realizados.

As reações de qPCR foram realizadas no aparelho Step One Real Time PCR Systems, empregando-se o kit SYBR Green PCR Master Mix 2X (Applied Biosystems, Foster City, CA). Em cada poço de reação foram adicionados o cDNA, os *primers* específicos para cada determinação (5 μ M), o *master mix* e água para um volume final de 15 μ l. Em seguida, as placas foram colocadas na máquina e as reações de amplificação realizadas de acordo com o seguinte protocolo: 10 min a 95°C, 40 ciclos de 95°C durante 15 seg e 60°C por 1 min; seguida da curva de dissociação com incubação a 95°C por 15 seg, 60°C por 1 min e aquecimento até 95°C com análise simultânea.

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

No que se refere à avaliação de especificidade, foi executada a análise das curvas de dissociação ao final de cada reação, para distinguir o sinal de fluorescência originado dos amplicons específicos, daqueles relacionados com dimerização de iniciadores ou outros artefatos. Os resultados foram expressos como

quantificação relativa, ou seja, expressa a variação relativa do gene em estudo do grupo experimental em relação ao grupo controle.

TABELA 1: Sequência dos *primers*

Gene	Sequência (5'-3')	pb
HPRT	FW: GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT RV: GAT TCA ACT TGC GCT CAT CTT AGG C	163
TNF- α	FW: ATC TTC TCA AAA TTC GAG TGA CCA RV: TGG AGT AGA CAA GGT ACA ACC C	173
TGF- β	FW: TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG RV: GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC	170
RANKL	FW: CAT CCC ATC GGG TTC CCA TAA RV: CCT TAG TTT TCC GTT GCT TAA CGA C	100
RANK	FW: TGC TGG CAT GGT GAT GGA RV: GAA TGA TGC CAG GTG GTA GGA	78
IL-4	FW: ACA GGA GAA GGG ACG CCAT RV: GAA GCC CTA CAG ACG AGC TCA	95
IL-17A	FW: TGA GCT TCC CAG ATC ACA GA RV: TGC AGA ACG CCC TCA GAC TA	101
IL-10	FW: GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA RV: ACC TGC TCC ACT GCC TT GCT	191
IFN- γ	FW: CAA GTG GCA TAG ATG TGG AAG AA RV: TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG	91
IL-1 β	FW: CAA CCA ACA AGT GAT ATT CTC CAT G RV: GAT CCA CAC TCT CCA GCT GCA	152
IL-6	FW: TTC CAT CCA AGT TGC CTT CTT G RV: TTG GGA GTG GTA TCC TCT GTG A	102

FW (*forward primer*), RV (*reverse primer*), pb (pares de base)

4.14 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

Para os dados histológicos utilizou-se o teste de Mann Whitney, uma vez que a distribuição das amostras não apresentou normalidade.

Os dados referentes à expressão gênica das citocinas foram analisados utilizando-se o Teste t Pareado entre o grupo não infectado (controle) e o grupo infectado, para avaliar a significância das diferenças observadas entre os grupos. E, entre os dois grupos de animais (C57BL/6 e IL17RA KO), utilizou-se o Teste de Wilcoxon.

Em todas as análises, o nível de significância foi de 95%, sendo que um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

O primeiro objetivo deste estudo foi induzir AIA nas diferentes linhagens de animais, quais sejam camundongos selvagens (C57BL/6) e camundongos nocautes (IL-17RA KO), com e sem infecção endodôntica experimental. Os resultados obtidos demonstram que a AIA foi estabelecida em todos os grupos (FIGURA 5 e 6).

Com o propósito de analisar se as infecções endodônticas experimentais interfeririam no desenvolvimento da artrite, cortes histológicos foram realizados dos quatro grupos propostos por este estudo. Observamos que todos os animais C57BL/6 AIA demonstraram lesões articulares mais bem desenvolvidas, com diferença estatisticamente significativa em relação aos controles, em 14 e 21 dias, submetidos ou não à infecção endodôntica experimental. Os animais não infectados não apresentaram diferença estatística nos dois tempos distintos (14 e 21 dias) em relação ao desenvolvimento da artrite. Já em relação aos animais submetidos à infecção endodôntica experimental, observou-se uma diminuição da artrite no 21º dia (FIGURA 2).

Quando analisamos os animais IL-17RA KO AIA notamos que somente os animais não infectados, no 14º dia, não demonstraram lesões articulares bem desenvolvidas, com diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Entretanto, os outros animais evidenciaram lesões bem desenvolvidas, no 14º e 21º dias, submetidos ou não à infecção endodôntica experimental. Os animais não infectados e infectados não apresentaram diferença estatística nos dois tempos distintos (14 e 21 dias) em relação ao desenvolvimento da artrite (FIGURA 3).

Nos animais IL-17RA KO AIA infectados, observou-se que, em ambos os tempos, houve diferença estatística em relação aos controles, mas não foi possível observar diminuição dos níveis da artrite no 21º dia, como observado no grupo anterior (FIGURA 3). Quando foram comparados os grupos, observou-se que os animais nocautes tiveram um escore articular reduzido no 14º dia, em relação aos animais C57BL/6, quando ambos foram infectados (FIGURA 4).

As figuras 5 e 6 evidenciam as características histopatológicas do desenvolvimento da AIA em todos os grupos nos tempos estudados. No 14º dia, observamos, no grupo C57BL/6 AIA infectado e C57BL/6 AIA controle, acúmulos de células inflamatórias e vasos hiperemiados, nesse último animal. IL-17RA KO AIA

controle apresenta hiperplasia da membrana sinovial, áreas de maior acúmulo de células inflamatórias e vasos hiperemiados. O mesmo pode ser observado no grupo IL-17RA KO AIA infectado (FIGURA 5).

Aos 21 dias, observou-se no grupo C57BL/6 AIA controle e C57BL/6 AIA infectado, presença de hiperplasia da membrana sinovial e acúmulos de células inflamatórias. IL-17RA KO AIA controle e IL-17RA KO AIA infectado apresentam hiperplasia da membrana sinovial, áreas de maior acúmulo de células inflamatórias e vasos hiperemiados (FIGURA 6).

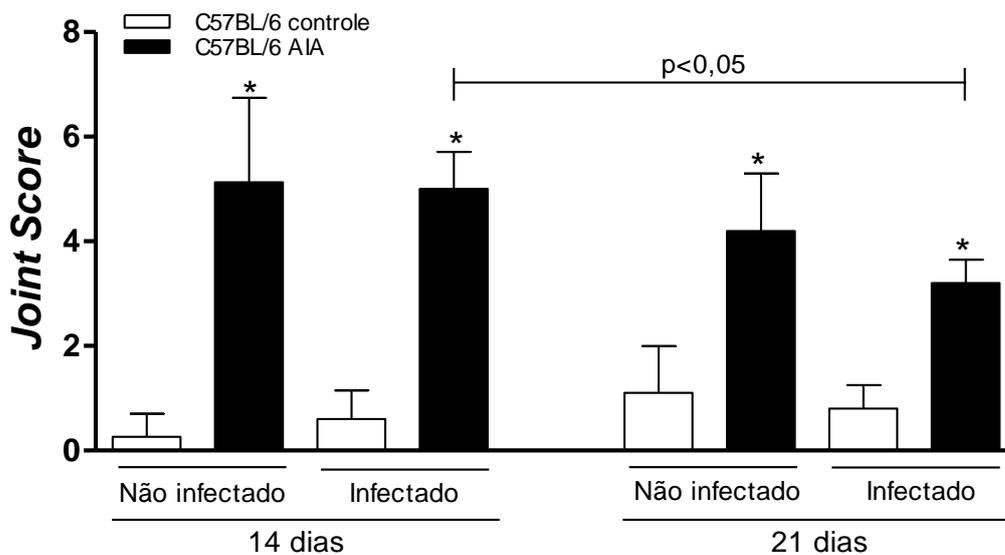


FIGURA 2 - Score articular: C57BL/6 controle e C57BL/6 AIA não infectados e infectados em 14 e 21 dias. Teste de Mann Whitney (n=5). * $p < 0,05$.

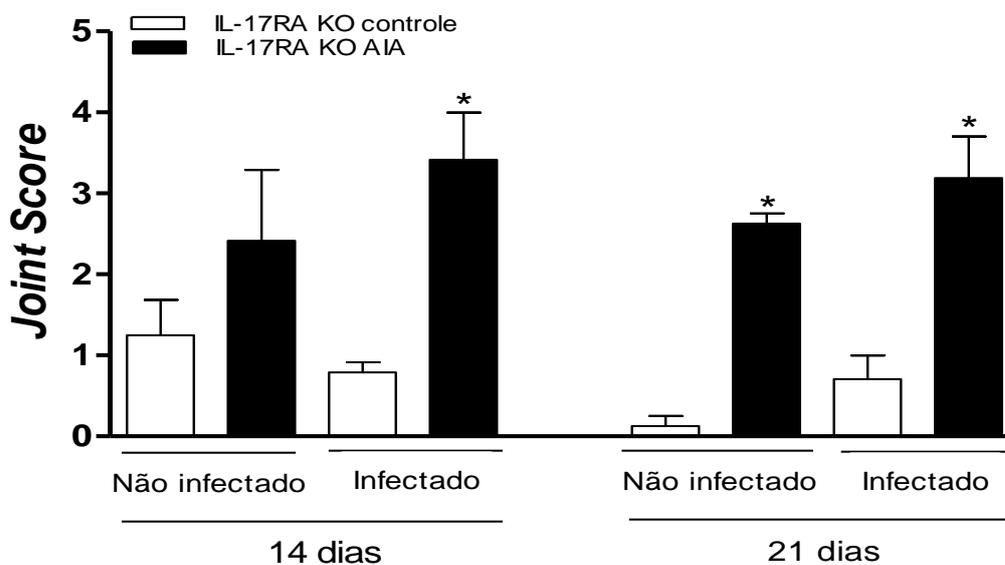


FIGURA 3 - Score articular: IL-17RA KO AIA não infectados e infectados em 14 e 21 dias. Teste de Mann Whitney (n=5). * $p < 0,05$.

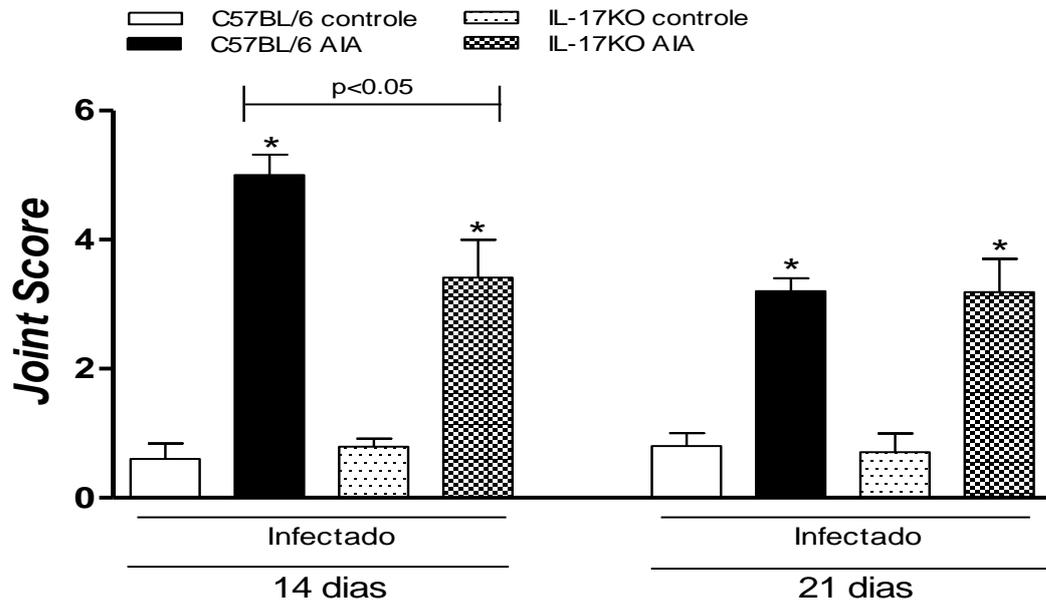


FIGURA 4 - Score articular: C57BL/6 controle, IL-17RA KO, C57BL/6 AIA e IL-17RA KO AIA infectados em 14 e 21 dias. Teste de Mann Whitney (n=5). * $p < 0,05$.

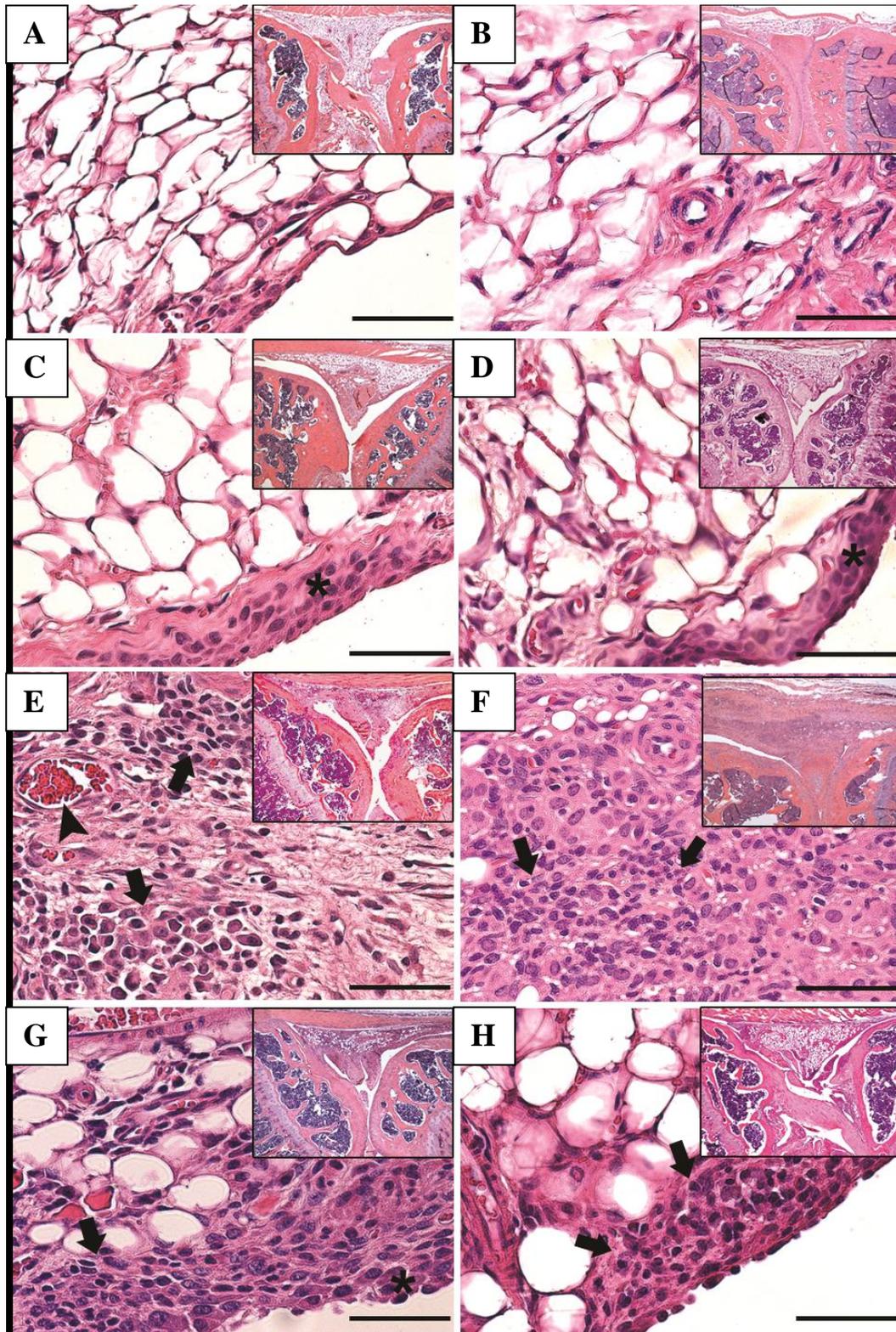


FIGURA 5 - Características histopatológicas das articulações de joelhos em camundongos C57BL/6, IL-17RA KO, C57BL/6 AIA e IL-17RA KO AIA com 14 dias após redesafio articular. **A:** C57BL/6 controle; **B:** C57BL/6 com infecção endodôntica; **C:** IL-17RA KO controle; **D:** IL-17RA KO com infecção endodôntica; **E:** C57BL/6 AIA controle; **F:** C57BL/6 AIA infectado; **G:** IL-17RA KO AIA controle; **H:** IL-17RA KO AIA infectado. Coloração em HE no aumento de 400X e o inserto em 40x. Barra: 50µm. * Hiperplasia da membrana sinovial.

➡ : Acúmulo de células inflamatórias. ▶ : Vasos hiperemiados.

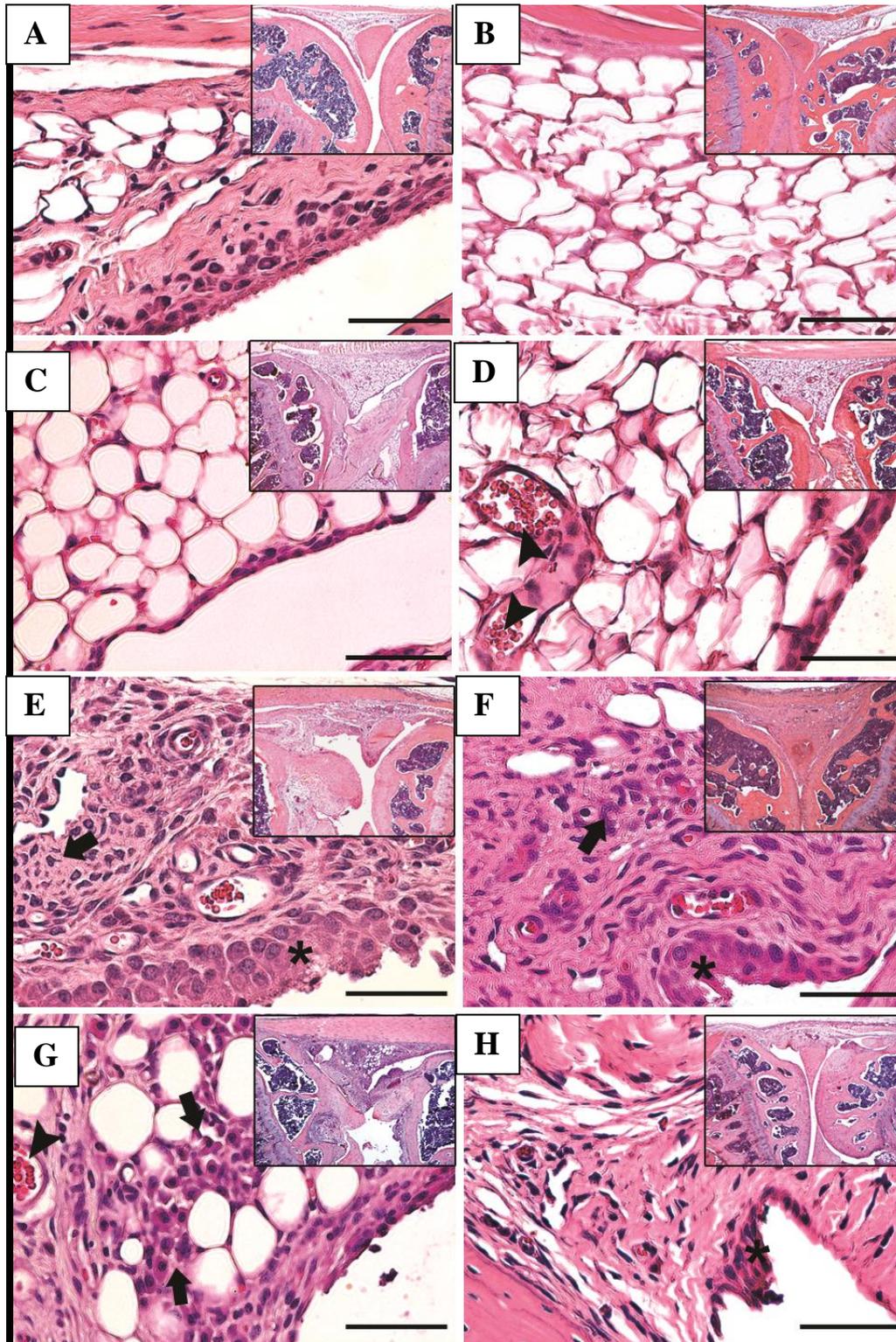


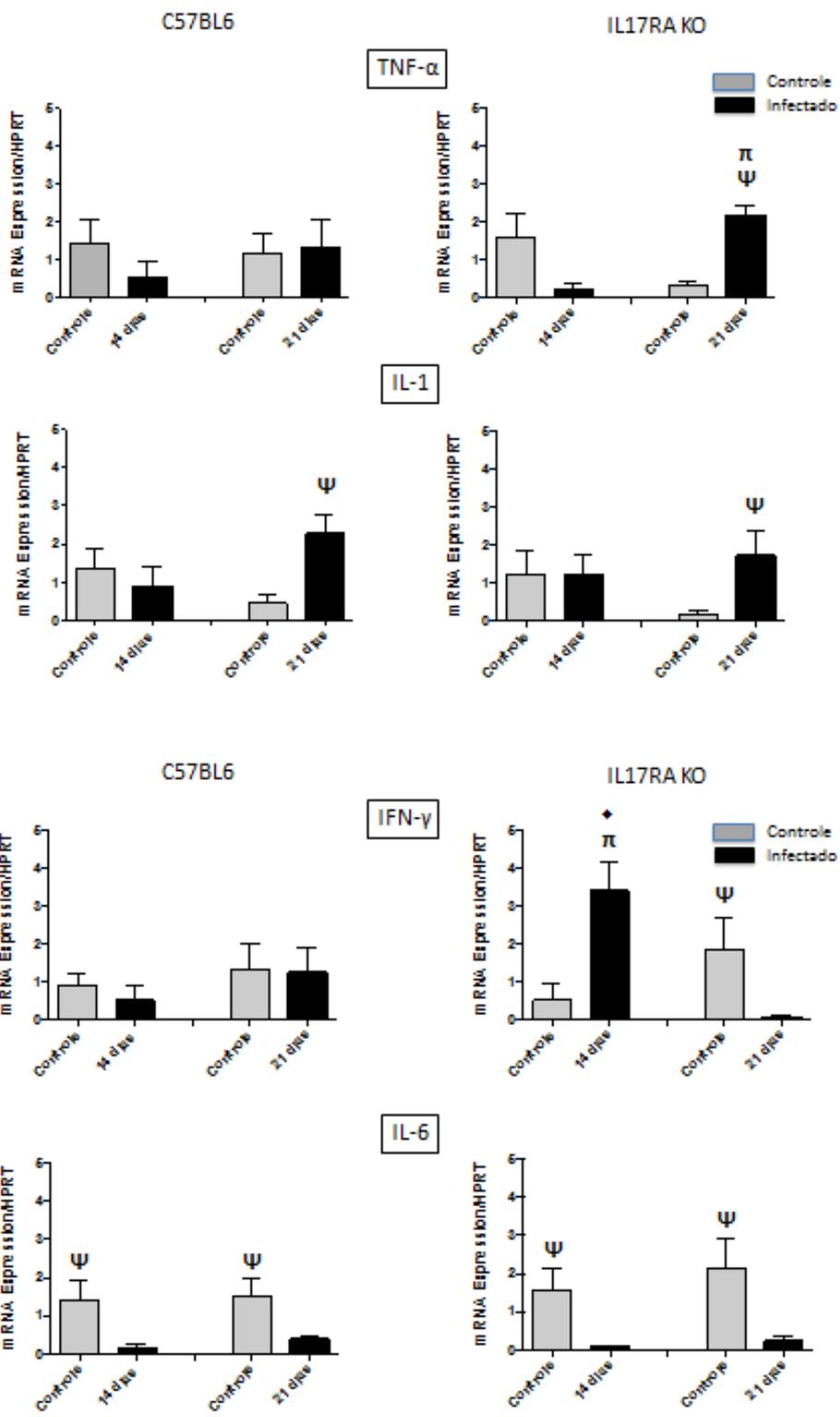
FIGURA 6 – Características histopatológicas das articulações de joelhos em camundongos C57BL/6, IL-17RA KO, C57BL/6 AIA e IL-17RA KO AIA com 21 dias após redesafio articular. **A:** C57BL/6 controle; **B:** C57BL/6 com infecção endodôntica; **C:** IL-17RA KO controle; **D:** IL-17RA KO com infecção endodôntica; **E:** C57BL/6 AIA controle; **F:** C57BL/6 AIA infectado; **G:** IL-17RA KO AIA controle; **H:** IL-17RA KO AIA infectado. Coloração em HE no aumento de 400X e o inserto em 40x. Barra: 50µm. * Hiperplasia da membrana sinovial. **➡**: Acúmulo de células inflamatórias. **▶**: Vasos hiperemiados.

