

**CAROLINE CHRISTINE SANTA ROSA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO APICAL DE FATORES PRÓ-  
ANGIOGÊNICOS E CITOCINAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO  
ENDODÔNTICA**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2018**

Caroline Christine Santa Rosa

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO APICAL DE FATORES PRÓ-  
ANGIOGÊNICOS E CITOCINAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO  
ENDODÔNTICA**

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.  
Co-Orientadora: Prof.(a). Dra. Leda Quércia Viera.

**Belo Horizonte  
2018**

## Ficha Catalográfica

S231a Santa Rosa, Caroline Christine.  
2018 Avaliação da expressão apical de fatores pró-  
T angiogênicos e citocinas em resposta à infecção endodôntica  
/ Caroline Christine Santa Rosa. -- 2018.

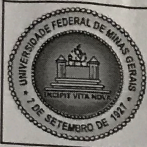
82 f. : il.

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

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

1. Necrose da polpa dentária. 2. Pulpite. 3. Indutores da Angiogênese . 4. Citocinas. 5. Endodontia. I. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Viera, Leda Quércia. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



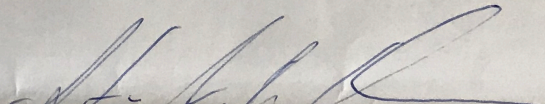
## FOLHA DE APROVAÇÃO

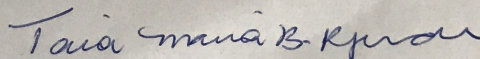
**Avaliação da expressão apical de fatores pro-angiogênicos e citocinas em resposta à infecção endodôntica**

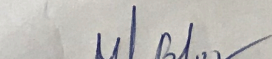
**CAROLINE CHRISTINE SANTA ROSA**

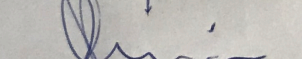
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Endodontia.

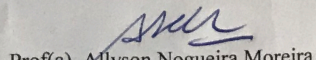
Aprovada em 27 de julho de 2018, pela banca constituída pelos membros:

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

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

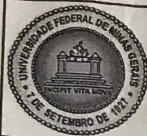
  
Prof(a). Manoel Brito Junior  
UNIMONTES

  
Prof(a). Ricardo Reis de Oliveira  
FO-UFMG

  
Prof(a). Allyson Nogueira Moreira  
FO-UFMG

Belo Horizonte, 27 de julho de 2018.





UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



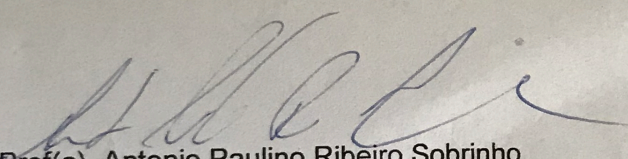
## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA CAROLINE CHRISTINE SANTA ROSA

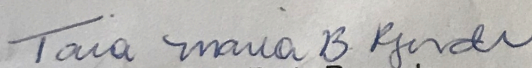
Aos 27 dias de julho de 2018, às 14:00 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho (Orientador) – FO/UFMG, Taia Maria Berto Rezende – Universidade Católica de Brasília, Manoel Brito-júnior – UNIMONTES, Ricardo Reis de Oliveira – FO/UFMG e Allyson Nogueira Moreira – FO/UFMG, para julgamento da tese de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Endodontia, intitulada: **Avaliação da expressão apical de fatores pro-angiogênicos e citocinas em resposta à infecção endodôntica**. O Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pela aluna e arguição pelos membros da banca, a Comissão Examinadora considerou:

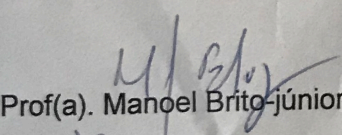
Aprovada

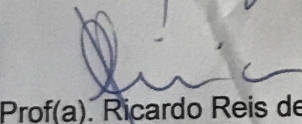
Reprovada

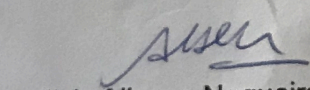
Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 27 de julho de 2018.