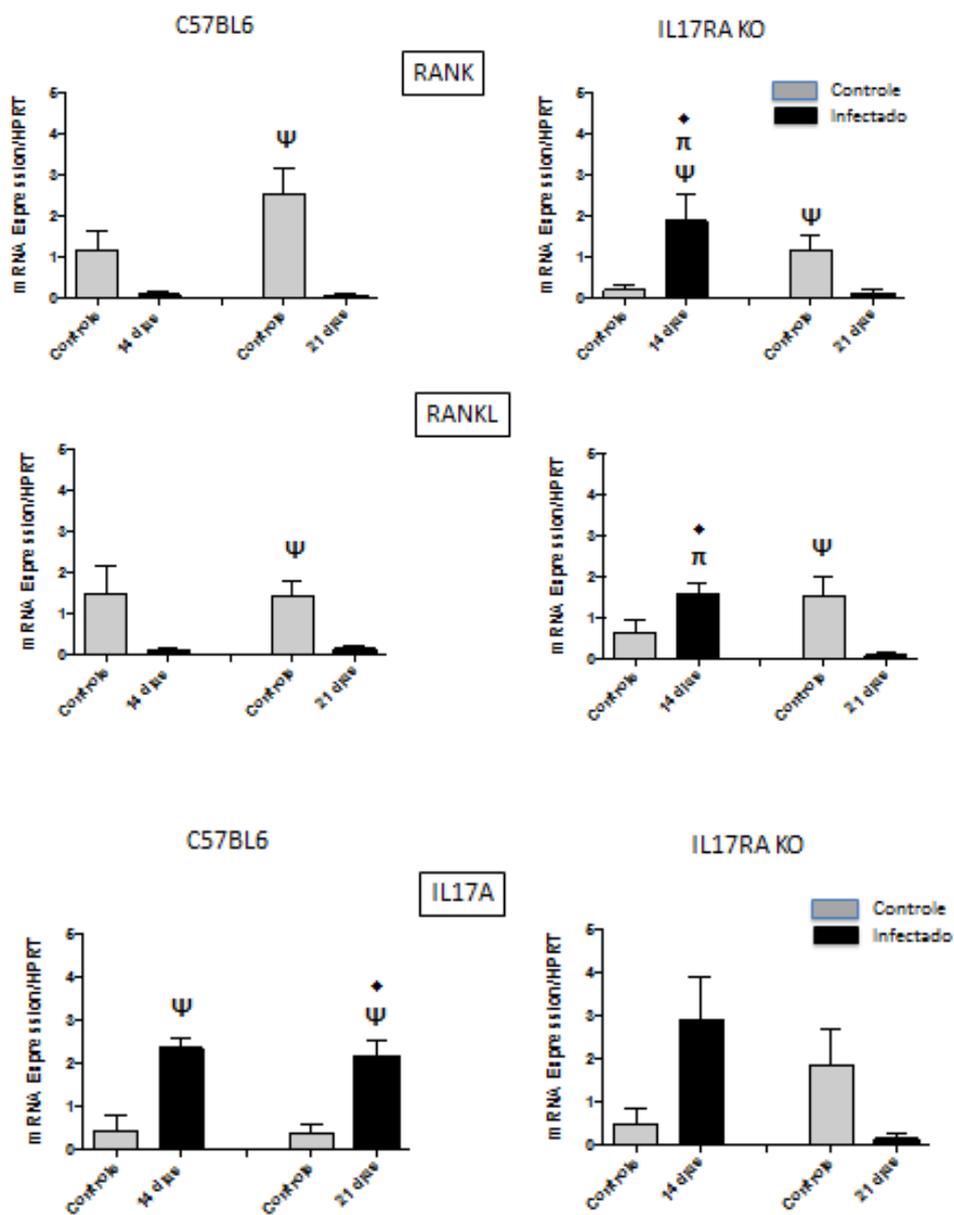
Para contemplar o segundo objetivo deste estudo, as citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, RANK, RANKL, TGF- β , IL-10 e IL-4 foram dosadas utilizando-se o qPCR para as amostras dos grupos I e II (C57BL/6 e IL-17RA KO) submetidos à infecção endodôntica, respectivamente (FIGURA 7).

Observamos uma expressão gênica basal, dos níveis de mRNA, das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-10, em 14 e 21 dias no grupo I ($p > 0,05$). E, níveis basais das citocinas IL-17A, TGF- β , IL-10 e IL-4 no grupo II, também em ambos os tempos avaliados ($p > 0,05$). No grupo I, quando analisamos o 14^o dia, observou-se uma diminuição da expressão de IL-6 em relação ao controle e um aumento de IL-17A. Por sua vez, no 21^o dia, a expressão de IL-1 β e IL-17A estavam aumentadas em relação ao controle. Porém, IL-6, RANK, RANKL e IL-4, evidenciaram uma diminuição nesse mesmo período de tempo.

No grupo II, notamos uma diminuição significativa da expressão de IL-6 em relação ao controle no 14^o e 21^o dias. RANK apresentou aumento no 14^o dia em relação ao controle. Entretanto, quando analisamos o 21^o dia, observamos aumento de TNF- α e IL-1 β e, uma diminuição de IFN- γ , IL-6, RANK e RANKL em relação ao controle. Já quando comparamos os tempos analisados, observamos uma diminuição da expressão de IFN- γ , RANK e RANKL no 21^o dia, e um aumento significativo de TNF- α , no mesmo período.

Quando comparamos os grupos I e II, observamos que IFN- γ , RANK, RANKL e IL-10 apresentaram expressão aumentada no grupo II infectado, no 14^o dia, quando comparado ao grupo I, no mesmo período. A IL-17A também teve sua expressão aumentada no 21^o dia, no grupo I, quando comparada com o grupo II, no mesmo período. Quando comparamos a IL-4 entre os grupos, observamos um aumento significativo da sua expressão no grupo não infectado (controle) dos animais C57BL/6 (grupo I), no 14^o dia, em relação aos animais IL-17RA KO (grupo II), no mesmo período de tempo. O TGF- β apresentou expressão aumentada no grupo I infectado, no 14^o dia, quando comparado ao grupo II, no mesmo período de tempo e condições.





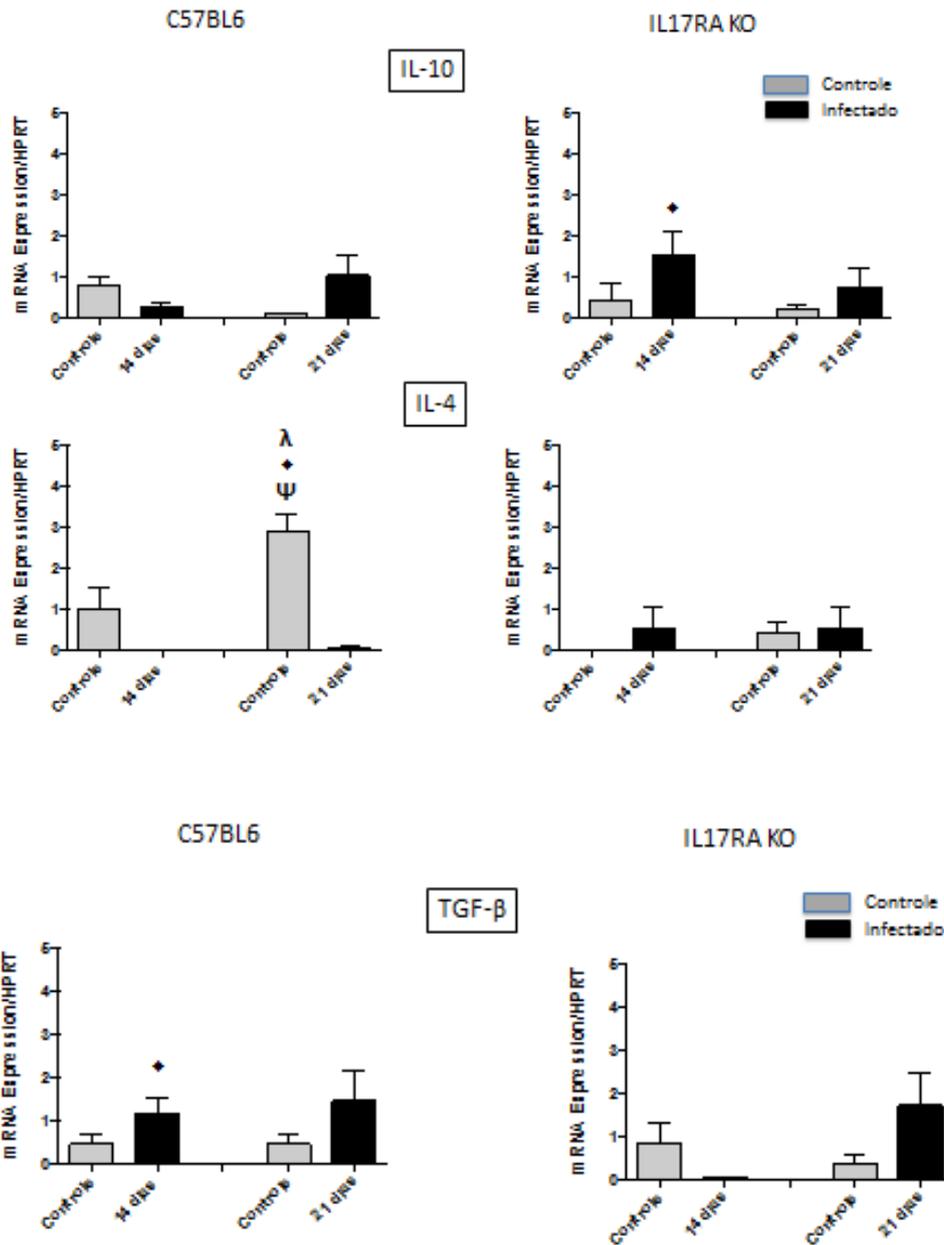


FIGURA 7 – Expressão do mRNA das citocinas IL-1 β , TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-17A, RANK, RANKL, TGF- β , IL-10 e IL-4 nos tecidos periapicais de camundongos C57BL/6 e IL-17RA KO com infecção endodôntica experimental, utilizando-se qPCR. A expressão relativa dos níveis de mRNA foi quantificada pela comparação com o gene constitutivo HPRT. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão para 2 experimentos independentes, em duplicata. **Teste T-pareado:** Ψ = Não infectado (controle) X Infectado; λ = Não infectado (controle) 14 dias X Não infectado (controle) 21 dias; π = Infectado 14 dias X Infectado 21 dias; **Teste de Wilcoxon:** \diamond = C57BL/6 X IL17RA KO (respectivamente) - $p < 0,05$.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A associação entre patologias orais, como a doença periodontal e a artrite reumatóide vem sendo estudada há tempos, mas dados conflitantes na literatura dificultam uma melhor compreensão dessa relação (Bartold *et al.*, 2005; Golub *et al.*, 2006; de Pablo *et al.*, 2009). A associação da AR com o desenvolvimento de lesões perirradiculares parece ser um capítulo recente na literatura científica.

O objetivo deste estudo foi avaliar o papel da IL-17 na patogênese das lesões perirradiculares. Selecionamos três modelos animais: um em que os efeitos da IL-17 seriam “minimizados” (camundongos IL-17RA KO); outro em que sua expressão estivesse elevada (AIA), uma vez que na AR ocorre uma alta expressão desta citocina (Shen *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2013); e outro em que sua expressão não sofresse alterações (camundongos C57BL/6). Nesses modelos, induziram-se lesões perirradiculares nos molares, seguindo-se de análises histológicas das articulações dos animais, bem como avaliação da expressão gênica de citocinas nos dentes e tecidos perirradiculares.

Observaram-se que o modelo experimental de AIA crônica conseguiu ser estabelecido nas duas linhagens animais estudadas (IL-17RA KO e C57BL/6). Tais achados são corroborados por aqueles de Brackertz e colaboradores (1977) que relataram a susceptibilidade de camundongos C57BL/6 e Balb/c à AIA. Da mesma maneira, Doodes e colaboradores (2008) relataram que o aparecimento e a gravidade da doença foram semelhantes em camundongos selvagens e IL-17^{-/-} (Balb/c *background*) em artrite induzida por proteoglicanos (PGIA). Esses autores sugeriram que a IL-17 não é absolutamente necessária para a artrite autoimune e que a produção de outros mediadores pró-inflamatórios é suficiente para compensar a perda de IL-17 em PGIA (Doodes *et al.*, 2008), tal qual nossos resultados sugerem.

Nos animais C57BL/6 observaram-se diferença estatística entre os infectados e não infectados, nos tempos analisados, quanto à articulação com indução de AR (AIA) e a articulação controle. O mesmo pode ser relatado para os animais IL-17RA KO, onde somente no grupo dos não infectados, no 14^o dia, não observaram-se diferença entre AIA e controle. Mas, quando comparados os animais C57BL/6 e IL-17RA KO infectados, observaram-se estatisticamente um escore articular maior nos

animais selvagens que nos nocautes. Por sua vez, Nakae e colaboradores (2003) relataram que a indução de artrite induzida por colágeno (CIA) é marcadamente suprimida em camundongos IL-17^{-/-}. Da mesma maneira, Park e colaboradores (2012) observaram que o bloqueio da IL-17 suprime a destruição articular e a inflamação na CIA. Em 2006, Röhn e colaboradores observaram incidência, gravidade reduzida e progressão lenta da doença após indução da CIA em camundongos imunizados com anticorpos anti-IL-17.

Lesões periapicais são doenças inflamatórias osteolíticas comuns em resposta às infecções microbianas presentes no SCR (Yang *et al.*, 2014). A maioria dos efeitos patogênicos microbianos sobre os tecidos periapicais opera via citocinas (Silva *et al.*, 2007). Diversas pesquisas vêm sendo realizadas para identificar os mediadores inflamatórios envolvidos na atividade de reabsorção óssea, permitindo melhor compreensão da etiopatogenia das periapicopatias (Stashenko *et al.*, 1987; Kawashima *et al.*, 1999; Vernal *et al.*, 2006; Fukada *et al.*, 2009; Brito *et al.*, 2012; Ferreira *et al.*, 2015; Bampirra *et al.*, 2015). Estudos anteriores demonstraram que o balanço entre mediadores pró e anti-inflamatórios determina a estabilidade ou progressão das lesões periapicais através da modulação de fatores osteoclastogênicos como RANKL e OPG (Menezes *et al.*, 2008; Garlet *et al.*, 2010a). Contudo, a rede de citocinas que opera no desenvolvimento das periapicopatias é mais complexa do que a dicotomia Th1/Th2 sugere, sendo sua patogênese influenciada por outros tipos e classes de mediadores (Garlet *et al.*, 2010a, Graves *et al.*, 2011; Araújo-Pires *et al.*, 2014). Além dessa dicotomia, as células Th17 emergem, tendo as mesmas propriedades pró-inflamatórias que envolvem uma série de infecções, doenças autoimunes e processos osteolíticos. Se por um lado as citocinas do tipo Th17 podem estimular a produção de outras citocinas com propriedades osteoclastogênicas (Takayanagi, 2012), por outro, as células Treg apresentam efeito supressivo na osteólise mediada por TGF- β e IL-10 (Garlet *et al.*, 2010b).

Neste estudo, observaram-se que nos animais do grupo I (C57BL/6) os níveis de expressão gênica da IL-17A foram estatisticamente significantes, tanto no 14^o quanto no 21^o dia pós-infecção endodôntica. De maneira inversa, os níveis de expressão gênica da IL-6 foram significativamente reduzidos nos dois momentos. Estes resultados se correlacionam ao fato de que baixos níveis de IL-6 estimulariam a diferenciação de células Th17 (Zhou *et al.*, 2009). Ademais, a IL-6 é uma citocina

que estimula a formação de precursores dos osteoclastos e aumenta o número de osteoclastos, levando a um aumento na reabsorção óssea, indiretamente pelo aumento da produção de RANKL pelos osteoblastos (Balto *et al.*, 2001; Taki *et al.*, 2007; Prso *et al.*, 2007), fato este não observado neste estudo. Contudo, a IL-6 exerce também efeitos anti-osteoclastogênicos sobre precursores dos osteoclastos (Taki *et al.*, 2007). De maneira interessante, relata-se que a IL-6 estaria envolvida na produção de receptores antagonistas para IL-1 (Tilg *et al.*, 1994) e, corroborando tal fato, os baixos níveis desta citocina são paralelos à elevada expressão da IL-1 β observada no 21^o dia. Ainda de importância neste grupo (C57BL/6), vê-se que os elevados níveis de expressão da IL-17A no 21^o dia correlacionam-se a baixa expressão significativa de RANK e RANKL, no mesmo período. Contrariamente, relata-se que a IL-17 é uma citocina indutora da produção de RANKL (Kotake *et al.*, 1999; Sato *et al.*, 2006). Acredita-se que na presença de um estímulo inflamatório, a expressão de RANKL aumenta nos tecidos periapicais, estimulando a atividade dos osteoclastos e a reabsorção óssea patológica (Kawashima *et al.*, 2007; Menezes *et al.*, 2008; Graves *et al.*, 2011). Por sua vez, citocinas como IL-6 e TNF- α aumentam a expressão de RANKL (Beklen *et al.*, 2007) e, neste estudo, ambas se encontram reduzidas ou em nível basal, respectivamente. Neste grupo, observaram-se uma correlação direta entre os elevados níveis de IL-17A e IL-1 β , no 21^o dia. Tal fato se correlaciona à diferenciação e expansão das células T produtoras de IL-17 induzidas pela IL-1 (Leavy, 2006). Finalmente, a reduzida e elevada expressão gênica da IL-17A nos grupos controle e infectado no 21^o dia, respectivamente, se correlacionam à expressão inversa da IL-4 nos mesmos grupos, sugerindo que a IL-4 é a responsável pela modulação da IL-17A observada aqui. O papel da IL-4 na modulação de citocinas pró-inflamatórias não foi, contudo, demonstrado por outros autores (Sasaki *et al.*, 2000; De Rossi *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2012). Entretanto, tais autores não avaliaram a expressão da IL-17 naqueles estudos. Por sua vez, observaram-se uma expressão gênica basal nos níveis de mRNA das citocinas TNF- α , IFN- γ , TGF- β e IL-10, no 14^o e 21^o dias, no grupo I ($p > 0,05$). Contrariamente, estudos demonstraram uma expressão aumentada das citocinas TNF- α e IFN- γ nas lesões perirradiculares (Silva *et al.*, 2005; De Sá *et al.*, 2007; Kawashima *et al.*, 2007; Teixeira-Salum *et al.*, 2010; Araújo-Pires *et al.*, 2014), bem como das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β (Sasaki *et al.*, 2000; De Rossi *et al.*, 2008; Maciel *et al.*, 2012). É interessante observar que os níveis basais de IFN- γ , TGF- β e IL-10 nos

camundongos C57BL/6 sinalizam a interferência das células Th17 na dicotomia Th1/Th2.

No grupo II (IL-17RA KO), os níveis da IL-17A foram basais em ambos os grupos, controle e experimental, em ambos os tempos (14^o e 21^o dias). Tal qual observado no grupo I (C57BL/6), os níveis de IL-6 encontravam-se estatisticamente diminuídos no grupo infectado em relação ao controle, nos dois períodos avaliados. Por sua vez, os níveis basais da IL-17A correlacionam-se a níveis significativamente elevados de RANK e RANKL no grupo infectado em relação ao controle no 14^o dia, de maneira oposta ao observado no grupo I, onde os níveis de IL-17A se encontravam elevados e aqueles de RANK e RANKL eram expressos de forma basal. A maior expressão de RANK e RANKL observada no 14^o dia parece estar de acordo com os estudos de Kawashima e colaboradores (2007) e Menezes e colaboradores (2008) que relataram que a expressão aumentada dessas citocinas está relacionada aos estágios iniciais de expansão da lesão periapical. Sabe-se que o IFN- γ promove a diferenciação das células T CD4⁺ *naives* (virgens) em uma subpopulação Th1 e inibe a proliferação das células Th2, sendo a principal citocina efetora da resposta Th1 (Mosmann *et al.*, 1986). Os níveis basais de IL-17A nos animais do grupo II correlacionam-se a uma expressão significativamente aumentada de IFN- γ no 14^o dia, nos animais infectados em relação ao controle, que pode estar induzindo uma maior expressão de IL-1 β e TNF- α no 21^o dia. Ademais, os camundongos IL-17RA KO exibem um aumento significativo de neutrófilos e macrófagos comparados aos camundongos selvagens (AISHwaimi *et al.*, 2013). A cinética destas células nos camundongos IL-17RA KO leva a uma falha na resolução da inflamação (Anders & Ryu, 2011). Este maior número de macrófagos e neutrófilos, que são a principal fonte de produção de IL-1 e TNF- α , pode ser também o responsável pelos resultados observados neste grupo. Nos animais IL-17RA KO, os níveis basais de expressão da IL-17A correlacionam-se a níveis basais de expressão das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- β . Tais achados podem se dever a regulação cruzada Th1/Th2 (Mosmann *et al.*, 1986) na qual os elevados índices de expressão de IL-1 β e TNF- α no 21^o dia possam estar inibindo a expressão das citocinas regulatórias. Por sua vez, os níveis basais de IL-4 observados neste grupo, podem se relacionar à maior expressão de IFN- γ , no 14^o e 21^o dias, tal qual demonstrado por Čolíc e colaboradores (2006).

Ao se comparar os grupos I (C57BL/6) e II (IL-17RA KO) observaram-se que a expressão gênica da IL-17A encontra-se estatisticamente aumentada nos animais infectados do grupo I, em relação aos mesmos animais do grupo II, no 21º dia. Observa-se também uma expressão significativa de TGF- β no 14º dia, no grupo I em relação ao grupo II. Por sua vez, as citocinas IFN- γ , RANK, RANKL e IL-10 encontravam-se aumentadas nos animais infectados nocautes, no 14º dia, em relação ao mesmo período, nos animais C57BL/6. Tal fenômeno talvez se relacione à redundância das citocinas, em que uma menor expressão da IL-17A nos animais IL-17RA KO seja compensada pela expressão de uma rede de outras citocinas (Prlic & Bevan, 2006).

O presente estudo evidencia a complexidade dos mecanismos envolvidos na imunopatogênese das periapicopatias. Uma variedade de respostas imunes ocorre nos tecidos periapicais, o que leva ao estabelecimento de diferentes interações celulares e liberação de mediadores simultaneamente. Avaliou-se aqui o papel da IL-17 em três condições distintas, quais sejam: naquela em que sua expressão ocorreu de maneira normal (camundongos C57BL/6), quando diminuída (camundongos IL-17RA KO) e sobreumentada (camundongos em que se induziu um modelo de artrite – AIA). A análise histológica das articulações demonstrou um maior escore de destruição articular nos animais C57BL/6. Por sua vez, ao se avaliar a expressão gênica das citocinas, observou-se que a infecção endodôntica interfere nessa expressão, seja nos animais C57BL/6 ou naqueles IL17RA KO, mas de maneira IL-17 dependente. Para se concluir de maneira mais aprofundada o papel da IL-17 nas lesões de origem endodôntica, nos resta finalizar as dosagens da expressão de mRNA das mesmas citocinas aqui avaliadas, nos animais AIA, onde a IL-17 encontra-se em níveis elevados.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

Podemos concluir que o modelo experimental de AIA crônica pode ser estabelecido nas duas linhagens animais estudadas (IL-17RA KO e C57BL/6), evidenciando-se que a IL-17 não é absolutamente necessária para a artrite autoimune e que a produção de outros mediadores pró-inflamatórios é suficiente para compensar a perda de IL-17. Entretanto, não se observou influência da lesão periapical no desenvolvimento e manutenção da AR, o que pode estar relacionado ao período de indução da patologia oral, uma vez que a AIA já havia sido estabelecida. Este resultado nos sugere que novos estudos devem ser realizados com inversão dos períodos de indução das patologias, a fim de se avaliar se há influência da lesão periapical na indução da AR.

Em relação à expressão gênica das citocinas observou-se que a infecção endodôntica interfere nessa expressão, seja nos animais C57BL/6 ou naqueles IL-17RA KO, mas de maneira IL-17 dependente, sugerindo uma possível participação da IL-4 na sua regulação. Além disso, a interferência das células Th17 na dicotomia Th1/Th2, ficou evidente. Entretanto, posteriormente, as dosagens da expressão de mRNA das citocinas aqui avaliadas, nos animais AIA, onde a IL-17 encontra-se em níveis elevados, nos permitirão concluir de maneira mais aprofundada sobre o papel da IL-17 nas patologias de origem endodôntica.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar a dosagem das mesmas citocinas aqui citadas, em camundongos C57BL/6 e IL-17RA KO submetidos ao modelo experimental de AIA;
- Realizar a análise das lesões perirradiculares por microtomografia computadorizada de todos os grupos, a fim de se compreender melhor a imunopatogênese da reabsorção óssea na infecção endodôntica em perfis imunes distintos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. *Imunologia Celular e Molecular*, 7^a edição. Editora Elsevier Ltda; Rio de Janeiro, 560 p., 2012.
2. Albandar, J.M.; Rams, T.E. Global epidemiology of periodontal diseases: an overview. *Periodontology* 2000, v.29, p.7–10, 2002.
3. AlShwaimi, E.; Berggreen, E.; Furusho, H.; Rossall, J.C.; Dobeck, J.; Yoganathan, S.; Stashenko, P.; Sasaki, H. IL-17 Receptor A Signaling Is Protective In Infection-Stimulated Periapical Bone Destruction. *Immunol*, v.191, n.4, p.1785–1791, 2013.
4. Anders, H.J.; Ryu, M. Renal microenvironments and macrophage phenotypes determine progression or resolution of renal inflammation and fibrosis. *Kidney Int.*, v.80; p.915-925, 2011.
5. Araújo-Pires, A.C.; Francisconi, C.F.; Bigueti, C.C.; Cavalla, F.; Aranha, A.M.F.; Letra, A.; Trombone, A.P.F.; Faveri, M.; Silva, R.M.; Garlet, G.P. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci*, v.22, n.4, p.336-46, 2014.
6. Arend, W.P.; Dayer, J.M. Cytokines and cytokine or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v.33, p.305-15, 1990.
7. Artese, L.; Piattelli, A.; Quaranta, M.; Colasante, A.; Musani, P. Immunoreactivity for interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod*, v.17, n.10, p.483-481, 1991.

8. Balto, K.; Sasaki, H.; Stashenko, P. Interleukin-6 deficiency increase inflammatory bone destruction. *Infect Immun*, v.69, p.744–50, 2001.
9. Balto, K; White, R; Mueller, R.; Stashenko, P. A mouse model of inflammatory root resorption induced by pulpal infection. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v.93, p.461-8, 2002.
10. Bambirra, W.Jr.; Maciel, K.F.; Thebit, M.M.; de Brito, L.C.; Vieira, L.Q; Sobrinho, A.P. Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection. *J Endod*, v.41,n.7, p.1085-90, Jul 2015.
11. Bartold, P.M.; Marshall, R.I.; Haynes, D.R. Periodontitis and rheumatoid arthritis: a review. *J Periodontol*, v.76, p.2066-74, 2005.
12. Bartold, P.M., Marino, V., Cantley, M. & Haynes, D.R. Effect of *Porphyromonas gingivalis*-induced inflammation on the development of rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Periodontology*, v.37, p.405-411, 2010.
13. Beklen, A.; Ainola, M.; Hukkanen, M.; Gurgan, C.; Sorsa, T.; Konttinen, Y.T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J Dent Res*, v.86, p.347–351, 2007.
14. Bingham, C.O. The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation. *J Rheumatol*, v.65, p.3-9, 2002.
15. Birkedal-Hansen, H. Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *J Periodontal Res*, v.28, p.500-10, 1993.
16. Brackertz, D.; Mitchell, G.F.; Mackay, I.R. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*, v.20, n.3, p.841-50, 1977.

17. Brennan, F. M.; Chantry, D.; Jackson, A.; Maini, R.; Feldmann, M. Inhibitory effect of TNF-alpha antibodies on synovial cell interleukin-1 production in rheumatoid arthritis. *Lancet*, v.2, p.244-247, 1989.
18. Brito, L.C.N.; Fonseca Teles, F.R.; Teles, R.P.; Totola, A.H.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A.P. T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. *Journal of Endodontics*, v.38, p.481-485, 2012.
19. Burska, A.; Boissinot, M.; Ponchel, F. Cytokines as Biomarkers in Rheumatoid Arthritis. *Mediators of Inflammation*, 2014.
20. Cantley, M.; Smith, M. & Haynes, D.R. Pathogenic bone loss in rheumatoid arthritis: mechanisms and therapeutic approaches. *International Journal of Clinical Rheumatology*, v.4, p.561–582, 2009.
21. Cardoso, C.R.; Garlet, G.P.; Crippa, G.E.; Rosa, A.L.; Martins, W. Jr.; Rossi, M.A.; Silva, J.S. Evidence of the presence of T helper type 17 cells in chronic lesions of human periodontal disease. *Oral Microbiol Immunol*, v.24, p.1-6, 2009.
22. Chu, C.Q.; Field, M.; Feldmann, M.; Maini, R.N. Localization of tumor-necrosis factor-alpha in synovial tissues and at the cartilage-pannus junction in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v.34, p.1125-1132, 1991.
23. Čolčić, M.; Lukic, A.; Vučević, D.; Milosavljevic, I.; Majstorovic, I.; Dimitrijevic, J. Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their *in vitro* production of Th1 and Th2 cytokines. *Arch Oral Biol*, v. 51, p.1120-1130, 2006.
24. Čolčić, M.; Vasilijic, S.; Gazivoda, D.; Vučević, D.; Marjanovic, M.; Lukic, A. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci*, v.115, p.315–320, 2007.

25. Čolíc, M.; Gazivoda, D.; Vučević, D.; Sasa, V.; Rudolf, R.; Lukic, A. proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology*, v.47, p.101-13, 2009.
26. Čolíc, M.; Gazivoda, D.; Vasilijic, S.; Vučević, D.; Luki, A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v.39, p.690-6, 2010.
27. Crotti, T.; Smith, M.D.; Hirsch, R. S.; Soukoulis, S.; Weedon, H.; Capone, M.; Ahern, M. J. & Haynes, D. R. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, v.38, p.380–387, 2003.
28. Cruz, A.; Khader, S.A.; Torrado, E.; Fraga, A.; Pearl, J.E.; Pedrosa, J.; Cooper, A.M.; Castro, A.G. Cutting edge: IFN- γ regulates the induction and expansion of IL-17-producing CD4 T cells during mycobacterial infection. *J Immunol*, v.177, p.1416–1420, 2006.
29. Culshaw, S.; McInnes, I.B.; Liew, F.Y. What can the periodontal community learn from the pathophysiology of rheumatoid arthritis? *J Clin Periodontol*, v. 38, p.106-113, 2011.
30. Dale, B.A.; Krisanaprakornkit, S. Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med*, v.30, p.321-27, 2001.
31. de Pablo, P., Chapple, I.L.C., Buckley, C.D. & Dietrich, T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nature Reviews Rheumatology*, v.5, p.218-224, 2009.
32. De Rossi, A.; Rocha, L.B.; Rossi, M.A. Interferon-gamma, Interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not Interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod*, v.34, p.31-34, 2008.

33. De Sá, A.R.; Moreira P.R.; Xavier G.M.; Sampaio I.; Kalapothakis E; Dutra W.O.; Gomes R.S. Association of CD14, IL1 β , IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms wit symptomatic dental abscesses. *Int Endod J*, v.40, p.563-572, 2007.
34. De Waal, R.M.; Haanen, J.; Spits, H.; Roncarolo, M.G.; Te Velde, A.; Figdor, C.; Johnson, K.; Kastelein, R.; Yssel, H.; De Vries, J.E. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *JEM*, v.174, n.4, p.915-924, October 1991.
35. Dinarello, C.A. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood*, v.87, p.2095-2147, 1996.
36. Diveu, C.; McGeachy, M.J.; Cua, D.J. Cytokines that regulate autoimmunity. *Curr Opin Immunol*, v.20, n.6, p.663-668, Dec. 2008.
37. Doodes, P.D.; Cao, Y.; Hamel, K.M.; Wang, Y.; Farkas, B.; Iwakura, Y.; Finnegan, A. Development of Proteoglycan-Induced Arthritis Is Independent of IL-17. *The Journal of Immunology*, v.181, p.329–337, 2008.
38. Farquharson, D.; Butcher, J.P. and Culshaw, S. Periodontitis, *Porphyromonas*, and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nature*, v.5, n.2, 2012.
39. Ferreira, S.B.P.; Brito, L.C.N.; Oliveira, M.P.; Maciel, K.F.; Marelli Junior, H.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A.P. Periapical Cytokine Expression in Sickle Cell Disease. *Journal of Endodontics*, p.358-362, 2015.
40. Fiorentino, D. F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T.R, Howard, M.; O'Garra, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *Journal of Immunology*, v.147, n.11, p.3815-3822, 1991.

41. Firestein, G.S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis. *Nature*, v.61, p.423:356, 2003.
42. Firestein, G.S. Immunologic mechanisms in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Journal of Clinical Rheumatology*, v.11, S39-S44, 2005.
43. Fujisaki, K.; Tanabe N.; Suzuki, N.; Kawato, T.; Takeichi, O.; Tsuzukibashi, O.; Makimura, M.; Ito, K.; Maeno, M. Receptor activator of NF- K B ligand induces the expression of carbonic anhydrase II, cathepsin K, and matrix metalloproteinase-9 in osteoclast precursor RAW264.7 cells. *Life Sci*, v.80, p.1311-1318, 2007.
44. Fukada, S.Y.; Silva, T.A.; Garlet, G.P.; Rosa, A.L.; Da Silva, J.S.; Cunha, F.Q. Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiology and Immunology*, v.24, p.25-31, 2009.
45. Gabriel, S.E. The epidemiology of rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, v.27, p.269-282, 2001.
46. Garlet, G.P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research*, v. 89, p.1349-63, 2010a.
47. Garlet, G.P.; Cardoso, C.R.; Mariano, F.S.; Claudino, M.; Assis, G.F.; Campanelli, A.P.; Avila-Campos, M.J.; Silva, J.S. Regulatory T cells attenuate experimental periodontitis progression in mice. *J Clin Periodontol*, v.37, n.7, p.591-600, 2010b.
48. Gaffen, S.L. Interleukin-17: a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. *Arth Res Ther*, v.6, p.240-247, 2004.
49. Golub, L.M.; Payne, J.B.; Reinhardt, R.A.; Nieman, G. Can systemic diseases co-induce (not just exacerbate) periodontitis? A hypothetical “two-hit” model. *J Dent Res*, v.85, p.102–105, 2006.

50. Graves, D.T.; Oates, T.; Garlet, G.P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology*, v.17, p.5304-19, 2011.
51. Grimbacher, B.; Aicher, W.K; Peter, H.H.; Eibel, H. TNF-alpha induces the transcription factor Egr-1, proinflammatory cytokines and cell proliferation in human skin fibroblasts and synovial lining cells. *Rheumatol. Int.*, v.17, p.189-192, 1998.
52. Gu, C.; Wu, L.; Li, X. IL-17 family: Cytokines, receptors and signaling. *Cytokine*, v.64, p.477-485, 2013.
53. Guglani, L.; Khader, S. TH17 cytokines in mucosal immunity and inflammation. *Curr Opin HIV AIDS*, v.5, n.2, p.120-127, 2010.
54. Haynes, D.R.; Barg, E.; Crotti, T. N.; Holding, C.; Weedon, H.; Atkins, G. J.; Zannettino, A.; Ahern, M. J.; Coleman, M.; Roberts-Thomson, P. J.; Kraan, M.; Tak, P. P. & Smith, M. D. Osteoprotegerin expression in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis, spondyloarthropathies and osteoarthritis and normal controls. *Rheumatology*, v.42, p.123-134, 2003.
55. Henriques, L.C.F.; de Brito, L.C.N.; Tavares, W.L.F.T.; Vieira, L.Q.; Sobrinho, A.P.R. Cytokine Analysis in Lesions Refractory to Endodontic Treatment. *J Endod*, v.37, n.12, December 2011.
56. Hou, L.; Sasaki, H.; Stashenko, P. B-cell deficiency predisposes mice to disseminating anaerobic infections: protection by passive antibody transfer. *Infect Immun*, v.68, p.5645-51, 2000.
57. Johnson, R.B.; Wood, N.; Serio, F.G. Interleukin-11 and IL-17 and the pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol*, v.75, p.37-43, 2004.
58. Jontell, M.; Okiji, T.; Dahlgren, U.; Bergenholtz, G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.9, n.2, p.179-200, 1998.

59. Kawashima, N.; Okiji, T.; Kosaka, T.; Suda, H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod*, v.22, n.6, p.311-316, 1996.
60. Kawashima, N.; Stashenko, P. Expression of bone resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*, v.44, p.55-66, 1999.
61. Kawashima, N.; Suzuki, N.; Ohi, C.; Okuhara, S.; Nakano-Kawanishi, H.; Suda, H. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics*, v.103, p.707-11, 2007.
62. Kehrl, J.H.; Roberts, A.B.; Wakefield, L.M.; Jakowlew, S.; Sporn, M.B.; Fauci, A.S. Transforming growth factor beta is an important immunomodulatory protein for human B lymphocytes. *J Immunol*, v.15; p.3855-60, Dec 1986.
63. Kettering, J.D.; Torabinejad, M. Investigation of mutagenicity of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *Journal of Endodontics*, v.21, n.11, p.537-539, 1995.
64. Khosla, S. Minireview: The OPG/RANKL/RANK System. *Endocrinology*, v.142, p.5050-5, 2001.
65. Kinloch, A.; Lundberg, K.; Wait, R.; Wegner, N.; Lim, N.H.; Zendman, A.J.; Saxne, T.; Malmström, V.; Venables, P.J. Synovial fluid is a site of citrullination of autoantigens in inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, v.58, p.2287-95, 2008.
66. Kong, Y-Y.; Yoshida, H.; Sarosi, I.; Tan, H.L.; Timms, E.; Capparelli, C.; Morony, S.; Oliveira-Dos-Santos, A.J.; Van, G.; Itie, A.; Khoo, W.; Wakeham, A.; Dunstan, C.R.; Lacey, D.L.; Mak, T.W.; Boyle, W.J.; Penninger, J.M. OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, v.397, p.315–323, 1999.

67. Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M.; Kuchroo, V.K. IL-17 and Th17 cells. *Annu Rev Immunol*, v.27, p.485–517, 2009.
68. Kornman, K.S.; Page, R.C.; Tonetti, M.S. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontology 2000*, v.14, p.33-53, 1997.
69. Kotake, S.; Udagawa, N.; Takahashi, N.; Matsuzaki, K.; Itoh, K.; Ishiyama, S.; Saito, S.; Inoue, K.; Kamatani, N.; Gillespie, M.T.; Martin, T.J.; Suda, T. IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. *J Clin Invest*, v.103, p.1345-1352, 1999.
70. Kramer, J.M.; Gaffen, S.L. Interleukin-17: a new paradigm in inflammation, autoimmunity and therapy. *J Periodontol*, v.78, p.1083–1093, 2007.
71. Lacey, D.L.; Timms, E.; Tan, H-L; Kelly, M.J.; Dunstan, C.R.; Burgess, T.; Elliott, R.; Colombero, A.; Elliott, G.; Scully, S.; Hsu, H.; Sullivan, J.; Hawkins, N.; Davy, F.; Capparelli, C.; Eli, A.; Qian, Y.X.; Kaufman, S.; Sarosi, I.; Shalhoub, V.; Senaldi, G.; Guo, J.; Delaney, J.; Boyle, W.J. Osteoprotegerin (OPG) ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, v.93, p.165–176, 1998.
72. Lang, N.P.; Tonetti, M.S.; Suter, J.; Sorrell, J.; Dulf, G.W.; Kornman K.S. Effect of interleukin-1 gene polymorphisms on gingival inflammation assessed by bleeding on probing in a periodontal maintenance population. *J Periodontal Res*, v.35, p.102-7, 2000.
73. Leavy, O. Involvement of IL-1 in IL-17 production. *Nature Reviews Immunology*, v.6, p.568-569, 2006.

74. Maciel, K.F.; Neves de Brito, L.C.; Tavares, W.L.F.; Moreira, G.; Nicoli, J.R.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A.P. Cytokine expression in response to root canalinfection in gnotobiotic mice. *Int Endod J.*, v. 45, n.4, p.354-62, 2012.
75. Manetti, R.; Parronchi, P.; Giudizi, M.G.; Piccinni, M.P.; Maggi E.; Trinchieri, G. Natural killer cell stimulatory factor interleukin-12 (IL-12) induces T helper type 1 (Th1) - specific immune responses and inhibits the development of IL-4 producing Th cells. *J Exp Med*, v.177, p.1199-1204, 1993.
76. Mak, W.T.; Penninger, J.M.; Ohashi, P.S. Knockout mice: a paradigm shift in modern immunology. *Nat Rev Immunol*, v.1, p.11-19, 2001.
77. Maltos, K.L.; Menezes, G.B.; Caliari, M.V.; Rocha, O.A.; Santos, J.M.; Alves, D.L.; Duarte, I.D.; Francischi, J.N. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. *Arch Oral Biol*, v.49, n.6, p.443-50, Jun. 2004.
78. Marcato, L.G.; Ferlini, A.P.; Freire Bonfim; R.C.; Ramos-Jorge, M.L.; Ropert, C.; Afonso, L.F.C.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A.P. The role of toll-like receptors 2 and 4 on reactive oxygen species and nitric oxide production by macrophage cells stimulated with root canal pathogens. *Oral Microbiol Immunol*, v.23, p.1- 8, 2008.
79. Marçal, J.R.; Samuel, R.O.; Fernandes, D.; de Araujo, M.S.; Napimoga, M.H.; Pereira, S.A.; Clemente-Napimoga, J.T.; Alves, P.M.; Mattar, R.; Rodrigues, V. Jr.; Rodrigues, D.B. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod*, v.36, p.995–999, 2010.
80. McGeachy, M.J.; Cua, D.J. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity*, v.28, n.4, p.445-453, April 2008.
81. Menezes, R.; Garlet, T.P.; Letra, A.; Bramante, C.M.; Campanelli, A.P.; Figueira, R de C.; Sogayar, M.C.; Granjeiro, J.M.; Garlet, G.P. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in

human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of lesions. *Journal of Endodontics*, v.34, p.932-8, 2008.

82. Metzger, Z. Macrophages in periapical lesions. *Traumatol*, 2000, v.16, p.1-8, 2000.

83. Mikuls, T. R.; Payne, J.B.; Reinhardt, R.A.; Thiele, G.M.; Maziarz, E.; Cannella, A.C.; Holers, V.M.; Kuhn, K.A.; O'Dell, J.R. Antibody responses to *Porphyromonas gingivalis* in subjects with rheumatoid arthritis and periodontitis. *Int. Immunopharmacol*, v.9, p.38-42, 2009.

84. Moore, K.W.; O'garra, A.; De Waal, M.R.; Vieira, P.; Mosmann, T.R. Interleukin-10. *Annu Rev Immunol*, v.11, p.165-190, 1993.

85. Mosmann, T.R.; Cherwinski, H.; Bond, M.W.; Giedlin, M.A.; Coffman, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, v.136, p.2348–2357, 1986.

86. Mosmann, T. R.; Coffman, R.L. *Ann. Rev.* Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Immunol*, v.7; p.145-73, 1989.

87. Mosmann, T.R. Properties and functions of Interleukin-10. *Adv Immunol*, v.56, p.1-26, 1994.

88. Nakae, S.; Nambu, A.; Sudo, K.; Iwakura, Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol*, v.171, p.6173-6177, 2003.

89. Neovius, M.; Simard, J.F.; Askling, J.; ARTIS Study Group. How large are the productivity losses in contemporary patients with RA, and how soon in relation to diagnosis do they develop? *Ann. Rheum. Dis.*, v.70, p.1010-1015, 2011.

90. Nicolas, D.; Matthias B. Interleukin-1 β and Interleukin-18: regulation and activity in local inflammation. *Periodontol*, 2000, v.35, p.42-50, 2004.
91. Ohyama, H.; Kato-Kogoe, N.; Kuhara, A.; Nishimura, F.; Nakasho, K.; Yamanegi, K.; Yamada, N.; Hata, M.; Yamane, J.; Terada, N. The involvement of IL-23 and the Th17 pathway in periodontitis. *J Dent Res*, v.88, p.633-638, 2009.
92. Oseko, F.; Yamamoto, T.; Akamatsu, Y.; Kanamura, N.; Iwakura, Y.; Imanishi, J.; Kita, M. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiol Immunol*, v.53, p.287-294, 2009.
93. Ouyang, W.; Kolls, J.K.; Zheng, Y. The biological functions of T helper 17 effector cytokines in inflammation. *Immunity*, v.28, p.454–467, 2008.
94. Overbergh, L.; Giulietti A.; Valckx D.; Decallonne, B.; Bouillon, R.; Mathieu, C. The use of Real-time Reverse Transcriptase PCR for the quantification of cytokine gene expression. *J Biomol Tech*, v.14, p.33-41, 2003.
95. Park, M-J.; Park, H-S.; Oh, H-J.; Lim, J-Y.; Yoon, B-Y.; Kim, H-Y.; Cho, M-L.; Cho, S-G. IL-17-deficiente allogeneic bone marrow transplantation prevents the induction of collagen-induced arthritis in DBA/1J mice. *Experimental and molecular medicine*, v.44, n.11, p.694-705, 2012.
96. Persson, G.R. Rheumatoid arthritis and periodontitis - inflammatory and infectious connections. Review of the literature. *Journal of Oral Microbiology*, v.4, p.118-129, 2012.
97. Prlic, M.; Bevan, M.J. An Antibody Paradox, Resolved. *Science*,v.311, n. 5769, p.1875-1876, 2006.

98. Prso, I.B.; Kocjan, W.; Simic, H.; Brumini, G.; Pezelj-Ribarić, S.; Borčić, J.; Ferreri, S.; Karlović, I.M. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in human periapical lesions. *Mediators of Inflammation*, Article ID 38210, 2007.
99. Queiroz-Junior, C.M.; Silva, M.J.B.; Corrêa, J.D.; Madeira, M.F.; Garlet, T.P.; Garlet, G.P.; Cunha, F.Q.; Teixeira, M.M.; da Silva, T.A. A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. *Clinical and Developmental Immunology*, p.327-417, 2010.
100. Radics, T.; Kiss, C.; Tar, I.; Marton, I.J. Interleukin-6 and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in apical periodontitis: correlation with clinical and histologic findings of the involved teeth. *Oral Microbiol Immunol*, v.18, p. 9–13, 2003.
101. Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Melo Barros, M.H.; Faria L. M.; de Carvalho, M.A.R.; Nicoli J.R.; de Uzeda, M.; Vieira L.Q. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral microbiol Immunol*, v.17, p.344 - 53, 2002.
102. Röhn, T.A.; Jennings, G.T.; Hernandez, M.; Grest, P.; Beck, M.; Zou, Y.; Kopf, M.; Bachmann, M.F. Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, v.36, n.11, p.2857-67, 2006.
103. Rosenstein, E.D.; Greenwald, R.A.; Kushner, L.J.; Weissmann, G. Hypothesis: the humoral immune response to oral bacteria provides a stimulus for the development of rheumatoid arthritis. *Inflammation*, v.28, p.311–318, 2004.
104. Rouvier, E.; Luciani, M.F.; Mattei, M.G.; Denizot, F.; Golstein, P. CTLA-8, cloned from an activated T cell, bearing AU-rich messenger RNA instability sequences, and homologous to a herpesvirus saimiri gene. *J Immunol*, v.150, n.12, p.5445–56, 1993.

105. Sato, K.; Suematsu, A.; Okamoto, K.; Yamaguchi, A.; Morishita, Y.; Kadono, Y.; Tanaka, S.; Kodama, T.; Akira, S.; Iwakura, Y. Cua, D.J.; Takayanagi, H. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction. *J Exp Med*, 2006.
106. Sasaki, H.; Hou, L.; Belani, A.; Wang, C.Y.; Uchiyama, T.; Muller, R.; Stashenko, P. IL-10, but not IL-4, suppresses infection, stimulated bone resorption in vivo. *J Immunol*, v.165, p.3626-30, 2000.
107. Sasaki, H.; Balto, K.; Kawashima, N.; Eastcott, J.; Hoshino, K; Akira, S.; Stashenko, P. 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*, v.11, p.106-10, 2004.
108. Scott, D.L.; Wolfe, F.; Huizinga, T.W.J. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, v. 376, p.1094-1118, 2010.
109. Seymour, G.J.; Taylor, J.J. Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology 2000*, v.35, p.9-13, 2004.
110. Shen, H.; Goodall, J.C.; Hill Gaston, J.S. Frequency and phenotype of peripheral blood Th17 cells in ankylosing spondylitis and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, v. 60, n.6, p.1647-56, Jun 2009.
111. Silman, A.J.; Pearson, J.E. Epidemiology and genetics of rheumatoid arthritis. *Arthritis Research*, v.4 (Suppl. 3), p.S265–S272, 2002.
112. Silva, T.A., Garlet, G.P.; Lara, V.S.; Martins Jr., W.; Silva, J.S.; Cunha, F.Q. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *oral microbiology and immunology*, v.20, n.5, p.310-316, 2005.

113. Silva, T.A.; Garlet, G.P.; Fukada, S.Y.; Silva, J.S.; Cunha, F.Q. Chemokines in oral inflammatory diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. *J Dent Res*, v.86, n.4, p.306-319, 2007.
114. Silva, M.J.B.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v.105, p.e70-e76, 2008.
115. Smolen, J.S.; Steiner, G. Therapeutic strategies for rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Drug Discov*, v.2, p.473-488, 2003.
116. Stashenko, P.; Dewhirst, F.E.; Peros, W.J.; Kent, R.L.; Ago, J.M. Synergistic interactions between interleukin 1, tumor necrosis factor, and lymphotoxin in bone reabsorption. *J Immunol*. v.138, p.1464-1468, 1987.
117. Stashenko, P.; Wang, C.Y., Tani-Ishii, N.; Yu, S.M. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v.78, p.494-502, 1994.
118. Stashenko, P.; Teles R.; D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.9, p.498-521, 1998.
119. Stern, M.H.; Dreizen, S.; Mackler, B.F.; Selbst, A.G.; Levy, B.M. Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *J Endod*, v.7, n.3, p.117-122, 1981.
120. Sundqvist, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, v.78, n.4, p.522-530, Oct. 1994.
121. Sutter, V.L.; Barry, A.L.; Wilkins, T.D.; Zabransky, R.J. Collaborative Evaluation of a Proposed Reference Dilution Method of Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*, v.16, n.4, p.495-502, October 1979.

122. Takahashi, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J*, v.31, p.311-25, 1998.
123. Takahashi, K.; Azuma, T.; Motohira, H.; Kinane, D.F.; Kitetsu, S. The potential role of Interleukin-17 in the immunopathology of periodontal disease. *J Clin Periodontol*, v.32, p.369-4, 2005.
124. Takayanagi, H. New developments in osteoimmunology. *Nat Rev Rheumatol*, v.8; n.11, p.684-9, 2012.
125. Taki, N.; Tatro, J.M.; Lowe, R.; Goldberga, V.M.; Greenfield, E.M. Comparison of the roles of IL-1, IL-6, and TNF- α in cell culture and murine models of aseptic loosening. *Bone*, v.40, n.5; p.1276-1283, May 2007.
126. Tani-Ishi, N.; Wang C.Y.; Stashenko A. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*, v.10, p.213-19, 1995.
127. Tavares, W.L.F.; Brito, L.C.N.; Henriques, L.C.F.; Oliveira, R.R.; Maciel, K.F.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A.P. The Impact of Chlorhexidine-based Endodontic Treatment on Periapical Cytokine Expression in Teeth. *Journal of Endodontics*, v.39, p.889-892, 2013.
128. Teixeira-Salum, T.B.; Rodrigues, D.B.R.; Gervásio, A.M.; Souza, C.J.A.; Rodrigues Jr., V.; Loyola, A.M. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v.39, p.250-6, 2010.
129. Teles, R.; Wang, C.Y.; Stashenko, P. Increased susceptibility of AG-2 SCID mice to dissemination of endodontic infections. *Infect Immun*, v.65, p.3781-3787, 1997.

130. Tesmer, L.A.; Lundy, S.K.; Sarkar, S.; Fox, D.A. Th17 cells in human disease. *Immunol Ver*, v.223, p.87-113, 2008.
131. Tilg, H.; Trehu, E.; Atkins, M.B.; Dinarello, C.A.; Mier, J.W. Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55. *Blood*, n.83, p.113-118, 1994.
132. Van Venrooij, W. J.; Pruijn, G. J. Citrullination: a small change for a protein with great consequences for rheumatoid arthritis. *Arthritis Res*, v.2, p.249–251, 2000.
133. Vernal, R.; Dutzan, N.; Chaparro, A.; Puente, J.; Antonieta Valenzuela, M.; Gamonal, J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*, v.32, p.383-389, 2005.
134. Vernal, R.; Dezerega, A.; Dutzan, N.; Chaparro, A.; León, R.; Chandía, S.; Silva, A.; Gamonal, J. RANKL in human periapical granuloma: possible involvement in periapical bone destruction. *Oral Diseases*, v.12, p.283-289, 2006.
135. Vieira, J. G. H. Considerações sobre os marcadores bioquímicos do metabolismo ósseo e sua utilidade prática. *Arq Bras Endocrinol Metab*, v.43, n.6, p.415-422, Dez 1999.
136. Wan, Y.Y.; Flavell, R.A. TGF- β and regulatory T cell in immunity and autoimmunity. *J Clin Immunol*, v.28, n.6, p.647-659, 2008.
137. Wengner, A.M.; Hoöpken, U.E.; Petrow, P.K.; Hartmann, S.; Schurigt, U.; Braüer, R.; Lipp, M. CXCR5- and CCR7-dependent lymphoid neogenesis in a murine model of chronic antigen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*, v.56, p.3271–3283, 2007.
138. Wong, B.R.; Josien, R.; Young Lee, S.; Sauter, B.; Li, H-L; Steinman, R.M.; Choi, Y. Trance (tumor necrosis factor [TNF]-related activation-induced cytokine), a

new TNF family member predominantly expressed in T cells, is a dendritic cell-specific survival factor. *J Exp Med*, v.186, p.2075–2080, 1997.

139. Yang, S.; Zhu, L.; Xiao, L.; Shen, Y.; Wang, L.; Peng, B.; Haapasalo, M. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod*, v.40, n.1, p.56-62, 2014.

140. Yu, S.M.; Stashenko, P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod*, v.13, n.11, p.535-540, Nov. 1987.

141. Yu, J.J.; Ruddy, M.J.; Wong, G.C.; Sfintescu, C.; Baker, P.J.; Smith, J.B.; Evans, R.T.; Gaffen, S.L. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood*, v.109, p.3794–802, 2007.

142. Yu, J.J.; Gaffen, S.L. Interleukin 17: a novel inflammatory cytokine that bridges innate and adaptative immunity. *Frontiers in Bioscience*, v.13; p.170-7, 2008.

143. Zhao, L.; Jiang, Z.; Jiang, Y.; Ma, N.; Zhang, Y.; Feng, L.; Wang, K. IL-22+ CD4+ T cells in patients with rheumatoid arthritis. *Int J Rheum Dis*, v.16,n.5, p.518-26, 2013.

144. Zhou, L.; Chong, M.M.; Littman, D.R. Plasticity of CD4+ cell lineage differentiation. *Immunity*, v.30, p.646-55, 2009.

ANEXO A

Parecer do Comitê de Ética

11/04/2015

Gmail - Fwd: Decisão do CEUA



Kamilla Maciel <kakabh@gmail.com>

Fwd: Decisão do CEUA

sobrinho.bhz@terra.com.br <sobrinho.bhz@terra.com.br>
Reply-To: sobrinho.bhz@terra.com.br
To: Kamila Maciel <kakabh@gmail.com>

Thu, Sep 13, 2012 at 10:13 PM

— Original Message —

From: CEUA ceua@prpq.ufmg.br
To: sobrinho.bhz@terra.com.br
Cc:
Sent: Qui 13/09/12 10:37
Subject: Fwd: Decisão do CEUA

Sistema CEUA - UFMG
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
Senhor(a) Professor(a) Antônio Paulino Ribeiro

Sobrinho,

Após análise de sua solicitação de avaliação do projeto Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais experimentais, submetido a esta comissão pelo protocolo 240 / 2012, a CEUA decidiu APROVAR a sua solicitação.

Justificativa: Aprovado na reunião do dia 12/09/2012.

Para acessar ao seu projeto clique no link:

<https://www.ufmg.br/bioetica/cetea/ceua/>
Belo Horizonte, 13/09/2012.

Atenciosamente.

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

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

ANEXO B

Atividades desenvolvidas durante o curso de doutorado

2011

Resumos publicados em anais de congressos:

- Brito, L.C.N.; Maciel, K. F.; Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Vieira, L.Q. Expressão de citocinas em resposta às infecções endodônticas em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana. In: XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG e IX Encontro Mineiro das Faculdades de Odontologia, 2011, Belo Horizonte. XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG e IX Encontro Mineiro das Faculdades de Odontologia, 2011.

- Maciel, K. F.; Brito, L.C.N; Moreira-Junior, G.; Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Vieira, L.Q. Expressão de citocinas em resposta à infecção endodôntica experimental em camundongos isentos de germes. In: 28 Reunião Anual da SBPqO, 2011, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research, 2011.

Apresentação de trabalho:

- Maciel, K. F.; Brito, L.C.N; Moreira-Junior, G.; Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Vieira, L.Q. Expressão de citocinas em resposta à infecção endodôntica experimental em camundongos isentos de germes. 2011. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em bancas de trabalho de conclusão:

- Tavares, W.L.F.; Viana, A.C.D.; Maciel, K. F. Participação em banca de Renata Carvalho Portes Lopes; Daliana Cristina P. Caixeta. Técnica Híbrida de Tagger: A escolha dos alunos do Instituto de Estudos da Saúde - IES. 2011. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Endodontia) - Instituto de Estudos da Saúde.

Participação em eventos:

- 28ª Reunião Anual da SBPqO. Expressão de citocinas em resposta à infecção endodôntica experimental em camundongos isentos de germes. 2011. (Congresso).

- XI Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da UFMG e IX Encontro Mineiro das Faculdades de Odontologia. Expressão de citocinas em resposta às infecções endodônticas em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência humana. 2011. (Encontro)

2012

Participação em bancas de comissões julgadoras:

- Maciel, K. F. XXI Semana de iniciação científica da UFMG. 2012. Universidade Federal de Minas Gerais.

Artigos completos publicados em periódicos:

- Maciel, K. F.; Neves de Brito, L. C.; TAVARES, W. L. F.; Moreira, G.; Nicoli, J. R.; Vieira, L. Q.; Ribeiro Sobrinho, A. P. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *International Endodontic Journal*, v. 45, 2012.

2013

Artigos completos publicados em periódicos:

- Tavares, W.L.F.; De Brito, L.C.N.; Henriques, L.C.F.; Oliveira, R.R.; Maciel, K.F.; Vieira, L.Q.; Sobrinho, A.P.R. The Impact of Chlorhexidine-based Endodontic Treatment on Periapical Cytokine Expression in Teeth. *Journal of Endodontics*, v. 39, p.889-892, 2013.

2014

Resumos publicados em anais de congressos:

- Bambirra Júnior, W.; Thebit, M. M.; Maciel, K. F.; Brito, L.C.N ; Vieira, L.Q.; Ribeiro-Sobrinho, A.P. Avaliação da expressão perirradicular de integrinas e chaperones em resposta à infecção endodôntica. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2014, Águas de Lindóia. *Brazilian Oral Research*. São Paulo, v. 28, 2014.

- Ferreira, S.B.P.; Oliveira, M.P.; Brito, L.C.N; Maciel, K. F.; Marteli Júnior, H.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A. P. Expressão de citocinas em lesão periapical de pacientes com anemia falciforme. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2014, Águas de Lindóia. Brazilian Oral Research. São Paulo, v. 28, 2014.

- Thebit, M.M.; Maciel, K. F.; Bamber Junior, W.; Ribeiro Sobrinho, A. P.; Vieira, L.Q. Avaliação de expressão de Quimiocinas e seus receptores em resposta. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2014, Águas de Lindóia. Brazilian oral research. São Paulo: Caboverde Tecnologia e Serviços Ltda., v. 28, 2014.

- Parpinelli, B. C.; Maciel, K. F.; De Brito, L.C.N.; Thebit, M. M.; Bamber Junior, R, W. ; Vieira, L.Q.; Ribeiro-Sobrinho, A.P. Imunopatologia das infecções endodônticas. In: XXIII Semana de Iniciação Científica, 2014, Belo Horizonte. PRPQ, 2014.

- Dias, A. S.; Maciel, K. F.; Silva, C.; Abdo, E.; Brito, L.C.N.; Carvalho, M. A.; Farias, L.; Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Magalhães, P. Avaliação quantitativa da expressão de citocinas por pacientes com infecções odontogênicas graves. In: XXII Congresso Latinoamericano de Microbiología y 4 Congreso Colombiano de Microbiología, 2014, Cartagena - Colômbia. XXII Congresso Latinoamericano de Microbiologia - ALAM 2014, Cartagena das Indias Colômbia. Hechos Microbiológicos. Antioquia: Escuela de Microbiología, v. 5, 2014.

- Thebit, M.M.; Maciel, K. F.; Bamber Junior, W.; Vieira, L.Q.; Ribeiro Sobrinho, A. P. Avaliação da expressão de quimiocinas e seus receptores em resposta à infecção endodôntica experimental em camundongos isentos de germes. In: 12º Simpósio de pesquisa e iniciação científica da Univale, 2014, Governador Valadares. Anais do 12º Simpósio de pesquisa e iniciação científica, 2014.

- Silva, C.; Dias, A. S.; Maciel, K. F.; Abdo, E.; De Brito, L.C.N.; Carvalho, M. A.; Ribeiro-Sobrinho, A.P.; Farias, L.; Magalhães, P. Caracterização da expressão de citocinas em pacientes internados por infecções odontogênicas graves. In: XXIII Semana de Iniciação Científica / PRPQ, 2014, Belo Horizonte.

Apresentações de trabalho:

- Ferreira, S.B.P.; Brito, L.C.N.; Maciel, K. F.; Oliveira, M. P.; Marteli Júnior, H.; Vieira, L. Q.; Ribeiro Sobrinho, A.P. Expressão de citocinas em lesão periapical de pacientes com anemia falciforme. 2014. (Apresentação de Trabalho/Congresso).

Participação em bancas de trabalho de conclusão:

- Lopes, R.C.P.; Tavares, W.L.F.; Maciel, K.F. Participação em banca de Ana Carolina Duarte; Victor Santos Pessoa. Avaliação da resistência à fratura dos instrumentos Wave One em utilização múltipla. 2014. Monografia (Aperfeiçoamento/Especialização em Especialização em Endodontia) - Instituto de Estudos da Saúde.

Participação em eventos:

- 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. Expressão de citocinas em lesão periapical de pacientes com anemia falciforme. 2014. (Congresso).

2015**Resumos publicados em anais de congressos:**

- Espaladori, M.C; Maciel, K.F.; Bambirra, B.H.S.; Diniz, J.M.B; Vieira, L.Q.; Sobrinho, A.P.R. Perfurações experimentais de furca em animais germ free tratadas com MTA acrescido de Selênio: Análise da Resposta Imune. In: 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015, Campinas - SP. Brazilian Oral Research, 2015. v. 29.

- Maciel, K. F.; Parpinelli, B.C.; Galvão, I; Queiroz-Júnior, C.M.; Freire, M.S.; De Brito, L.C.N.; Vieira, L.Q.; Sobrinho, A.P.R. Papel da IL-17 na imunopatogênese de lesões periapicais experimentais. In: 32ª Reunião da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015, Campinas - SP. Brazilian Oral Research, v.29, 2015.

- Bambirra, B.H.S.; Diniz, J.M.B.; Maciel, K.F.; Espaladori, M.C; De Brito, L.C.N.; Vieira, L.Q.; Sobrinho, A.P.R. Efeito da associação MTA/ Selênio sobre viabilidade celular, aderência e atividade fagocitária de macrófagos M1 e M2. In: 32ª

Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica, 2015, Campinas - SP. Brazilian Oral Research, 2015.

Artigos completos publicados em periódicos:

- Ferreira, S.B.P.; De Brito, L.C.N.; Oliveira, M.P.; Maciel, K.F.; Marteli Júnior, H.; Vieira, L.Q.; Sobrinho, A.P.R. Periapical Cytokine Expression in Sickle Cell Disease. Journal of Endodontics, v.41, p.358-362, 2015.

- Bambirra Júnior, W.; Thebit, M.M.; Maciel, K. F.; De Brito, L.C.N.; Vieira, L.Q.; Ribeiro-Sobrinho, A.P. Assessment of apical expression of alpha2 integrin, heat shock protein, proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. Journal of Endodontics, v.41, n.7, p.1085-1090, 2015.

Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice

K. F. Maciel¹, L. C. Neves de Brito¹, W. L. F. Tavares¹, G. Moreira², J. R. Nicoli³, L. O. Vieira⁴ & A. P. Ribeiro Sobrinho¹

¹Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte; ²Faculdade de Odontologia, Fundação Universidade de Itáúna (FUI), Itáúna; ³Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte; and ⁴Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

Abstract

Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WLF, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LO, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *International Endodontic Journal*.

Aim To examine cytokine expression profiles during periapical lesion development in response to synergetic human pathogens in a gnotobiotic mouse model.

Methodology Human strains of *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus prevotii* were inoculated into the root canals of germ-free mice in either mono- or bi-association. Animals were killed 7 and 14 days after infection, and periapical tissues were collected. mRNA expression of the cytokines IFN- γ , TNF- α , Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand (RANKL), IL-10, IL-4 and transforming growth factor β (TGF- β) was assessed using real-time PCR. Levene's test was used to assess the equality of variance of the data, whereas a *t*-test for independent samples was used to evaluate the significance of the differences between groups ($P < 0.05$).

Results The mRNA expression of IFN- γ and TNF- α was up-regulated by *F. nucleatum* during the acute (day

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

Conclusion Cytokine profiles depend on the nature of the bacterial challenge. Both TGF- β and IL-10 appeared to be regulating the proinflammatory cytokine responses at both time-points of the periapical immune response.

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

Received 13 July 2011; accepted 10 October 2011

Introduction

All bacteria that colonize the oral cavity can invade the root canal system (RCS). Currently, studies using

molecular biology techniques have demonstrated the polymicrobial aetiology of endodontic infections (Lana *et al.* 2001, Gomes *et al.* 2004, Brito *et al.* 2007, Siqueira *et al.* 2009). Several bacterial species have been associated with the pathogenesis of periradicular diseases, with anaerobic bacteria prevalent in these infections (Lana *et al.* 2001, Peters *et al.* 2002, Gomes *et al.* 2004, Siqueira *et al.* 2004, 2009, Brito *et al.* 2007, Narayanan & Vaishnavi 2010, Tavares *et al.* 2011). Selective environmental pressures (Sundqvist

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

1992, Siqueira *et al.* 2009) present in root canals, such as nutrients, oxygen availability and microbial interactions contribute to the anaerobic status of invading bacteria. Additionally, microbial interactions, which can be synergistic or antagonistic (Oliveira *et al.* 1998, Socransky *et al.* 1998, Peters *et al.* 2002, Socransky & Haffajje 2005), are important factors in the establishment and colonization of the root canal (Caires *et al.* 2007, Sundqvist & Figdor 2007). Synergism occurs when the metabolism of a species produces nutrients and growth factors that are reliable food sources for another species, whilst antagonism occurs when a microorganism produces substances that may be toxic to or inhibit the growth of another species (Sundqvist 1992, Caires *et al.* 2007). Moreover, it has been shown, in polymicrobial infections, that the pathogenic effects of the microorganisms are affected by synergistic bacterial relationships (Metzger *et al.* 2009).

In turn, the host response to infection in the RCS is complex and involves the recruitment of inflammatory cells to the periapical tissues and an extensive network of immune mechanisms, including cytokine production (Seymour & Taylor 2004, Prso *et al.* 2007, De Rossi *et al.* 2008, Gazivoda *et al.* 2009). Periapical lesion development depends on the proinflammatory and immunomodulatory cytokines released during infection and the inflammatory restrictions that occur during the chronic phase of lesion development (Ribeiro-Sobrinho *et al.* 2002, Colic *et al.* 2009, 2010, Teixeira-Salum *et al.* 2010). It has been proposed that proinflammatory cytokines, such as IFN- γ , TNF- α and RANKL, play a fundamental role in periapical bone destruction (Menezes *et al.* 2008). IFN- γ is a key mediator of macrophage activation that up-regulates IL-1 and TNF- α expression (Kawashima *et al.* 2007, Colic *et al.* 2009, Gazivoda *et al.* 2009). IFN- γ secretion is primarily triggered by IL-12 and down-regulated by IL-10 (Colic *et al.* 2010). TNF- α is a soluble mediator that plays a role in initiating and coordinating the cellular events associated with the immune response to infection (Prso *et al.* 2007) by up-regulating the host response to bacteria and stimulating bone resorption (Graves *et al.* 2011). Bone resorption depends on the balance between the production of RANKL, which promotes osteoclast differentiation, and its natural decoy receptor, osteoprotegerin (OPG) (Kawashima *et al.* 2007, Menezes *et al.* 2008, Colic *et al.* 2010, Graves *et al.* 2011). Studies performed *in vivo* suggest that IFN- γ and TNF- α influence the regulation of periapical bone resorption by inducing nitric oxide (Fukada *et al.* 2009, Silva *et al.* 2011). Additionally, IFN- γ may interact with TNF- α to

induce the overexpression of RANKL and activate osteoclastic bone resorption (Fukada *et al.* 2009, Teixeira-Salum *et al.* 2010). The synergistic effects of RANKL and proinflammatory cytokines are induced in the periapical area in response to bacterial stimuli, which then contribute to periapical lesion expansion (Kawashima *et al.* 2007, De Rossi *et al.* 2008).

Conversely, immunosuppressive mechanisms are responsible for healing and restricting inflammation in periapical lesions (Ribeiro-Sobrinho *et al.* 2002, Colic *et al.* 2009, 2010, Teixeira-Salum *et al.* 2010). Transforming growth factor β (TGF- β) is known to inhibit bone resorption during osteoclast formation and differentiation (Gazivoda *et al.* 2009, Teixeira-Salum *et al.* 2010) and is an important regulatory cytokine with potent immunosuppressive effects. Furthermore, TGF- β inhibits the production of IL-1, TNF- α and IFN- γ whilst also antagonizing the biological activities of these cytokines (Colic *et al.* 2009). However, little is known about the role of TGF- β in the pathogenesis of human periapical lesions. Similarly, IL-4 has been shown to exert an inhibitory effect on bone resorption by generating negative effects on osteoclasts whilst stimulating the synthesis and mineralization of bone matrix (Teixeira-Salum *et al.* 2010). IL-4 also stimulates the humoral immune response by inducing antibody production and B cell differentiation (Colic *et al.* 2006, Garlet 2010). IL-10, which is produced by APCs, T regulatory cells and other cell types, is important in the down-regulation of the inflammatory processes in advanced lesions (Gazivoda *et al.* 2009) and plays an important role in bone tissues partly through the induction of OPG synthesis (Sasaki *et al.* 2000, Colic *et al.* 2010).

The aim of this study was to evaluate the cytokine expression profile during periapical lesion development in response to synergistic human pathogens in a gnotobiotic mouse model. The null hypothesis tested was that *Fusobacterium nucleatum* and *Peptostreptococcus prevotii* alone or in association have no effects on IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , RANKL and TGF- β mRNA expression.

Materials and methods

Mice

Germ-free mice aged 4–8 weeks (Swiss/NIH, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil) were used and kept in Trexler-type isolators (Class Biologically Clean, Madison, WI, USA). For

experimental procedures, the animals were transferred into microisolators (UNO Roestvastaal BV, Zevenaar, the Netherlands). All manipulations were performed under sterile conditions in a laminar flow hood (Veco, Campinas, Brazil). The animals were fed *ad libitum*. The experimental protocol was approved by the animal ethics committee (151/2010, CETEA/UFGM).

Microorganisms

The microorganisms used were recovered from a patient treated at the Endodontic Clinic of the Dentistry School of the Universidade Federal de Minas Gerais. The bacteria recovered were *F. nucleatum* and *P. prevotii*; their identification has previously been described (Moreira et al. 2011). The isolated strains were stored at -70°C and re-grown in pre-reduced brain heart infusion broth supplemented with haemin and menadione (BHI-SPRAS) (Difco, Detroit, MI, USA). Incubations were performed at 37°C in an anaerobic chamber containing an atmosphere of 85% N_2 , 10% H_2 and 5% CO_2 (Forma Scientific Company, Marietta, OH, USA).

Experimental root canal infection

The experimental procedures were performed with the animals under general anaesthesia; the animals were anaesthetized using 100 mg kg^{-1} ketamine hydrochloride (Dopalen, Division Vetbrands Animal Health, Jacaré, SP, Brazil) and 10 mg kg^{-1} xylazine (Anasedan, Agribrands do Brasil Ltda, Paulínia, SP, Brazil). The pulpal chamber of the maxillary right first molar was accessed under an endodontic operative microscope (Alliance, São Paulo, SP, Brazil) and a one-fourth carbide bur (KG Sorensen, Barueri, SP, Brazil) coupled to a controlled rotation hand piece (Driller, São Paulo, SP, Brazil). The pulp chambers were opened until the orifices of the canals could be visualized and probed with a size 8 K-file. There were no surgical interventions on the maxillary left first molar, which served as the control. For root canal infections, the concentration of the bacterial samples, which were grown in BHI-SPRAS (Difco), was adjusted to be approximately 10^7 CFU per $25\ \mu\text{L}$ in the same broth. Bacterial suspensions were inoculated into the RCS using tuberculin syringes and needles; following inoculation, the cavities were sealed with paraffin (Ribeiro-Sobrinho et al. 2001). Three groups of mice were inoculated as follows: group I, *P. prevotii* and *F. nucleatum* strains; group II, *F. nucleatum*; and group III, *P. prevotii*. Six mice were used for each

experimental group per time-point; time-points were 7 and 14 days after the surgical procedure.

Sample preparation

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

Real-time PCR

Complementary DNA was synthesized using $2\ \mu\text{g}$ of RNA by reverse transcription as described by Silva et al. (2008). The standard PCR conditions were as follows: a holding stage of 95°C for 10 min; a cycling stage with 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min; and a melting curve stage of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min, and 95°C for 15 s. The primer sequences used for the analysis of IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ , RANKL and TGF- β mRNA expression by quantitative real-time PCR are shown in Table 1. Real-time PCR was performed using the Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). In addition, the SYBR-Green detection system (Applied Biosystems) was used to assay primer amplification. The housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) was also amplified and used to normalize mRNA expression levels. All samples were run in duplicate in a $20\ \mu\text{L}$ reaction volume with $1\ \mu\text{g}$ of cDNA. Sequence Detection Software, version v 2.0 (Applied Biosystems), was used to analyse the data after amplification. The results were obtained as threshold cycle (C_t) values, which represent the cycle number at which the fluorescence levels passed a fixed threshold. Expression levels were calculated using the $\Delta\Delta C_t$ method. The C_t values are expressed as the mean of two independent measurements, and the expression levels of mRNA for all samples are expressed as the ratio between the

Gene	Sense and antisense	Length (bp)
HPRT	5'-GTT GGA TAC AGG CCA GAC TTT GTT G-3' 5'-GAT TCA ACT TGC CGT CAT CTT AGG C-3'	162
TNF- α	5'-CAT CTT CTC AAA ATT CGA GTG ACA A-3' 5'-TGG GAG TAG ACA AGG TAC AAC CC-3'	171
IFN- γ	5'-TCA AGT GGC ATA GAT GTG GAA GAA-3' 5'-TGG CTC TGC AGG ATT TTC ATG-3'	90
RANKL	5'-CAT CCC ATC GGG TTC CCA TAA-3' 5'-CCC TTA GTT TTC CGT TGC TTA ACG AC-3'	103
IL-4	5'-ACA GGA GAA GGG ACG CCA T-3' 5'-GAA GCC CTA CAG ACG TCA-3'	94
IL-10	5'-GGT TGC CAA GCC TTA TCG GA-3' 5'-ACC TGC TCC ACT GCC TTG CT-3'	190
TGF- β	5'-TGA CGT CAC TGG AGT TGT ACG-3' 5'-GGT TCA TGT CAT GGA TGG TGC-3'	169

Table 1 Primer sequences

HPRT, housekeeping gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase; TGF- β , transforming growth factor β .

expression of the gene of interest and the expression of HPRT. All data were analysed using the SPSS statistical programme (SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Levene's test was used to assess the equality of variance of the data, whereas a *t*-test for independent samples was used to evaluate the significance of the differences observed between groups. Differences in mRNA expression levels were considered to be statistically significant when the *P*-value was <0.05.

Results

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

The immunomodulatory cytokine IL-10 was significantly up-regulated on day 14 post-inoculation by both *F. nucleatum* and *P. prevotii* mono-infections compared with its expression to the same stimuli at day 7 post-inoculation. These results correlate with the

observed decrease in IFN- γ mRNA expression at the same point. At day 14 post-inoculation, the bi-association of these bacterial strains induced a decrease in IL-10 expression. IL-4 does not appear to be involved in the periapical immune response to these infections because its expression was similar at both time-points analysed in each infection situation. At day 7 post-inoculation, TGF- β mRNA expression was significantly increased in response to *F. nucleatum* and *P. prevotii* dual infection compared with mono-infection with either strain; this result paralleled the decreased IFN- γ and TNF- α mRNA expression observed for dual infection at the same time-point. It was also observed that the *F. nucleatum* mono-infection induced an increase in TGF- β mRNA expression during the chronic phase (day 14) compared with the acute phase (day 7); however, TGF- β mRNA levels were decreased following *F. nucleatum* mono-infection compared with *P. prevotii* mono-infection at both time-points. Finally, dual infection significantly induced the down-regulation of TGF- β mRNA expression at day 14 post-inoculation (Fig. 2).

Discussion

This study hypothesized that the profile of cytokines expressed in periapical tissues in response to a two-strain synergistic bacterial challenge would be different from an infection with individual species. Several studies have used gnotobiotic animals, which permit the evaluation of a specific microbial challenge as a model to study root canal infections (Kakehashi et al. 1965, Ribeiro Sobrinho et al. 2005, 2002). In this study, using synergistic bacteria recovered from a human root canal for microbial challenge experiments

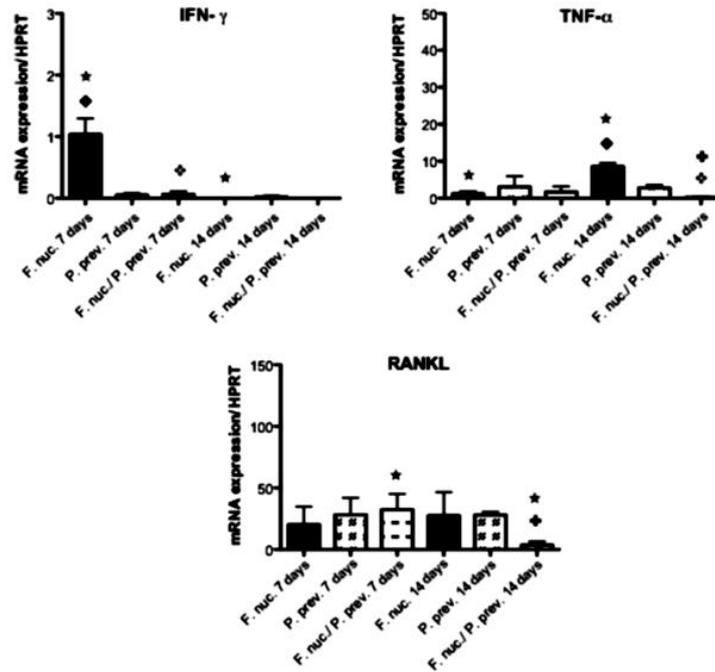


Figure 1 mRNA Expression of IFN- γ , TNF- α , and RANKL cytokines in periapical tissues analysed by real-time PCR. Relative mRNA expression levels were quantified by comparison with the internal control (HPRT). Data are expressed as the mean \pm SE for three independent experiments, each with six mice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

(Moreira *et al.* 2011), the cytokine expression profile in the periapical tissues of gnotobiotic mice was evaluated.

IFN- γ is the main activator of macrophages, which subsequently produce cytokines and other mediators that play a significant role in the development of periradicular diseases (Colic *et al.* 2006). Moreover, it has been proposed that IFN- γ is critical for the suppression of pathologic bone resorption (Sasaki *et al.* 2004, Takayanagi *et al.* 2005, Queiroz-Junior *et al.* 2010). In this study, IFN- γ mRNA expression was significantly up-regulated by *F. nucleatum* infection compared to infection with *P. prevotii* or both *F. nucleatum* and *P. prevotii* at day 7 post-infection. The increased IFN- γ mRNA expression on day 7 to *F. nucleatum* infection was paralleled with lower IL-10 expression at this time-point; however, the relative expression of these two cytokines was inverted on day 14 post-inoculation. These results are consistent with previous studies that have shown that Th1 immune responses, mediated by IFN- γ , together with other

proinflammatory cytokines, are involved in lesion progression and bone destruction at the beginning of periapical lesion development, whilst the immunosuppressive mechanisms mediated by Th2 cytokines are responsible for healing and the restriction of the inflammatory/immune mechanisms at the later phase of infection (Akamine *et al.* 1994, Kawashima & Stashenko 1999, Lukic 2000). Moreover, the expression of IFN- γ is primarily triggered by IL-12 and down-regulated by IL-10 (Colic *et al.* 2010).

TNF- α is expressed by macrophages in response to infection and in human periapical lesion (Stashenko *et al.* 1998, Prso *et al.* 2007). Huang *et al.* (2011) demonstrated that during Gram-negative polybacterial challenge, bacteria synergize and induce the release of TNF- α , which plays a role in up-regulating the host response to bacteria and in stimulating bone resorption (Graves *et al.* 2011). The results of the present study showed that the expression of TNF- α was increased by mono-infection with *F. nucleatum* at

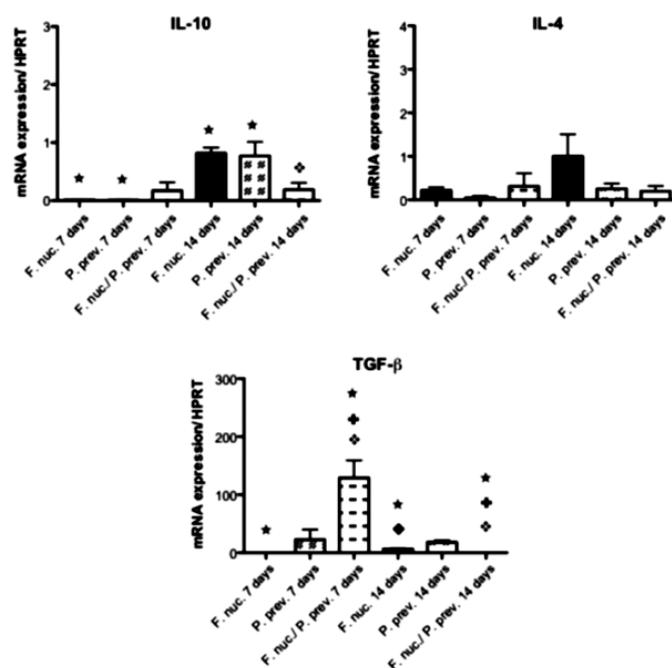


Figure 2 mRNA Expression of IL-10, IL-4, and TGF- β cytokines in periapical tissues analysed by real-time polymerase chain reaction. Relative mRNA expression levels were quantified by comparison with the internal control (HPRT). Data are expressed as the mean \pm SE for three independent experiments,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

day 14 post-inoculation. Gazivoda *et al.* (2009) have suggested that the exacerbation of the inflammatory response to infection is most likely triggered by the enhancement of bacterial pathogenicity. Taken together, these results demonstrate that IFN- γ and TNF- α were significantly up-regulated only by mono-infection with *F. nucleatum* in different phases of periapical lesion development. Interestingly, when *F. nucleatum* was associated with *P. prevotii*, both proinflammatory cytokines, IFN- γ and TNF- α , were almost absent at the both phases of infection (days 7 and 14 post-inoculation).

Bone resorption depends on the balance between the production of RANKL and its natural decoy receptor, OPG (Kawashima *et al.* 2007, Menezes *et al.* 2008, Colic *et al.* 2010, Graves *et al.* 2011). When RANKL expression is enhanced, it binds to RANK and favours osteoclast differentiation and bone resorption (Khosla 2001, Colic *et al.* 2010, Queiroz-Junior *et al.* 2010, Graves *et al.* 2011). Although proinflammatory cytokines produced by IFN- γ -activated macrophages

increased the expression of RANKL (Khosla 2001, Menezes *et al.* 2008), it was observed that on day 7 post-inoculation the RANKL mRNA expression was similar in both of the mono-infections and in the dual infection. However, RANKL mRNA was down-modulated in chronic phase (day 14). Using a rat mice model, where molar pulps were exposed and left open to the oral environment, Kawashima *et al.* (2007) observed the expression of RANKL on day 7 after pulpal exposure, which was followed by a significant increase in RANKL expression on day 14. The difference between these results and the present study is most likely related to the microbial composition of the root canal infection.

IL-4 has been shown to exert an inhibitory effect on bone resorption (Teixeira-Salum *et al.* 2010) and on macrophage function (Colic *et al.* 2006). However, IL-4 does not appear to be involved in the periapical immune response in our study because its expression was similar at both time-points analysed. This result is

in accordance with previous findings that demonstrated that IL-4 did not exhibit a significant effect on periapical lesion modulation in mice (Sasaki et al. 2000, De Rossi et al. 2008).

Proinflammatory mechanisms must be controlled to prevent excessive periapical destruction (Gazivoda et al. 2009). IL-10 attenuates the progression of bone loss by stimulating OPG production, which inhibits bone resorption by causing unproductive RANK/RANKL interactions (Garlet 2010). In the present study, a significant up-regulation of IL-10 mRNA expression was observed in response to *F. nucleatum* and *P. prevotii* mono-infections on day 14 post-inoculation compared with levels detected on day 7. Interestingly, the expression of IL-10 on day 14 was significantly decreased in dual infections when compared to both mono-infections. Additionally, the predictable immunosuppressive role of IL-10 was also observed, as its up-regulation coincided with decreased IFN- γ mRNA expression at the later phase of lesion development; these results are consistent with the published literature (Kawashima & Stashenko 1999, Lukic 2000, Colic et al. 2009). Consistent with the present results, Sasaki et al. (2000) demonstrated that IL-10, but not IL-4, suppressed infection-induced bone resorption in experimental periapical lesions in a knock-out mouse model.

Transforming growth factor β inhibits the osteoclast differentiation associated with bone remodelling (Chen & Bates 1993, Menezes et al. 2006). In humans, TGF- β expression has been identified in periapical lesions (Tyler et al. 1999, Gazivoda et al. 2009, Teixeira-Salum et al. 2010); however, Colic et al. (2009) reported that the concentrations of TGF- β and IL-10 did not significantly differ between granulomas and cysts. In this study, TGF- β mRNA expression on day 7 in response to dual infection was significantly higher compared with both mono-infections. TGF- β mRNA up-expression paralleled the observed decrease in IFN- γ and TNF- α mRNA expression under the same conditions at the same time-point, suggesting that proinflammatory cytokines may be regulated by TGF- β expression. In this study, *F. nucleatum* mono-infection induced an increase in TGF- β expression during the chronic phase (day 14) compared with the acute phase (day 7); however, these changes in TGF- β mRNA expression were more subtle compared the changes observed following *P. prevotii* infection at both time-points. Similar to IL-10, dual infection significantly decreased TGF- β mRNA expression compared with both mono-infections at day 14 post-inoculation. Taken together, it

appears that both TGF- β and IL-10 regulate proinflammatory immune responses during the acute and chronic phases of periapical lesion development, respectively. In spite of this, their expression depended on the infection status, as well as if the bacterial stimuli were in mono- or bi-association.

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

Acknowledgements

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

References

- Akamine A, Anan H, Hamachi T, Maeda K (1994) A histochemical study of the behavior of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *Journal of Endodontics* **20**, 474–8.
- Brito LCN, Teles FR, Teles RP et al. (2007) Use of Multiple-Displacement Amplification and Checkerboard DNA-DNA Hybridization to Examine the Microbiota of Endodontic Infections. *Journal of Clinical Microbiology* **45**, 3039–49.
- Caires NCM, Matos AM, Farias LM et al. (2007) Partial characterization of antagonistic substance produced by a *Clostridium butyricum* strain. *Brazilian Journal of Microbiology* **38**, 265–9.
- Chen TL, Bates RL (1993) Recombinant human transforming growth factor-beta1 modulates bone remodeling in a mineralizing bone organ culture. *Journal of Bone and Mineral Research* **8**, 423–34.
- Colic M, Lukic A, Vucevic D et al. (2006) Correlation between phenotypic characteristics of mononuclear cells isolated from human periapical lesions and their *in vitro* production

- of Th1 and Th2 cytokines. *Archives of Oral Biology* **51**, 1120–30.
- Colic M, Gazivoda D, Vucevic D, Sasa V, Rudolf R, Lukic A (2009) Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology* **47**, 101–13.
- Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, Vucevi D, Luki A (2010) Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **39**, 690–6.
- De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA (2008) Interferon-gamma, Interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1 and chemokine receptor 5, but not Interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *Journal of Endodontics* **34**, 31–4.
- Fukada SY, Silva TA, Garlet GP, Rosa AL, da Silva JS, Cunha FQ (2009) Factors involved in the T helper type 1 and type 2 cell commitment and osteoclast regulation in inflammatory apical diseases. *Oral Microbiology and Immunology* **24**, 25–31.
- Garlet GP (2010) Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. *Journal of Dental Research* **89**, 1349–63.
- Gazivoda D, Dzopalic T, Bozic B, Tatomirovic Z, Brkic Z, Colic M (2009) Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. *Journal of Oral Pathology and Medicine* **38**, 605–11.
- Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR et al. (2004) Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral microbiology and immunology* **19**, 71–6.
- Graves DT, Oates T, Garlet GP (2011) Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of Oral Microbiology* **17**, 5304–19.
- Huang CB, Altimova Y, Strange S, Ebersole JL (2011) Polybacterial challenge effects on cytokine/chemokine production by macrophages and dendritic cells. *Inflammation Research* **60**, 119–25.
- Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ (1965) The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology* **20**, 340–9.
- Kawashima N, Stashenko P (1999) Expression of bone resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Archives of Oral Biology* **44**, 55–66.
- Kawashima N, Suzuki N, Ohi C, Okuhara S, Nakano-Kawashima H, Suda H (2007) Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **103**, 707–11.
- Khosla S (2001) Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology* **142**, 5050–5.
- Lana MA, Ribeiro-Sobrinho AP, Stehling R et al. (2001) Microorganisms isolated from root canal presenting necrotic pulp and their drug susceptibility *in vitro*. *Oral Microbiology and Immunology* **16**, 100–5.
- Lukic A (2000) Transforming growth factor- β is a major down-regulatory cytokine in periapical lesions. *Balkan Journal of Stomatology* **4**, 157–60.
- Menezes R, Bramante CM, Da Silva Paiva KB et al. (2006) Receptor activator NF Kappa ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **102**, 404–9.
- Menezes R, Garlet TP, Letra A et al. (2008) Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of lesions. *Journal of Endodontics* **34**, 932–8.
- Metzger Z, Lin YY, DiMeo F, Ambrose WW, Trope M, Arnold RR (2009) Synergistic Pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* in the mouse subcutaneous chamber model. *Journal of Endodontics* **35**, 86–94.
- Moreira G Jr, Ribeiro Sobrinho AP, Bambera BHS et al. (2011) Synergistic growth effect among bacteria recovered from root canal infections. *Brazilian Journal of Microbiology* **45**, 1112–19.
- Narayanan LL, Vaishnavi C (2010) Endodontic microbiology. *Journal of Conservative Dentistry* **13**, 233–9.
- Oliveira AAP, Farias LM, Nicoli JR, Costa E, Carvalho MAR (1998) Bacteriocin production by *Fusobacterium* isolates recovered from the oral cavity of human subjects with and without periodontal disease and marmosets. *Research in Microbiology* **149**, 585–94.
- Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ (2002) Combinations of bacterial species in endodontic infections. *International Endodontic Journal* **35**, 698–702.
- Prso IB, Kocjan W, Simic H et al. (2007) Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in human periapical lesions. *Mediators of Inflammation* **2007**, Article ID 38210.
- Queiroz-Junior CM, Silva MJB, Corrêa JD et al. (2010) A controversial role for IL-12 in immune response and bone resorption at apical periodontal sites. *Clinical and Developmental Immunology* **2010**, 327417.
- Ribeiro Sobrinho AP, Rabelo FLA, Figueiredo CBO et al. (2005) Bacteria recovered from dental pulp induce apoptosis of lymph node cells. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 413–6.
- Ribeiro-Sobrinho AP, Almeida LM, de Farias LM et al. (2001) Implantation of bacteria from human pulpal necrosis and translocation from root canals in gnotobiotic mice. *Journal of Endodontics* **27**, 605–9.
- Ribeiro-Sobrinho AP, Melo Barros MH, Faria LM et al. (2002) Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral microbiology and immunology* **17**, 344–53.
- Sasaki H, Hou L, Belani A et al. (2000) IL-10 but not IL-4, suppresses infection-stimulated bone resorption *in vivo*. *The Journal of Immunology* **165**, 3626–30.
- Sasaki H, Balto K, Kawashima N et al. (2004) Gamma Interferon (IFN- γ) and IFN- γ -inducing cytokines Interleukin-12

- (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption *in vivo*. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* **11**, 106–10.
- Seymour GJ, Taylor JJ (2004) Shouts and whispers: an introduction to immunoregulation in periodontal disease. *Periodontology* **2000**(35), 9–13.
- Silva MJB, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP (2008) The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **105**, 70–6.
- Silva MJB, Sousa LMA, Lara VPL *et al.* (2011) The Role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. *Journal of Dental Research* **90**, 495–500.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS (2004) Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiology and Immunology* **19**, 363–70.
- Siqueira JF Jr, Rôças IN, Alves FRF, Silva MG (2009) Bacteria in the apical root canal of teeth with primary apical periodontitis. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics* **107**, 721–6.
- Socransky SS, Haffajee AD (2005) Periodontal microbial ecology. *Periodontology* **2000**(38), 135–87.
- Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *Journal of Clinical Periodontology* **25**, 134–44.
- Stashenko P, Teles R, D'Souza R (1998) Periapical inflammatory responses and their modulation. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **9**, 498–521.
- Sundqvist G, Figdor F (2007) A big role for the very small—understanding the endodontic microbial flora. *Australian Dental Journal* **52**, S38–51.
- Sundqvist R (1992) Associations between microbial species in dental root canal infections. *Oral Microbiology and Immunology* **7**, 257–62.
- Takayanagi H, Sato K, Takaoka A, Taniguchi T (2005) Interplay between interferon and other cytokine systems in bone metabolism. *Immunological Reviews* **208**, 181–93.
- Tavares WLF, Neves de Brito LC, Teles RP *et al.* (2011) Microbiota of deciduous endodontic infections analysed by MDA and Checkerboard DNA–DNA hybridization. *International Endodontic Journal* **44**, 225–35.
- Teixeira-Salum TB, Rodrigues DBR, Gervásio AM, Souza CJA, Rodrigues V Jr, Loyola AM (2010) Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. **39**, 250–6.
- Tyler LW, Matossian K, Todd R, Gallagher GT, White RR, Wong DTW (1999) Eosinophil-derived transforming growth factors (TGF- α and TGF- β_1) in human periradicular lesions. *Journal of Endodontics*. **25**, 619–24.

The Impact of Chlorhexidine-based Endodontic Treatment on Periapical Cytokine Expression in Teeth

Warley Luciano Fonseca Tavares, DDS, PbD,* Luciana Carla Neves de Brito, DDS, PbD,*
Luiz Carlos Feitosa Henriques, DDS, PbD,* Ricardo Reis Oliveira, DDS, PbD,*
Kamilla Faria Maciel, DDS,* Leda Quercia Vieira, PbD,[†]
and Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, DDS, PbD*

Abstract

Introduction: Root canal treatment typically involves cleaning and shaping procedures followed by treatment with antibacterial endodontic dressing between appointments and, ultimately, 3-dimensional, hermetic filling. Chlorhexidine (CHX) is effective as an irrigation solution and is used as an endodontic dressing. The aim of this study was to examine the influence of CHX on periapical cytokine expression. **Methods:** Expression levels of the cytokines interferon γ , tumor necrosis factor α , interleukin (IL)-1 β , IL-17A, IL-10, and the chemokine monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2/MCP-1) were assayed by real-time polymerase chain reaction immediately after root canal cleaning and 15 days later. **Results:** Messenger RNA expression of IL-1 β , interferon γ , IL-10, and CCL2/MCP-1 was increased on day 15 in teeth without endodontic dressing. No statistical change was observed in the messenger RNA expression of cytokines when comparing sampling times for teeth that received endodontic dressing. **Conclusions:** The results show that CHX application between appointments prevented the increase of both proinflammatory and immunoregulatory cytokines 15 days after the dental procedure. (*J Endod* 2013;39:889–892)

Key Words

Chlorhexidine, cytokine expression, root canal infection

From the *School of Dentistry and [†]Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Dr Tavares is a CAPES fellow and Drs Vieira and Sobrinho are CNPq fellows.

Address requests for reprints to Dr Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Universidade Federal de Minas Gerais, Odontologia Restauradora, R. Abre Campo 193 APT 402-Santo, 30350190 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. E-mail address: sobrinho.bhz@terra.com.br
0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2013 American Association of Endodontists.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2013.02.005>

The eradication of bacteria and their byproducts from infected root canals and the complete sealing of the disinfected root canal space are the major objectives in root canal treatment (1, 2). Although evidences showed that these goals may be accomplished using a meticulous mechanical instrumentation and chemical irrigation (3), the use of an interappointment endodontic dressing is considered a positive effort to achieve optimal infection control (4, 5).

Chlorhexidine (CHX) is a widely used antimicrobial agent that has emerged as a potential irrigant and interappointment medication (5). Its positively charged hydrophobic and lipophilic molecule enters the bacterial cells through active or passive transport mechanisms and interacts with phospholipids and lipopolysaccharides on the cell membranes of bacteria (6). CHX effectiveness as an irrigation solution and endodontic dressing is related to the interaction of the positive charges of the molecule with the negatively charged phosphate groups on microbial cell walls (7, 8), which alters the cells' osmotic equilibrium.

The pathogenesis of periapical lesions is multifactorial (9, 10) and represents an interaction between a microbial challenge and the host immune response, resulting in cytokine production and bone resorption. Although several endodontic studies have focused on the CHX antimicrobial effect, its role in the periapical immune response remains unknown. Thus, an *in vivo* study was required to shed light on this issue. The aim of this study was to compare cytokine production in the periapical tissues of human root canal infections that received interappointment CHX dressing with those that did not. To achieve this, the messenger RNA (mRNA) expression levels of the cytokines interferon γ (IFN- γ), tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-17A, and IL-10 as well as the chemokine CCL2/MCP-1 were assayed by real-time polymerase chain reaction (PCR) immediately after root canal cleaning and 15 days later. These cytokines were chosen because of their well-established role in the pathogenesis and resolution of periapical lesions (11–14). We hypothesized that treatment with CHX would prevent an exacerbated immune response. The null hypothesis tested was that there is no effect of CHX dressing on the periapical immune response.

Methods

Twenty patients presenting with dental pulp necrosis who were referred to the School of Dentistry at the Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brazil) were selected for this study. None of them had taken antibiotics in the 3 months before the root canal treatment. This study was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (ETIC 0011.0.215.203-10).

Pulp sensitivity tests and radiographic analyses were performed to diagnose dental pulp as necrotic. Teeth that presented acute symptoms were excluded. Clinical and sampling procedures were performed as described elsewhere (15–17). Briefly, cleaning and shaping of the root canals were completed using ProTaper NiTi files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) in conjunction with 5.2% sodium hypochlorite. The samples were collected immediately after root canal cleaning (day 0) and 15 days later (day 15). In the experimental group, 2% CHX gel (Biodinâmica, Ibioporã, PR, Brazil) was placed into the root canals with an

Basic Research—Biology

TABLE 1. Primer Sequences

Gene	Sense and antisense	Mt (°C)	bp
GAPDH	5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3' 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA-3'	80	96
TNF- α	5'-TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G-3' 5'-TGG TGG TCT TGT TGC TTA AAG-3'	76	73
IL-1 β	5'-TGG CAG AAA GGG AAC AGA A-3' 5'-ACA ACA GGA AAG TCC AGG CTA-3'	73	59
IL-17A	5'-CAA TGA CCT GGA AAT ACC CAA-3' 5'-TGA AGG CAT GTG AAA TCG AGA-3'	70	52
IFN- γ	5'-GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA-3' 5'-TGC AGG CAG GAC AAC CAT TA-3'	80	95
CCL2	5'-AAG ACC ATT GTG GCC AAG GA-3' 5'-CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3'	80	93
IL-10	5'-GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3' 5'-TCC CCC AGG GAG TTC ACA T-3'	81	107

bp, base pairs of amplicon size; Mt, melting temperature.

Ultradent Capillary Tip (Ultradent, South Jordan, UT). This group was compared with the control group of our previous study (17); both groups were treated under the same conditions.

Three paper points (#20) were introduced into the root canal, passing through the root apex (2 mm) for 1 minute. After withdrawal, the paper points were cut 4 mm from the tip and dropped into a microcentrifuge tube. The samples were stored at -70°C . In teeth with multiple canals, the first and second samples were collected from the same canal. At this stage of the treatment, none of the teeth presented clinical signs or symptoms, and root canals were sealed with vertically compacted thermoplasticized obturation (18).

Total RNA was extracted from each sample with TRIzol reagent (GIBCO/BRL Laboratories, Grand Island, NY) as described previously (15–17). Complementary DNA was synthesized using 1 μg RNA (19). PCR was performed under standard conditions as follows: a holding stage at 95°C (10 minutes); a cycling stage of 40 cycles at 95°C (15 seconds) followed by 1 minute at 60°C ; and a melting stage at 95°C

(15 seconds), 60°C (1 minute), and 95°C (15 seconds). The primer sequences for IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, IL-10, and CCL2/MCP-1 were designed using PRIMEREXPRESS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) based on nucleotide sequences available in the GenBank database. Primer sequences are shown in Table 1. The real-time PCR assay was performed using Step One Real-time PCR Systems (Applied Biosystems). A SYBR-Green detection system (Applied Biosystems) was used to assay primer amplification. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a housekeeping gene for normalization. All samples were run in duplicate. Reactions were performed in a volume of 25 μL and contained 1 μg complementary DNA. Sequence Detection Software version 2.0 (Applied Biosystems) was used to analyze data after amplification. Results were obtained as threshold cycle values, and expression levels were calculated using the comparative $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ method (20). The values were calculated as the mean value of the duplicates for each patient, and the expression levels of mRNA in all samples were defined as the ratio of each specific primer to GAPDH expression. Finally, data analysis was performed using SPSS for Windows (version 15.0; SPSS, Chicago, IL). Data were subjected to the Shapiro-Wilk test to characterize their normality. Because the samples did not present a normal distribution, the Wilcoxon test was used to determine statistical differences in samples from the same groups ($P < .05$).

Results

In the group in which no endodontic dressing was inserted into the root canals (control group), the mRNA expression of IL-1 β , IFN- γ , IL-10, and the chemokine CCL2/MCP-1 was elevated at day 15 when compared with day 0 ($P < .05$, Fig. 1). TNF- α and IL-17A mRNA expressions were similar at the 2 time points ($P > .05$). In contrast, no statistical change ($P > .05$) in cytokine mRNA expression and the chemokine CCL2/MCP-1 was observed between time points for the experimental group with the use of CHX as endodontic dressing when compared with the internal control (GAPDH) (Fig. 1).

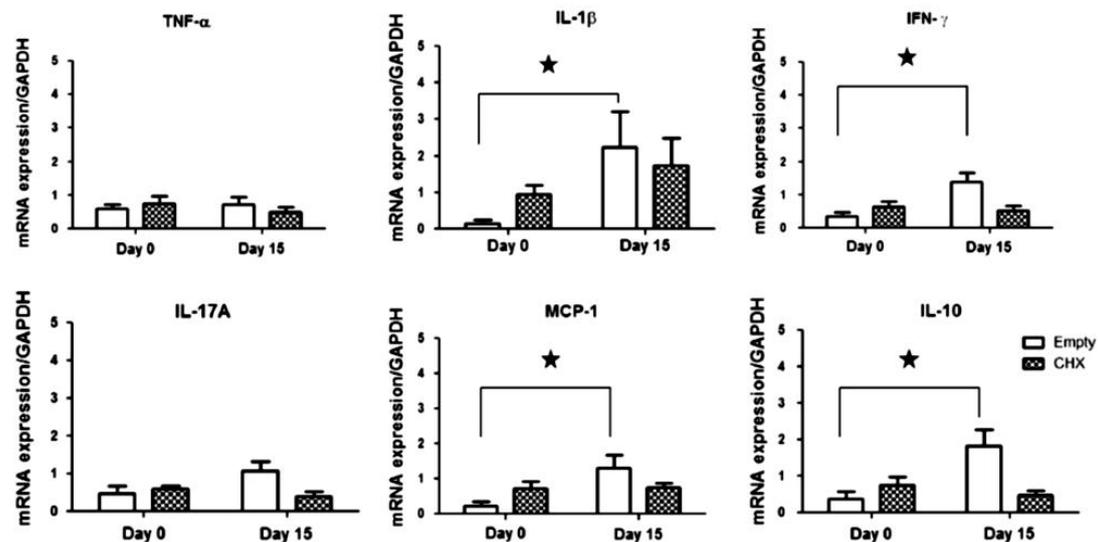


Figure 1. mRNA expression of TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-17A, IL-10, and CCL2/MCP-1 in the periradicular tissues of humans presenting root canal infections. Levels of expression were determined by real-time PCR and quantified by comparison with the internal control (GAPDH). Bars represent the mean values of samples recovered from teeth that did or did not receive 2% CHX gel as endodontic dressing; lines represent the standard error of the mean. * $P < .05$.

Discussion

Intracanal medications are mainly used to reduce or eliminate bacteria located inside the root canal system and to prevent their proliferation between appointments or in the long-term (21–23). It has been shown that an apical enlargement of 3 sizes larger than the first apical binding file associated with chemical irrigation and endodontic dressing improves the patient outcome (4, 24, 25). Because of its strong antibacterial activity against gram-positive and gram-negative microorganisms as well as against yeast, facultative anaerobes, and aerobic bacteria (7, 8, 26), CHX has been recommended not only as an irrigation solution but also as an intracanal medication (5, 27). CHX and tetracycline are unique in that dentine medicated with them acquires long-term resistance to infection (28) because the positively charged ions released by CHX can be adsorbed into the dentine, preventing microbial colonization of the dentine surface (6).

Despite its well-known antimicrobial properties, the effect of CHX on the periapical immune response, specifically on cytokine expression, remains unclear. To explore its effect, we used a well-established sampling collection methodology (15–17), comparing samples from immediately after cleaning and shaping procedures (day 0) with those collected later (day 15) in teeth that had received or not received 2% CHX gel as a root canal dressing.

Proinflammatory and immunoregulatory cytokines are important for the pathogenesis of periapical lesions (11). A type 1 immune response, characterized by the production of IFN- γ , TNF- α , and IL-1, is involved in the progression, bone destruction, and remodeling of periapical lesions (12), whereas immunosuppressive mechanisms mediated by Treg-derived cytokines are responsible for restricting the inflammatory immune mechanisms (13). The Th17 cell subset participates in the exacerbation of inflammation, yielding potent effects on various cells of the innate immune system (29, 30). Recently, we analyzed T-lymphocyte and cytokine expression in periapical tissues and showed that distinct root canal treatments might play regulatory roles in controlling local immune/inflammatory processes (16).

In this study, teeth in which 2% CHX gel was placed inside root canals exhibited no statistical changes in cytokine or chemokine levels. Similarly, a previous study showed that when calcium hydroxide was used as the endodontic dressing, IL-1 β mRNA expression was maintained at a low level between 0 and 15 days (17). IL-1 β is involved in the progression of bone destruction (12), and anti-IL-1 α antisera were able to significantly neutralize bone resorption activity in periapical lesions (31). The maintenance of basal expression levels of IL-1 β in those teeth that received 2% CHX gel suggests that this dressing probably acts by dampening the bone destruction induced by IL-1 β .

TNF- α significantly stimulates local bone resorption by inducing the production of essential osteoclast differentiation factors (32, 33). High TNF- α levels have been reported in human chronic periapical exudates (15, 34). In our study, TNF- α mRNA expression was similar at both times analyzed for both control and experimental groups ($P > .05$). Previously, using calcium hydroxide as a root canal medication, we observed very similar results (17). Brito et al (16) also reported that TNF- α remained at basal levels 7 days after root canal cleaning in teeth that did not receive any endodontic dressing. Taken together, these results suggest that the maintenance of basal TNF- α mRNA expression is related to the restriction of root canal infection rather than the presence of endodontic dressing.

The mRNA expression of IFN- γ was maintained at basal levels in the experimental, CHX-treated group. This is in keeping with a similar study examining the effect of calcium hydroxide treatment (17). It is interesting to note that the mRNA expression of IFN- γ and IL-1 β

increased in teeth without any dressing at day 15 (17) but decreased at day 7 (16), implying that bacterial recolonization may occur around day 7 in untreated teeth but not in teeth that had received 2% CHX gel. Whether these results are the consequence of CHX antibacterial or physical properties is unknown, but they indicate that 2% CHX gel favors a periapical cytokine response.

Similar to IFN- γ , IL-17 is a cytokine that acts in delayed-type reactions by increasing chemokine production in various tissues to recruit monocytes and neutrophils to the site of inflammation (35, 36). In this study, the maintenance of IFN- γ mRNA expression was paralleled by IL-17 mRNA expression in the experimental group, and this is in keeping with the observation that as many as half of all IL-17 $^{+}$ cells are also IFN- γ^{+} in humans (11, 37).

Several studies have shown that an increased expression of the chemokine MCP-1 was associated with greater recruitment of cells to inflammatory sites (14, 38). We found that MCP-1 mRNA expression increased in the periapical tissues of teeth that did not receive an endodontic dressing (17) but not in teeth where 2% CHX gel was applied to the root canals. In agreement with a previous study (17) and with the results concerning the effects of CHX on the cytokines analyzed in this study, the absence of an endodontic dressing may be detrimental to the inflammatory response in the periapical area.

The healing processes and the restriction of inflammatory/immune mechanisms are mediated by the immunosuppressive mechanisms of TGF- β and IL-10 (13, 39). In this study, we detected an increase in IL-10 mRNA expression concurrent with an increase of type 1 cytokines at day 15 when the root canals did not receive an endodontic dressing. In contrast, when root canals were dressed with CHX, a reduction in IL-10 mRNA expression and type 1 cytokine expression was observed. Taken together, the results of this study show that after CHX dressing both proinflammatory and immunoregulatory cytokine expression remained lower when compared with the control group, showing the beneficial effect of CHX on the periapical inflammatory response. However, comprehensive clinical studies of multiple samples quantitatively examined for cytokine expression in periapical tissues after different treatments are necessary to better understand the effects of root canal dressing and to design the best treatment therapy.

Acknowledgments

The authors wish to thank the postgraduate program at the School of Dentistry of University of Minas Gerais.

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

References

- Ricucci D, Langeland K. Apical limit of root canal instrumentation and obturation, part 2. A histological study. *Int Endod J* 1998;31:394–409.
- Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, et al. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006;114:278–85.
- Paredes-Vieyra J, Enriquez FJ. Success rate of single- versus two-visit root canal treatment of teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial. *J Endod* 2012;38:1164–9.
- Byström A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985;1:170–5.
- Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009;42:288–302.
- Athanassiadis B, Abbott PV, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J* 2007;52(Suppl):64–82.
- Gomes BPFA, Souza SFC, Ferraz CCR, et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine *in vitro*. *Int Endod J* 2003;36:267–75.

8. Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, et al. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J* 2003;36:604–9.
9. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:498–521.
10. Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, et al. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *J Endod* 2011;37:455–9.
11. Colić M, Gazivoda D, Vučević D, et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* 2009;47:101–13.
12. Takeichi O, Saito I, Tsurumachi T, et al. Expression of inflammatory cytokine genes in vivo by human alveolar bone-derived polymorphonuclear leukocytes isolated from chronically inflamed sites of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1996;4:244–8.
13. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999;44:55–66.
14. Marçal JRB, Samuel RO, Fernandes F, et al. T-helper cell type 17/regulatory t-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 2010;36:995–9.
15. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, et al. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod* 2011;37:1659–62.
16. Brito LC, Teles FR, Teles RP, et al. T lymphocyte and cytokine expression in human periapical tissues. *J Endod* 2012;38:481–5.
17. Tavares WL, Brito LC, Henriques LC, et al. The effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1368–71.
18. Bowman C, Baumgartner J. Gutta-percha obturation of lateral grooves and depressions. *J Endod* 2002;28:220–3.
19. Silva MJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:70–6.
20. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
21. Siqueira JF, de Uzeda M. Influence of different vehicles on the antibacterial effects of calcium hydroxide. *J Endod* 1998;24:663–5.
22. Law A, Messer H. An evidence-based analysis of the antibacterial effectiveness of intracanal medicaments. *J Endod* 2004;30:689–94.
23. Vieira AR, Siqueira JF Jr, Ricucci D, et al. Dental tubule infection as the cause of recurrent disease and late endodontic treatment failure: a case report. *J Endod* 2012;38:250–4.
24. Saini HR, Tewari S, Sangwan P, et al. Effect of different apical preparation sizes on outcome of primary endodontic treatment: a randomized controlled trial. *J Endod* 2012;38:1309–15.
25. De Rossi A, Silva LA, Leonardo MR, et al. Effect of rotary or manual instrumentation, with or without a calcium hydroxide/1% chlorhexidine intracanal dressing, on the healing of experimentally induced chronic periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005;99:628–36.
26. Ercan E, Dalli M, Dülgergil CT. *In vitro* assessment of the effectiveness of chlorhexidine gel and calcium hydroxide paste with chlorhexidine against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:27–31.
27. Kontakiotis EG, Tsatsoulis IN, Papanakou SI, et al. Effect of 2% chlorhexidine gel mixed with calcium hydroxide as an intracanal medication on sealing ability of permanent root canal filling: a 6-month follow-up. *J Endod* 2008;34:866–70.
28. Khademi AA, Mohammadi Z, Havaee A. Evaluation of the antibacterial substantivity of several intra-canal agents. *Aust Endod J* 2006;32:112–5.
29. Kolls JK, Linde A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004; 21:467–76.
30. Colic M, Vasilijic S, Gazivoda D, et al. Interleukin-17 plays a role in exacerbation of inflammation within chronic periapical lesions. *Eur J Oral Sci* 2007;115: 315–20.
31. Wang CY, 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.
32. Prso IB, Kocjan W, Simic H, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm* 2007;2007:38210.
33. Menezes R, Garlet TP, Letra A, et al. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of lesions. *J Endod* 2008;34:932–8.
34. Ataoglu T, Üngör M, Serpek B, et al. Interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α levels in periapical exudates. *Int Endod J* 2002;35:181–5.
35. Kuby J, Kind TJ, Goldsby RA, et al. *Kuby Immunology*. San Francisco: W.H. Freeman; 2007:396.
36. Tesmer LA, Lundy SK, Sarkar S, et al. Th17 cells in human disease. *Immunol Rev* 2008;223:87–113.
37. Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950–7.
38. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod* 2008;34:31–8.
39. Colic M, Gazivoda D, Vasilijic S, et al. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. *J Oral Pathol Med* 2010;39:690–6.

Periapical Cytokine Expression in Sickle Cell Disease

Sbirlene Barbosa Pimentel Ferreira, DDS,* Luciana Carla Neves de Brito, DDS, PhD,[†] Michelle Pimenta Oliveira, MSc,[‡] Kamilla Faria Maciel, DDS,* Hercílio Martelli Júnior, DDS, PhD,[‡] Leda Quercia Vieira, PhD,[§] and Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, DDS, PhD*

Abstract

Introduction: Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent genetic disease worldwide. Patients with SCA exhibit increased levels of proinflammatory mediators as part of a permanently activated immunoinflammatory status. **Methods:** The aim of this study was to evaluate the mRNA expression levels of the cytokines interferon (IFN- γ), tumor necrosis factor, interleukin (IL-1 β , IL-17A, IL-10), receptor activator for nuclear factor kappa B ligand, and the chemokines CCL2/MCP-1 and CCL5 in the periapical interstitial fluid from SCA individuals compared with healthy individuals. Samples were collected from 12 teeth of SCA patients and 12 non-SCA patients with apical periodontitis. In addition, 12 teeth were sampled from the periapical region of healthy patients with vital pulp (control). The expression of cytokine mRNA was detected by using real-time polymerase chain reaction. **Results:** The expression of mRNA for the Th1-associated cytokines IFN- γ , tumor necrosis factor- α , and IL-1 β were significantly higher in SCA individuals than in the control individuals ($P < .05$). Among Th1-associated cytokines, only IFN- γ was significantly increased in non-SCA compared with control patients (vital pulp). The expression of IL-17A mRNA was significant higher in SCA cases than in control samples ($P < .05$), whereas the IL-10 mRNA expression was significantly increased in SCA and non-SCA individuals when compared with the control group. Similar levels of receptor activator for nuclear factor kappa B ligand, CCL2, and CCL5 mRNA expression were observed in all samples. However, no significant differences were observed in the expression of cytokine or chemokine mRNA between SCA and non-SCA individuals ($P > .05$). **Conclusions:** The results were able to demonstrate that SCA patients presented prone proinflammatory ability, despite the fact that any differences in periapical immune responses between SCA and non-SCA individuals were not observed. (*J Endod* 2015;41:358–362)

Key Words

Chemokine, cytokine, periapical interstitial fluid, sickle cell anemia

Periapical lesions develop when the human body attempts to control the bacteria and bacterial by-products that are present in infected root canals (1). This reaction is characterized by immunologic mechanisms involving inflammatory cells and the production of cytokines and chemokines (1), which ultimately lead to bone resorption (2). The CD4+ cells differentiate into 2 subtypes, Th1 and Th2 cells, according to the cytokines produced (3). Both types of effector responses are regulated by a heterogeneous family of cells known as regulatory T (Treg) cells, which form a subset of 5%–10% of all CD4+ T cells and regulate the periapical immune response (4). Recently, a new subset of Th cells has been discovered; termed Th17 cells, these cells predominantly produce interleukin (IL)-17 (5, 6). T cells also express chemokines that mediate leukocyte recruitment to periapical lesions (4).

Sickle cell anemia (SCA) is the most prevalent genetic disease worldwide (7). This hemoglobinopathy is caused by a mutation in the β -globulin gene of the hemoglobin molecule, resulting in the production of abnormal hemoglobin, called hemoglobin S. Hemoglobin S leads to erythrocyte rigidity and vaso-occlusion, resulting in progressive damage to systemic organs. Such damage subsequently leads to avascular necrosis of the bones, osteopenia, osteoporosis, retinal infarction, stroke, pulmonary hypertension, and skin ulcerations (8, 9), as well as pulp necrosis in clinically intact permanent teeth (10, 11). Moreover, patients with SCA have an increased susceptibility to infections, which is partly due to autosplenectomy resulting from recurrent spleen vaso-occlusive infarcts (9, 12). Although impaired immunologic responses have been shown in SCA individuals (13), periapical immune responses to root canal infections have not been previously analyzed in these individuals. The aim of this research was to assay the SCA periapical immune response in comparison with this response in healthy individuals. The mRNA expression levels for interferon (IFN- γ), tumor necrosis factor (TNF- α), interleukin (IL-1 β , IL-17A, IL-10), and receptor activator for nuclear factor kappa B ligand (RANKL), as well as the chemokines CCL5 and CCL2/MCP-1, were assayed by using real-time polymerase chain reaction (PCR) and samples collected from the periapical interstitial fluid of both groups of individuals.

Materials and Methods

Subjects

The subjects consisted of 12 SCA patients (SCA group) and 12 healthy patients presenting with periapical lesions (non-SCA experimental group). An additional 12 healthy patients presenting with pulp vitality and referral for endodontic treatment with prosthetic indications were included as controls (control group). Both groups of healthy

From the *Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte; [†]Faculdade de Odontologia de Montes Claros, Universidade Estadual de Minas Gerais (UNIMONTES), Montes Claros; [‡]Faculdade de Odontologia, Fundação Universidade de Itáua (FUI), Itáua; and [§]Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Address requests for reprints to Dr Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 30350190 Brazil. E-mail address: sobrinho.bhz@terra.com.br

0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2015 American Association of Endodontists.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.016>

individuals were drawn from patients who were referred to the School of Dentistry at the Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, MG, Brazil). SCA patients were selected from 108 evaluated patients with confirmed diagnoses of SCA (HbSS genotype), who were registered and followed up by the Hemominas Foundation—Regional Blood Centre of Montes Claros, Minas Gerais, Brazil, members of a previous cross-sectional study that was conducted from October 2010 to August 2012. Because 11.1% of SCA patients ($n = 12$) needed to receive endodontic care, they were included as subjects of the present study. Those SCA patients requiring endodontic care were treated at the Associação Brasileira de Odontologia/Montes Claros. Patients were excluded from this study if they had taken antibiotics within the 3 months before the initiation of endodontic therapy. All participants signed the Free Agreement Formulary. This study was approved by the Research Ethics Committees of the Hemominas Foundation (ETIC 283/10), the State University of Montes Claros (ETIC 1848/10), and the Federal University of Minas Gerais (ETIC 203/10).

Sample Collection

Clinical samples were taken from all of the teeth of each individual in each of the groups that comprised this study, as described above. Each tooth was diagnosed on the basis of clinical and radiographic analyses in addition to pulp sensibility tests.

Teeth did not present acute periapical symptoms at the time of appointment. The sampling procedures were performed as previously described (6, 14–16). Briefly, each tooth was isolated, and the root canals were cleaned and shaped by using ProTaper nickel-titanium files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) and 5.2% sodium hypochlorite. The samples were collected immediately after the root canal cleaning to characterize the cytokine/chemokine expression profile. After cleaning and drying, 3 paper points were introduced into the root canal, passing passively through the root apex (2 mm), for 1 minute. After withdrawal, the paper points were cut 4 mm from the tip and dropped into a microcentrifuge tube, and the samples were stored at -70°C . RNA was then extracted from the periapical interstitial fluid. At the time of sample collection, no teeth presented clinical signs or symptoms, and the root canals were filled by using the lateral condensation technique.

Sample Preparation

Total RNA was extracted from each sample by using the TRIzol reagent (GIBCO/BRL Laboratories, Grand Island, NY), as described elsewhere (6, 14, 16). The RNA was then stored at -70°C .

Real-time Quantitative PCR

Complementary DNA was synthesized by using 1 μg RNA and the reverse transcription reaction described by Barbosa Silva et al (17). Primer sequences were designed by using the PRIMER EXPRESS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) on the basis of the nucleotide sequences available in the GenBank database. The real-time PCR assay was performed by using an ABI Prism 7900 HT Real-time PCR System (Applied Biosystems). The primer sequences used for the quantitative PCR analysis of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, IL-10, RANKL, CCL5, and CCL2/MCP-1 mRNA expression are shown in Table 1. PCR was performed under standard conditions as follows: a holding stage at 95°C (10 minutes), a cycling stage of 40 cycles at 95°C (15 seconds) followed by 60°C (1 minute), and a melting curve stage at 95°C (15 seconds), 60°C (1 minute), and 95°C (15 seconds). A SYBR-Green detection system (Applied Biosystems) was used to assay primer amplification. After amplification, melting curve analysis was performed to determine the specificity of the amplified products. The melting curve was obtained from 60°C to 95°C , with continuous fluorescence mea-

TABLE 1. Primer Sequences

Gene	Sense and antisense	Mt ($^{\circ}\text{C}$)	bp
GAPDH	5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3' 5'-GGC ATG GAC TGT GGT CAT GAG-3'	60	87
TNF- α	5'-TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G-3' 5'-TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG-3'	76	73
IL-1 β	5'-TGG CAG AAA GGG AAC AGA A-3' 5'-ACA ACA GGA AAG TCC AGG CTA-3'	73	59
IL-10	5'-GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3' 5'-TCC CCC AGG GAG TTC ACA T-3'	81	107
IL-17A	5'-CAA TGA CCT GGA ATT ACC CAA-3' 5'-TGA AGG CAT GTG AAA TCG AGA-3'	70	52
IFN- γ	5'-GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA-3' 5'-CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3'	80	95
RANKL	5'-CAG AAG ATG GCA CTC ACT GCA-3' 5'-CAC CAT CGC TTT CTC TGC TCT-3'	73	203
CCL5	5'-CGT GCC CAC ATC AAG GAG TA-3' 5'-CAC ACA CTT GGC GGT TCT TTC-3'	80	91
CCL2	5'-AAG ACC ATT GTG GCC AAG GA-3' 5'-CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3'	80	93

bp, base pairs of amplicon size; Mt, melting temperature.

surements taken at every 1% increase in temperature. PCR products with melting temperatures divergent from those established for standard DNA were considered as false positives; for such cases, a null fluorescence value was attributed. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was used as a housekeeping gene for normalization and was run with each set of reactions. All samples were run in duplicate. Each reaction was performed in 25- μL volume containing 1 μg cDNA. The Sequence Detection System Software version 2.4.1 (Applied Biosystems) was used to analyze data after amplification. The results were obtained as threshold cycle values, and the expression levels were calculated by using the comparative $2^{-\Delta\Delta\text{C}_T}$ method (15, 18). The values were calculated as the mean value of the duplicates for each patient, and the mRNA expression levels in all samples were defined as the ratio of each specific primer to GAPDH expression.

Statistical Analysis

Data analysis was performed by using SPSS for Windows (version 15.0; SPSS Inc, Chicago, IL). Data were subjected to the Shapiro-Wilk test to characterize their normality. Because the samples did not present a normal distribution, the Kruskal-Wallis one-way analysis of variance was used to determine significant differences in samples from the same groups ($P < .05$). The Mann-Whitney test was used to compare the differences between the groups ($P < .05$).

Results

When comparing the expression of cytokine and chemokine mRNA between SCA group and non-SCA experimental group, no significant differences were observed ($P > .05$). However, the mRNA levels for Th1-associated cytokines (IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β) were significantly higher in SCA individuals than in the vital/healthy (control) individuals ($P < .05$) (Fig. 1), whereas of the Th1-associated cytokines, only IFN- γ was significantly increased in non-SCA experimental group compared with control group (Fig. 1). The expression of IL-17A was significantly increased in SCA cases compared with vital/healthy samples ($P < .05$), but no difference was observed when comparing non-SCA experimental group with control group (Fig. 1). Moreover, the expression of IL-10 mRNA was significantly higher in SCA and non-SCA individuals compared with the control group (Fig. 2). Finally, similar expression levels for RANKL (Fig. 2) and the chemokines CCL2 and

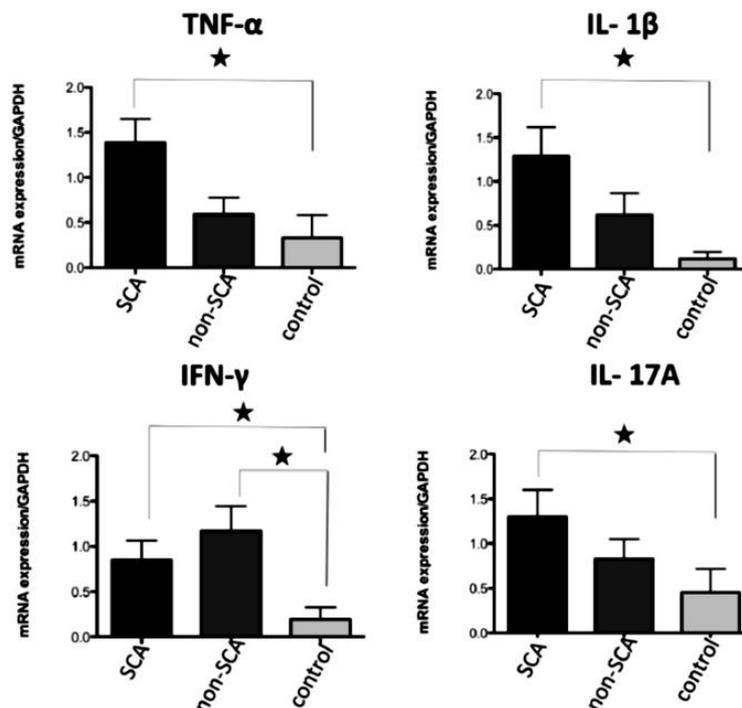


Figure 1. Expression of TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , and IL-17A genes in periradicular tissues of SCA patients and controls. Levels of expression were determined by real-time PCR and quantified by comparison with internal control (GAPDH). Bars represent mean values of samples recovered from 12 teeth of SCA patients with pulp necrosis, 12 teeth of healthy patients with pulp necrosis, and 12 teeth of healthy patients with pulp vitality; lines represent the standard error of the mean. Star, $P < .05$ by Wilcoxon or Mann-Whitney tests.

CCL5 (Fig. 2) were observed among the samples collected from SCA, non-SCA, and control groups.

Discussion

Cytokines and chemokines are frequently found in periapical inflammatory tissues (6, 15, 19), but their function is not yet fully understood. In this study, the mRNA expression levels of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17A, IL-10, and RANKL, as well as the chemokines CCL5 and CCL2/MCP-1, were assayed in periapical interstitial fluid collected from SCA individuals and compared with healthy individuals with and without periapical lesions. The rationale for this research stems from the fact that SCA individuals have an increased susceptibility to infections (9, 12, 13), which may interfere in periapical lesion responses. Moreover, in SCA, immune cells such as monocytes, neutrophils, and endothelial cells are in a permanently activated status (20).

In this study, the Th1-associated cytokines IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β were significantly higher in SCA individuals than in the vital/healthy (control) individuals. Bacterial by-products released from infected root canals stimulate macrophages and CD4+ T cells to secrete proinflammatory cytokines (21, 22). TNF- α promotes several immune system functions (23), but it has been reported that TNF- α also stimulates bone resorption in periapical lesions (24), despite being 500-fold less potent than IL-1 (25). IL-1 has been identified as a central mediator of periapical and pulpal inflammation (26), increasing leukocyte adhesion, stimulating lymphocytes, and, together with TNF- α , enhancing periapical bone resorption while inhibiting bone

formation (27). IFN- γ activates macrophages, reduces macrophage-suppressive activity, and induces IL-1, nitric oxide synthesis, and O₂⁻ production (28).

The results of this study show that in the presence of root canal infections, the expression of Th-1 associated cytokines was significantly higher in SCA individuals compared with the controls. In contrast, the non-SCA individuals did not overexpress IL-1 β , as demonstrated by others in primary infections (14–16), as well as in individuals presenting refractory endodontic treatments (6). Despite the antibacterial effects of IL-1 β , which may protect individuals against infection, its strong effects on bone resorption, together with the significantly higher expression of TNF- α , could interfere in the progression and healing of periapical lesions in SCA patients.

The proinflammatory mediator IL-17 induces proinflammatory cytokines such as IL-1, IL-6, and TNF (29) that are involved in periapical lesion responses (6, 30). Th17 cells, possibly acting through the IL-17-mediated induction of RANKL on osteoclastogenesis supporting cells, also regulate osteoclastogenesis (4). RANKL binds to its receptor, RANK, a cell-surface protein present on osteoclast precursor cells and, when activated, promotes osteoclast maturation by increasing the expression of specific genes (31). In our study, the expression of IL-17A was significantly higher in SCA individuals than in control individuals. In agreement with other periapical analyses, these results demonstrate a positive correlation between IFN- γ and IL-17, as demonstrated elsewhere (6, 32). However, the correlation between the expression of proinflammatory cytokines and the induction of increased RANKL expression was not observed here because similar

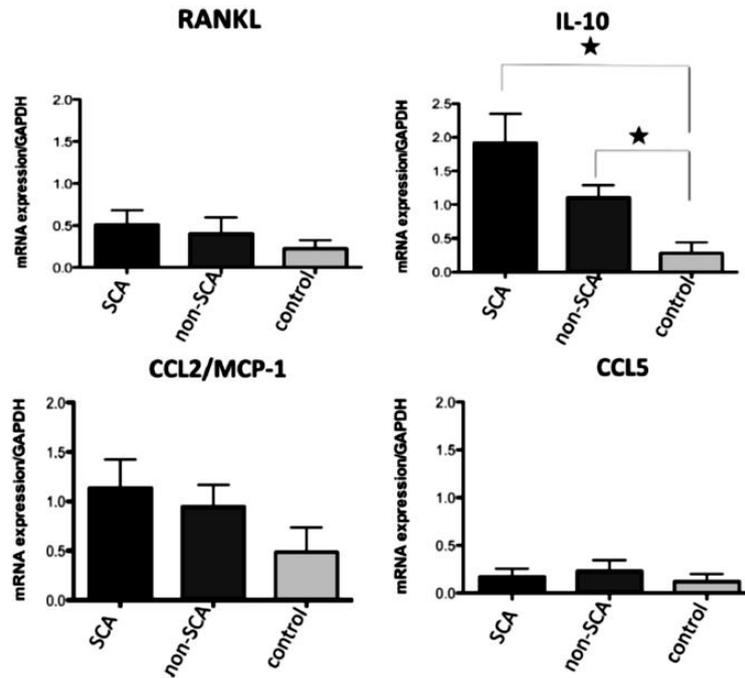


Figure 2. Expression of RANKL, IL-10, CCL2/MCP-1, and CCL5 genes in periradicular tissues of SCA patients and controls. Levels of expression were determined by real-time PCR and quantified by comparison with internal control (GAPDH). Bars represent mean values of samples recovered from 12 teeth of SCA patients with pulp necrosis, 12 teeth of healthy patients with pulp necrosis, and 12 teeth of healthy patients with pulp vitality; lines represent the standard error of the mean. Star, $P < .05$ by Wilcoxon or Mann-Whitney tests.

levels of RANKL mRNA expression were observed among the samples collected from SCA, non-SCA, and control individuals. Conversely, we have previously shown a direct correlation between the decrease in proinflammatory cytokines in non-SCA individuals and the underexpression of RANKL mRNA when the bacterial load of the infected root canal was reduced (15).

Chemokines are proteins that regulate and determine the nature of immune responses and control immune cell trafficking. Here, despite detectable levels of CCL2/MCP-1 and CCL5 in the periapical samples collected from SCA, non-SCA, and control individuals, no significant difference was observed between the groups. Conversely, we have found that MCP-1 mRNA expression was increased in lesions refractory to endodontic treatment compared with control teeth (6), similar to what was reported in periapical granulomas and cysts (33). Although an association between CCL5 and Th1-type cellular responses was suggested by the findings that the neutralization of CCL5 reduced type 1 granuloma formation (34) and that CCL5 expression, together with other Th1 cytokines, was reduced after endodontic procedures (15), the *in vivo* roles of CCL5 must be better clarified.

Treg cells, which comprise a minor population of CD4⁺ T cells, uniquely express Foxp3, which is essential for Treg differentiation (35). These effects were attributed to the IL-10 and transforming growth factor- β regulatory phenotype (4), and it was demonstrated in periapical lesions that CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ cells (Treg) expressed both IL-10 and transforming growth factor- β in higher levels than in peripheral blood (29). Here, IL-10 mRNA expression was significantly higher in the experimental groups (SCA and non-SCA) than in the control group.

The increased expression of IL-10 mRNA could represent the triggering of a compensatory anti-inflammatory mechanism to effectively down-regulate the periapical inflammatory response longer. Conversely, this decreased expression could be related to the fact that the presence or absence of proinflammatory cytokines determines whether the immune response will be Th17 or Treg (33).

A recent study was unable to demonstrate the direct immunologic relationship between SCA and periodontal inflammation (13). Similar outcomes were found in this study, which demonstrated relatively similar cytokine and chemokine mRNA expression in SCA and non-SCA individuals. Nevertheless, SCA individuals presented prone proinflammatory ability, expressing IL-1, TNF- α , and IL-17A at a significantly higher level compared with control patients than non-SCA compared with control individuals. Together, these outcomes suggest that further immunologic and prospective studies are necessary to understand the periapical lesion responses in patients presenting with SCA.

Acknowledgments

The authors thank the postgraduate program at the School of Dentistry of Universidade Federal de Minas Gerais. L.C.N.B. is a CAPES fellow. H.M.J., A.P.R.S., and L.Q.V. are CNPq fellows.

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

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

References

1. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* 1992;18:422–6.
2. Takahashi K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *Int Endod J* 1998;31:311–25.
3. Marton IJ, Rot A, Schwaringer E, et al. Differential *in situ* distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15:63–5.
4. Fukada 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.
5. Eyerich S, Eyerich K, Cavani A, Schmidt-Weber C. IL-17 and IL-22: siblings, not twins. *Trends Immunol* 2010;31:354–61.
6. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, et al. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod* 2011;37:1659–62.
7. World Health Organization. Sickle cell anemia: report of secretariat. 59th World of Health Assembly. Available at: http://www.who.int/glv/ebwha/pdf_files/WHA59_9-en.pdf. Accessed January 1, 2013.
8. Miller RG, Segal JB, Ashar BH, et al. High prevalence and correlates of low bone mineral density in young adults with sickle cell disease. *Am J Hematol* 2006;81:236–41.
9. Rees DC, Williams TN, Gladwin MT. Sickle-cell disease. *Lancet* 2010;376:2018–31.
10. Demirbas Kaya A, Aktener BO, Unsal C. Pulpal necrosis with sickle cell anaemia. *Int Endod J* 2004;37:602–6.
11. Costa CP, Thomaz EB, Souza Sde F. Association between sickle cell anemia and pulp necrosis. *J Endod* 2013;39:177–81.
12. Pathare A, Kindi SA, Daar S, Dennison D. Cytokines in sickle cell disease. *Hematology* 2003;8:329–37.
13. Veiga PC, Schroth RJ, Guedes R, et al. Serum cytokine profile among Brazilian children of African descent with periodontal inflammation and sickle cell anaemia. *Arch Oral Biol* 2013;58:505–10.
14. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, et al. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1368–71.
15. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, et al. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod* 2012;38:481–5.
16. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, et al. The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. *J Endod* 2013;39:889–92.
17. Barbosa Silva MJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e70–6.
18. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 2008;3:1101–8.
19. de Carvalho Fraga CA, Alves LR, de Sousa AA, et al. Th1 and Th2-like protein balance in human inflammatory radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 2013;39:453–5.
20. Jison ML, Munson PJ, Barb JJ, et al. Blood mononuclear cell gene expression profiles characterize the oxidant, hemolytic, and inflammatory stress of sickle cell disease. *Blood* 2004;104:270–80.
21. Chang YC, Yang SF, Huang FM, et al. Induction of tissue plasminogen activator gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts. *J Endod* 2003;29:114–7.
22. Prso IB, Kocjan W, Simic H, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm* 2007;2007:38210.
23. Silva TA, Garlet GP, Lara VS, et al. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:310–6.
24. Hernadi K, Gyongosi E, Meszaros B, et al. Elevated tumor necrosis factor-alpha expression in periapical lesions infected by Epstein-Barr virus. *J Endod* 2013;39:456–60.
25. Burgener B, Ford AR, Situ H, et al. Biologic markers for odontogenic periradicular periodontitis. *J Endod* 2010;36:1307–10.
26. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9:498–521.
27. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:348–81.
28. Sasaki H, Bako K, Kawashima N, 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 vitro*. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:106–10.
29. Golic M, Gazivoda D, Vucevic D, et al. Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res* 2009;88:997–1002.
30. Oseko F, Yamamoto T, Akamatsu Y, et al. IL-17 is involved in bone resorption in mouse periapical lesions. *Microbiol Immunol* 2009;53:287–94.
31. Menezes R, Bramante CM, da Silva Paiva KB, et al. Receptor activator NFkappaB-ligand and osteoprotegerin protein expression in human periapical cysts and granulomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:404–9.
32. Golic M, Gazivoda D, Vucevic D, et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* 2009;47:101–13.
33. Marcal JR, Samuel RO, Fernandes D, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 2010;36:995–9.
34. Chensue SW, Warmington KS, Alkenspach EJ, et al. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol* 1999;163:165–73.
35. AlShwaimi E, Purcell P, Kawai T, et al. Regulatory T cells in mouse periapical lesions. *J Endod* 2009;35:1229–33.

Assessment of Apical Expression of Alpha-2 Integrin, Heat Shock Protein, and Proinflammatory and Immunoregulatory Cytokines in Response to Endodontic Infection

Wilson Bambirra, Jr; MSc,* Kamilla Faria Maciel, MSc,* Marcela Marçal Thebit, MSc,*
Luciana Carla Neves de Brito, DDS, PhD,[†] Leda Quercia Vieira, PhD,[‡]
and Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, DDS, PhD*

Abstract

Introduction: The purpose of this study was to examine alpha-2 integrin, molecular mediators, cytokines, and chemokines from cells in periapical interstitial fluid from root canal infections before and after the reduction of the bacterial load using a cleaning procedure. **Methods:** Subjects included 20 patients referred to the School of Dentistry at the Universidade Federal de Minas Gerais (Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil). Clinical samples were taken from teeth with pulp necrosis, and no patients had acute periapical symptoms at the time of the appointments. After cleaning and drying, 3 paper points were introduced into the root canal, passing passively through the root apex (2 mm) into the periapical tissues for 1 minute. The samples were collected immediately after root canal cleaning and 7 days later (restrained root canal bacterial load) to characterize those gene expressions using real-time polymerase chain reaction. **Results:** Significantly lower levels of tumor necrosis factor alpha, chemokine ligand 5 (CCL5), chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein 1 (CCL2/MCP-1), and interleukin (IL)-8 in teeth with restrained bacterial loads (second collection) compared with the first collection were observed ($P < .05$). Similarly, the messenger RNA expression of the integrins secreted phosphoprotein 1 (SSP1)/ostepontin and focal adhesion kinase (FAK) decreased in samples from the second collection ($P < .05$). The messenger RNA for the regulatory cytokine IL-10 was significantly higher in samples from the second collection (day 7) compared with the first collection (day 0) ($P < .05$). Messenger RNA expression of IL-1 β , IL-17A, interferon gamma, alpha-2 integrin, and Hsp47/SERPINH1 were similar at both time points ($P > .05$). **Conclusions:** These findings suggest that after reducing the root canal bacterial load

a decrease in the inflammatory response took place in the periapical lesions. (*J Endod* 2015;41:1085-1090)

Key Words

Apical periodontitis, FAK, Hsp47/SERPINH1, integrin, ITGA2, SSP1/OPN

Apical periodontitis is an inflammatory disease of periradicular tissues caused by the host immune response to root canal infection characterized by localized inflammation concomitant with bone resorption. The pathogenesis of periapical disease involves degradation of extracellular matrix components, including laminin, fibronectin, collagen, and proteoglycans (1).

Lymphocytes are the most prevalent cells in the periapical inflammatory infiltrate (2). These cells are associated with the production of cytokines and chemokines that restrain the root canal infection (3) but also lead to alveolar bone destruction.

The antigen-presenting cells, especially dendritic cells and macrophage, are responsible, at least, for the polarization of 4 different Th subsets (4). The inflammatory response is related to the Th1 subset, which produces cytokines like interferon gamma (IFN- γ), tumor necrosis factor alpha (TNF- α), and interleukin (IL)-1, which are involved in the progression, bone destruction, and remodeling of periapical lesions (5). Conversely, the healing process is related to the Th2 subset. The Th17 subset may play a role in exacerbating inflammation by stimulating the secretion of proinflammatory mediators, such as IL-8, TNF- α , and IL-6 (6). Regulatory T (Treg) cells maintain normal homeostasis and reduce the overactivity of the Th1, Th2, and Th17 response. IL-10 exhibits strong anti-inflammatory properties and is produced by Th1, Th17, Th2, and Treg cells (7).

Cleaning and shaping procedures play a role in the reduction of root canal microbiota and its by-products, allowing the proper healing of apical tissues (8). This process is tightly regulated through cell-cell interactions and cell-matrix signaling and promoted by integrins, a variety of cytokines and growth factors, and cell mitosis and apoptosis (9).

Integrins are a large family of heterodimeric membrane glycoproteins involved in cellular processes mediated by cell-cell and cell-extracellular matrix interactions. Alpha-2 integrin mediates the induction of collagenase Matrix metalloproteinase-1 (MMP-1) in fibroblasts within collagen gels (10).

From the *Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia and [†]Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; and [‡]Faculdade de Odontologia, Fundação Universidade de Itáúna, Itáúna, Minas Gerais, Brazil.

Address requests for reprints to Dr Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Departamento de Odontologia Restauradora, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, 30350190 Belo Horizonte, MG, Brazil. E-mail address: sobrinho.bhz@terra.com.br
0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2015 American Association of Endodontists.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.03.002>

Basic Research—Biology

Heat shock proteins (HSPs) exert a protective role against harmful environmental conditions and pathogens. They are characteristically induced by stress signals such as elevated temperature, infectious agents, and inflammatory mediators participating in the folding and translocation of polypeptides across the cell membrane (11). Hsp47 is the major collagen-binding heat-inducible glycoprotein expressed in fibroblasts (12).

The aim of this study was to quantitatively assay the messenger RNA (mRNA) expression of the alpha-2 integrin (ITGA2), heat shock protein 47 (Hsp47/SERPINH1), osteopontin (OPN)/SSP1, focal adhesion kinase FAK/PTK2, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-17, IL-10, CCL2/MCP-1, CCL5, and IL-8 in samples collected from interstitial fluid adjacent to human root canal infections. In addition, we detected the same integrins and cytokines 7 days later after the root canal cleaning procedures when root canal bacterial load was strongly reduced, providing conditions for healing process. Finally, we statistically compared and analyzed both sets of data.

Materials and Methods

Study Participants

Twenty patients referred to the Dental School at the Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, to receive endodontic care between the ages of 18 and 80 years old were recruited for this study. The exclusion criterion for this study was anti-inflammatory and antibiotic therapy up to 3 months before starting endodontic therapy. All participants signed the informed consent formulary. This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (CAAE 20383914.0.0000.5149).

Sample Collection

Clinical samples were taken from 20 teeth (single and multi-rooted) presenting pulp necrosis and apical periodontitis diagnosed by clinical and radiographic analyses and pulp sensibility tests. All selected patients failed to present acute periapical symptoms. Teeth were isolated by using a rubber dam followed by complete asepsis of the isolated crown with 30% hydrogen peroxide followed by 5% iodine and inactivation with 5% sodium thiosulfate as proposed by Möller (13). Cleaning and shaping of the root canals were completed by using ProTaper nickel-titanium files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) in conjunction with 5.2% sodium hypochlorite. Collections were performed as previously described (14). Briefly, the samples were collected using paper points immediately after root canal cleaning to characterize the mRNA expression profiles of cytokines, chemokines, and integrins. After cleaning and drying, 3 paper points were introduced into the root canal through the root apex (2 mm) into the periapical tissues for 1 minute (day 0). The 4-mm tip of the paper points were dropped into a microcentrifuge tube, and the samples were stored at -70°C . By using this procedure, RNA was collected from the periapical interstitial fluid. No endodontic dressing was inserted into root canals. The coronal accesses of the teeth were restored with eugenol-based cement. Seven days later (day 7), the teeth were reopened, and the periapical interstitial fluid was sampled again to characterize the expressions of cytokines and integrins in teeth after instrumentation. In teeth with multiple canals, the first (day 0) and second (day 7) samples were collected from the same canal. No clinical signs or symptoms were present at the time of the second collection, and root canals were filled using the lateral condensation technique.

Sample Preparation

Total RNA was extracted from each sample with TRIzol reagent (GIBCO/BRL Laboratories, Grand Island, NY). Briefly, chloroform

was added to the tubes containing the paper points, and the mixture was centrifuged at 12,000g at 4°C for 15 minutes. The aqueous phase was collected, and RNA was precipitated by isopropanol; 75% cold ethanol was added, and samples were centrifuged again at 12,000g at 4°C for 15 minutes. Ethanol was discarded, and samples were dried, dissolved in RNase-free water, and then incubated at 55°C for 10 minutes. The RNA was then stored at -70°C .

Real-time Polymerase Chain Reaction

Complementary DNA was synthesized by using 1 μg RNA through a reverse-transcription reaction as described by Barbosa Silva et al (15). Polymerase chain reaction (PCR) was performed under standard conditions: a holding stage of 95°C (10 minutes) and a cycling stage with 40 cycles of 95°C (15 seconds) followed by 60°C (1 minute) and a melt curve stage of 95°C (15 seconds), 60°C (1 minute), and 95°C (15 seconds). The primer sequences used for quantitative PCR analysis of IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-17, IL-10, CCL2/MCP-1, IL-8, CCL5, ITGA2, Hsp47, OPN, FAK, and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression are shown in Table 1. The sequences of human primers were designed by using PRIMEREXPRESS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) based on nucleotide sequences available in the GenBank database. The real-time PCR assay was performed by using the StepOne Real-time PCR System (Applied Biosystems). A Syber-Green detection system (Applied Biosystems) was used to assay primer amplification. GAPDH was used as a housekeeping gene for normalization. All samples were run in duplicate. Sequence Detection System Software version v 2.4.1 (Applied Biosystems) was used to analyze data after amplification. Results were obtained as threshold cycle (C_T) values. Expression levels were calculated by using the comparative $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method (16). Briefly, with the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method, the data are presented as the fold change in gene expression normalized to an

TABLE 1. Primer Sequences

Gene	Sense and antisense	Mt ($^{\circ}\text{C}$)	bp
GAPDH	5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3' 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'	80	96
TNF- α	5'-TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G-3' 5'-TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG-3'	76	73
IL-1 β	5'-TGG CAG AAA GGG AAC AGA A-3' 5'-ACA ACA GGA AAG TCC AGG CTA-3'	73	59
IL-10	5'-GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3' 5'-TCC CCC AGG GAG TTC ACA T-3'	81	107
IL-17	5'-CAA TGA CCT GGA ATT ACC CAA-3' 5'-TGA AGG CAT GTG AAA TCG AGA-3'	70	52
IFN- γ	5'-ACT GAC TTG AAT GTC CAA CGC A-3' 5'-ATC TGA CTC CTT TTT CGC TTC CC-3'	61	101
ITGA2	5'-GCA GAT GGA CCA CAC TTT GA-3' 5'-TGT CTG TGC CCT TTT CCT CT-3'	60	115
HSP47	5'-TGC TGA GCC CGG AAA CTC-3' 5'-TTC AGG GCA GGC AGA ATG-3'	62	63
IL-8	5'-GAA TGG GTT TGC TAG AAT GTG ATA-3' 5'-CAG ACT AGG GTT GCC AG ATT TAA C-3'	60	129
CCL5	5'-CGT GCC CAC ATC AAG GAG TA-3' 5'-CAC ACA CTT GGC GGT TCT TTC-3'	80	91
OPN	5'-GCC GAG GTG ATA GTG TGG TT-3' 5'-TGA GGT GAT GTC CTC GTC TG-3'	62	101
FAK	5'-CAA CAG GTG AAG AGC GAT TA-3' 5'-CCA GTA TGA TCG CCG TAT TT-3'	58	99
CCL2	5'-AGG ACC ATT GTG GCC AAG GA-3' 5'-CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3'	81	93

bp, base pairs of amplicon size; CCL, chemokine ligand; FAK, focal adhesion kinase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; Hsp47, heat shock protein 47; IFN- γ , interferon gamma; IL, interleukin; ITGA2, alpha-2 integrin; Mt, melting temperature; OPN, osteopontin; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.

endogenous reference gene and relative to the first samples (day 0). For the second samples (day 7), evaluation of $2^{-\Delta\Delta CT}$ indicates the fold change in gene expression relative to the first samples. The values were calculated as the mean value of duplicates for each patient, and the expression levels of mRNAs in all samples were expressed as the ratio of each specific primer to GAPDH expression.

Statistical Analysis

Data analysis was performed by using SPSS for Windows (version 15.0; SPSS, Chicago, IL). Data were subjected to the Shapiro-Wilk test to characterize their normality. Because data did not present a normal distribution, the Wilcoxon test was used to determine statistical differences in samples from the same groups ($P < .05$).

Results

mRNA expression was determined by real-time PCR and quantified by comparison with the internal control gene GAPDH. Assessment revealed significant decreases in TNF- α , CCL5, CCL2/MCP-1, and IL-8 mRNA levels on day 7 when compared with day 0 ($P < .05$) (Fig. 1). Similarly, the mRNA expression of the integrins SSP1/OPN and FAK decreased in samples from the second collection ($P < .05$) (Fig. 2). IL-1 β , IL-17A, IFN- γ , and Hsp47/SERPINH1 and ITGA2 gene expression was similar at both time points ($P > .05$) (Figs. 2 and 3). mRNA expression of IL-10 significant increased on day 7 ($P < .05$) (Fig. 3).

Discussion

The presence of microorganisms and their by-products inside infected root canals evokes the host immune response aimed at avoiding dissemination through the periapical foramen. Cleaning and shaping procedures strongly diminish the root canal bacterial load and, afterward, periapical healing starts. This process involves overlapping phases of inflammation, proliferation, and remodeling, each characterized by dynamic interactions among components of the extracellular matrix, growth factors, and cells (17). In this study, expressions of inflammatory and regulatory genes were investigated in periapical lesions immediately after root canal cleaning procedures and 7 days later.

The identification of novel targets that restrain the progression of periapical lesions might improve diagnostic procedures and the development of individualized treatment plans and regenerative procedures. In this regard, this study investigated ITGA2 and Hsp47 gene expression in active lesions and 7 days after root canal cleaning because several periapical cellular processes involve cell-extracellular matrix and cell-cell interactions (12). Integrins are critical components of the cell attachment machinery. Most normal vertebrate cells cannot survive unless they are anchored to the extracellular matrix. ITGA2 and Hsp47 are major collagen-binding heat-inducible glycoproteins in fibroblasts (18), which are expressed associated with collagen in various tissues during pathophysiological conditions. In this study, ITGA2 and Hsp47 mRNA were present at similar levels in both conditions evaluated. This result suggests that the healing process is still in course 7 days after root canal instrumentation. Recently, it was shown that ITGA4 mRNA

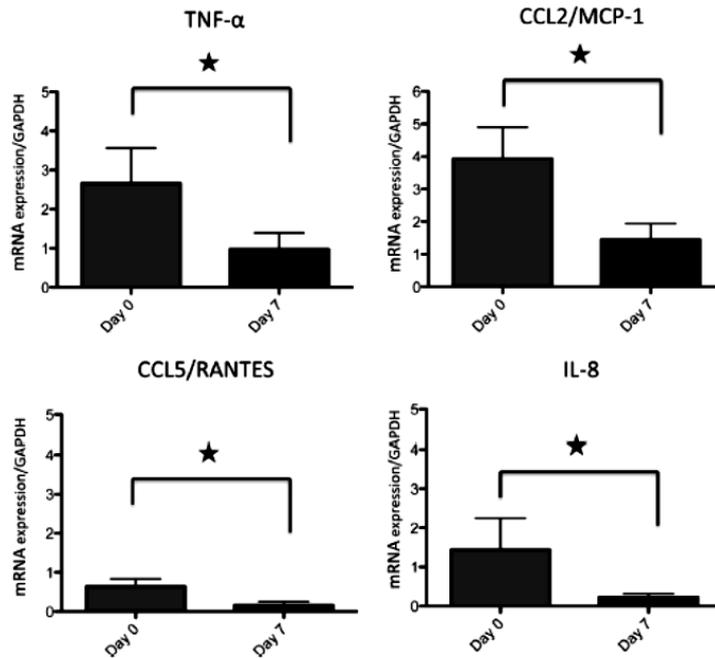


Figure 1. Expression of TNF, CCL2/MCP-1, CCL5/RANTES, and IL-8 in infected root canal periradicular tissues. Expression was determined by real-time PCR and quantified by comparison with the internal control (GAPDH). Bars represent the mean values of samples recovered from 20 patients; the lines represent standard error of the mean. * $P < .05$.

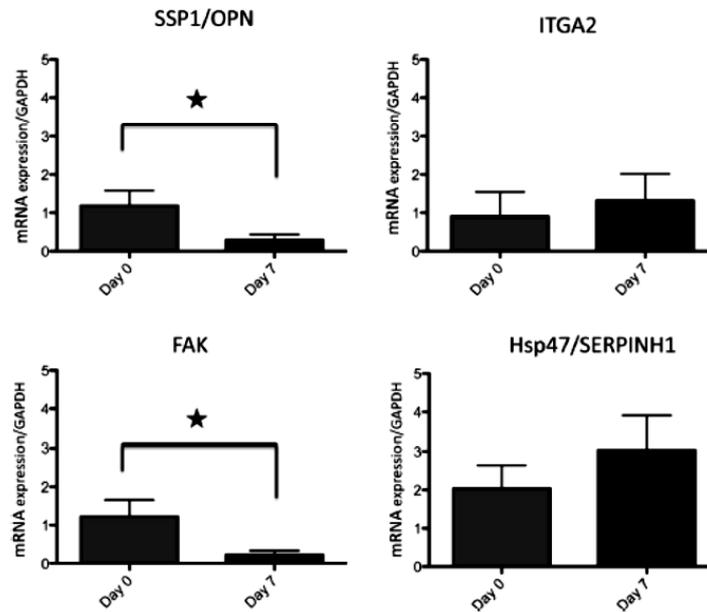


Figure 2 Expression of SSP1/OPN, ITGA2, FAK, and Hsp47/SERPINH1 in infected root canal periradicular tissues. Expression was determined by real-time PCR and quantified by comparison with the internal control (GAPDH). Bars represent the mean values of samples recovered from 20 patients; the lines represent standard error of the mean. * $P < .05$.

expression was significantly higher in inactive compared with active periapical granulomas (9). However, no data for ITGA2 were found in the literature.

Hsp44 genes were significantly increased in a pool of periapical granulomas compared with a pool of healthy periodontal ligaments (19). These authors indicated that the HSP40 gene family plays a crucial role in the maintenance of infection and tissue destruction in apical periodontitis. Here, we investigated the levels of Hsp47 in endodontic lesions. We found that Hsp47 was expressed in active lesions and 7 days after cleaning, at similar levels, again indicating that 7 days after root canal instrumentation tissue reshaping was still in course.

Recently, it was shown that FAK expression is associated with cell motility, invasiveness, proliferation, and apoptosis (20, 21). In the present study, after cleaning procedures, FAK mRNA expression was significantly down-regulated ($P < .05$), indicating that microbial infection stimulates its expression, as shown elsewhere (22).

OPN regulates the adhesion and recruitment of neutrophils and macrophages and T-cell binding to integrins (23). It has been associated with Th1 responses by increasing IL-12 and diminishing IL-10 production (20). In this study, OPN mRNA expression was significantly decreased on day 7 after cleaning procedures ($P < .05$), which mirrored the decrease of type 1 cytokines at the same time, as shown by others (24–26).

The inflammatory cytokines IL-1 β , IL-17, IFN- γ , IL-8, and TNF- α were detected in periapical interstitial fluid, as observed elsewhere (25–30). In this study, mRNA expression of the inflammatory cytokines TNF- α , CCL5, CCL2/MCP-1, and IL-8 decreased on day 7 after cleaning and shaping procedures, in agreement with the findings previously observed (24–26). Accordingly, analyzing different intracanal medications on Th1-type and Th2-type cytokine responses in apical

periodontitis, it was observed that the higher number of bacterial counts encountered in root canal infection was correlated with higher detectable rates of proinflammatory cytokines (27).

IL-1 β stimulates bone resorption by osteoclasts by inducing IL-17 synthesis (4). Moreover, IL-17 induces the secretion of IL-8, TNF- α , and IL-1 β by monocytes. These cytokines promote quick neutrophil movement to the site of the infection (6, 31). In this study, mRNA expression of IL-1 β and IL-17 were similar at both times analyzed. Recently, similar results were found concerning IL-17 but not in regard to IL-1 β , which was expressed in similar levels during the observation time (24–26). No association of IL-17 expression with symptoms, sinus tract, or lesion size was observed in human apical periodontitis (32). In an animal model, it was shown that both cytokines (IL-1 β and IL-17) were detected in higher levels during the active phase when compared with the chronic phase of lesion development (33). Thus, it is possible that, despite the cleaning procedure, some inflammation was still in course in our patients, as suggested by these cytokines. However, mRNA expression of TNF- α and IL-8 were significantly lower 7 days after root canal cleaning ($P < .05$), suggesting resorption and neutrophil recruitment decrease after this procedure. Other researchers did not observe any significant differences in mRNA TNF- α expressions, neither in human immunodeficiency virus–negative (24–26) nor in human immunodeficiency virus–positive individuals (34).

CCL2/MCP-1 and CCL5 are chemotactic for monocytes, T cells, eosinophils, and basophils and play an active role in recruiting leukocytes into inflammatory sites (35, 36). An association between CCL5 and Th1-type cellular responses was suggested by the finding that neutralization of CCL5 reduced type 1 granuloma formation (37). In this study, CCL2

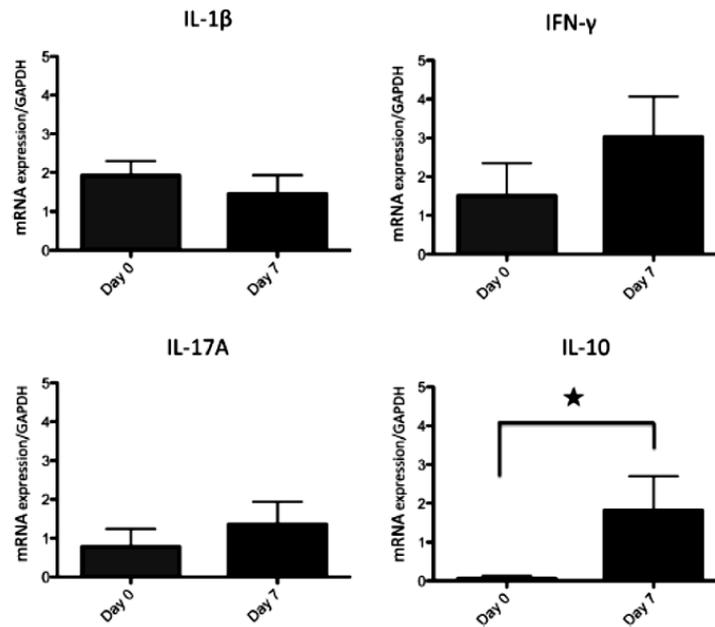


Figure 3. Expression of IL-1 β , IFN- γ , IL-17A, and IL-10 in infected root canal periradicular tissues. Expression was determined by real-time PCR and quantified by comparison with the internal control (GAPDH). Bars represent the mean values of samples recovered from 20 patients; the lines represent standard error of the mean. * $P < .05$.

and CCL5 mRNA expressions were significantly decreased on day 7 after cleaning procedures ($P < .05$). Previously, similar results concerning CCL5 were shown but not in regard to CCL2, which was found at similar levels on days 0 and 7 after root canal cleaning (26). These contradictory results may be caused by differences in the efficiency of the cleaning procedures. We suggest that the process of the control of inflammation has started at this time point and if investigated later would reveal a more clear-cut noninflammatory scenario. In addition, different initial infections might account for the variability encountered. Further evidence of the healing and immunoregulatory process on day 7 in our patients is the higher levels of IL-10 found 7 days after root canal cleaning.

In conclusion, our results show a decrease in mRNA expression of proinflammatory mediators such as TNF- α , IL-8, OPN, FAK, and CCL5 and an increase in the mRNA expression of immune regulator cytokine (IL-10) when the root canal bacteria load was reduced. Fibroblast and endothelial cells are expected to migrate into the healing tissue. ITGA2 and Hsp-47 had similar expression before and after cleaning procedures, probably indicative of the healing process. Further comprehensive clinical studies should be conducted in the periapical lesions, given the fact that several other players are involved in the inflammatory and healing processes. However, expression of the genes described here suggested an ongoing healing process after reduction of the bacterial load by root canal cleaning.

Acknowledgments

Supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and the Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico (CNPq).

Luciana Carla Neves de Brito, Leda Quercia Vieira, and Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho are CNPq fellows.

The authors wish to thank the postgraduate program at the School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais.

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

References

- Liapatas S, Nakou M, Rontogianni D. Inflammatory infiltrate of chronic periradicular lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J* 2003;36:464–71.
- Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod* 1987;13:535–40.
- Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:89–96.
- McGeachy MJ, Cua DJ. Th17 cell differentiation: the long and winding road. *Immunity* 2008;28:445–53.
- Takeichi O, Saito I, Tsurumachi T, et al. Expression of inflammatory cytokine genes *in vitro* by human alveolar bone-derived polymorphonuclear leukocytes isolated from chronically inflamed sites of bone resorption. *Calcif Tissue Int* 1996;58:244–8.
- Jovanovic DV, Di Battista JA, Martel-Pelletier J, et al. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. *J Immunol* 1998;160:3513–21.
- Bluestone JA, Mackay CR, O'Shea JJ, Stockinger B. The functional plasticity of T cell subsets. *Nat Rev Immunol* 2009;9:811–6.
- Fabricius L, Dahlen G, Sundqvist G, et al. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci* 2006;114:278–85.
- Garlet GP, Horwat R, Ray HL Jr, et al. Expression analysis of wound healing genes in human periapical granulomas of progressive and stable nature. *J Endod* 2012;38:185–90.
- Langholz O, Ruckel D, Mauch C, et al. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins. *J Cell Biol* 1995;131:1903–15.
- De Maio A. Heat shock proteins: facts, thoughts, and dreams. *Shock* 1999;11:1–12.

12. Vieira-Junior JR, de Oliveira-Santos C, Della-Coletta R, et al. Immunoeexpression of alpha2-integrin and Hsp47 in hereditary gingival fibromatosis and gingival fibromatosis-associated dental abnormalities. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2013; 18:e65–8.
13. Möller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies. Odontol Tidskr* 1966;74:1–380.
14. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, et al. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod* 2011;37:1659–62.
15. Barbosa Silva MJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:70–6.
16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;37:1659–62.
17. Bakhtshayesh M, Soleimani M, Mehdizadeh M, Katebi M. Effects of TGF-beta and b-FGF on the potential of peripheral blood-borne stem cells and bone marrow-derived stem cells in wound healing in a murine model. *Inflammation* 2012;35:138–42.
18. Delzangles B, Boy-Lefevre ML, Forest N. Glycoproteins expression in apical pathologic tissue: clinical incidences. *J Endod* 1997;23:565–8.
19. Goodman SC, Letra A, Dorn S, et al. Expression of heat shock proteins in periapical granulomas. *J Endod* 2014;40:830–6.
20. Haack CR, Hsia DA, Schlaepfer DD. The focal adhesion kinase—a regulator of cell migration and invasion. *IUBMB Life* 2002;53:115–9.
21. Li J, Meng Q, Sun Y, Qing H. Inhibition of focal adhesion kinase induces apoptosis in human gastric carcinoma cells (SGC-7901). *Mol Biol Rep* 2013;40:401–6.
22. Owens IV, Xu L, Marston WA, et al. Overexpression of the focal adhesion kinase (p125FAK) in the vascular smooth muscle cells of intimal hyperplasia. *J Vasc Surg* 2001;34:344–9.
23. Salvi V, Scutera S, Rossi S, et al. Dual regulation of osteopontin production by TLR stimulation in dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2013;94:147–58.
24. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, et al. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1368–71.
25. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, et al. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod* 2012;38:481–5.
26. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, et al. The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. *J Endod* 2013; 39:889–92.
27. Martinho PC, Nascimento GG, Leite FR, et al. Clinical influence of different intracanal medications on Th1-type and Th2-type cytokine responses in apical periodontitis. *J Endod* 2015;42:169–75.
28. Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, et al. Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease. *J Dent Res* 2007;86:306–19.
29. Fukada 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.
30. Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervasio 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.
31. Colic M, Gazivoda D, Vucevic D, et al. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* 2009;47:101–13.
32. Ajuz NC, Antunes H, Mendonça TA, et al. Immunoeexpression of interleukin 17 in apical periodontitis lesions. *J Endod* 2014;40:1400–3.
33. Wang XX, Denhardt DT. Osteopontin: role in immune regulation and stress responses. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:333–45.
34. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, et al. Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. *Int Endod J* 2015;48:533–41.
35. De Rossi A, Rocha IB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod* 2008;34:31–8.
36. Marçal JR, Samuel RO, Fernandes D, et al. T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas. *J Endod* 2010;36:995–9.
37. Chensue SW, Warmington KS, Allenspach EJ, et al. Differential expression and cross-regulatory function of RANTES during mycobacterial (type 1) and schistosomal (type 2) antigen-elicited granulomatous inflammation. *J Immunol* 1999;163:165–73.