  
Prof(a). Antonio Paulino Ribeiro Sobrinho

  
Prof(a). Taia Maria Berto Rezende

  
Prof(a). Manoel Brito-júnior

  
Prof(a). Ricardo Reis de Oliveira

  
Prof(a). Allyson Nogueira Moreira

## ***Dedicatória***

*Á **Deus**, pelas bênçãos, provisão e por ter me conduzido até aqui.  
Aos meus pais, **Carlos Antônio** e **Lídia**, por todo suporte e amor incondicional.  
Ao meu irmão, **Rodrigo**, pelo carinho e amizade.  
Ao **Guilherme**, por todo companheirismo, incentivo e amor.  
Obrigada por todo estímulo, suporte e confiança. Amo vocês!*

## **Agradecimentos Especiais**

Ao **Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho** por sua competência, conhecimento e disponibilidade. Agradeço também pelo tempo despendido ao meu trabalho, pelas correções, sugestões, esclarecimentos e comentários sempre oportunos. Agradeço sua seriedade em transmitir o conhecimento que foi fundamental para o incentivo, aprendizado e a realização deste trabalho.

À **Profa. Dra. Leda Quércia Viera**, pela competência, seriedade e comprometimento em transmitir seus conhecimentos. Obrigada pelo suporte durante toda execução do trabalho.

# Agradecimentos

Ao **Prof. Dr. Luis Carlos Feitosa Henriques**, agradeço o carinho e estima com o qual sempre me tratou. Obrigada principalmente pela amizade, incentivo, confiança e generosidade.

À **Profa. Dra. Maria Elisa de Souza e Silva** por ter me acolhido carinhosamente no “Programa de Assistência Odontológica aos Pacientes Transplantados”. Seu exemplo de profissional dedicada, afetuosa e humana contribuíram para que eu me apaixonasse ainda mais pela Endodontia.

Ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da FO-UFMG, na pessoa da **Profa. Dra. Isabela Almeida Pordeus**, pelo compromisso e dedicação com a excelência do curso.

Aos colegas do **Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia (ICB- UFMG)**, pela parceria e ajuda nos procedimentos experimentais do trabalho.

Aos colegas de pós-graduação, **Otaviano Durães, Monize Carvalho, Júlia Braga e Marcela Espaladori**, agradeço o conhecimento compartilhado, convivência e disponibilidade. Muito obrigada pela imensurável contribuição nesse trabalho.

À **Luciana Carla Neves de Brito**, pelo carinho, suporte e parceria na execução desse trabalho.

Aos meus **familiares e amigos**, agradeço o incentivo e o amor incondicional. Vocês foram fundamentais em todas as etapas. Minha gratidão e amor.

À **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CAPES)** e a **Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG** pelo apoio financeiro .



## RESUMO

A progressão e desenvolvimento de patologias pulpare e periapicais estão intimamente relacionados à presença de microrganismos e seus subprodutos nos sistema de canais radiculares (SCR), que induzem uma resposta de defesa adjacente ao ápice radicular. A angiogênese é apontada como fator essencial na patogênese das alterações periapicais crônicas, estando relacionada ao seu estabelecimento e manutenção, por ser fonte constante de citocinas, quimiocinas e proteases. A angiogênese também está relacionada ao reparo tecidual que segue à resolução das alterações perirradiculares após a realização da terapia endodôntica. Neste estudo, avaliou-se a expressão de fatores pró-angiogêncios e citocinas relacionadas, em amostras coletadas de pacientes ( $n=20$ ) com dentes portadores de Periodontite Apical Crônica imediatamente após a instrumentação dos SCR e 7 dias após os procedimentos de desinfecção. As amostras foram analisadas por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT). Verificou-se a expressão gênica de fatores pró-angiogênicos e citocinas Angiopoetina-1 (AGT1), Fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A), Fator de crescimento fibroblástico básico (FGF- $\beta$ ), Proteína quimiotática de monócitos (CCL2/MCP-1), Proteína inflamatória de macrófagos-1 $\beta$  (CCL4), C-X-C Receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4), C-C Receptor de quimiocina tipo 6 (CCR6), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, IL-6, RANK-L e MMP-9. A expressão do mRNA dos mediadores avaliados revelou aumento significativo nos níveis de AGT1, CCL2/MCP-1, CCL4, CCR6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, RANK-L e MMP-9 no dia 7 quando comparado com o dia 0 ( $P < 0,05$ ). Para VEGF-A, FGF- $\beta$ , CXCR4, IL-17 e IL-6 as expressões de mRNA foram semelhantes em ambos tempos mensurados ( $P > 0,05$ ). Pode-se concluir que, após desinfecção do SCR, houve aumento nos níveis de expressão de mRNA de importantes mediadores envolvidos nos fenômenos angioproliferativos e osteogênicos.

**Palavras-Chave:** Tratamento endodôntico. Necrose pulpar. Angiogênese apical. Infecção endodôntica. Imunologia.

## ABSTRACT

### “Evaluation of apical expression of pro-angiogenic factors and cytokines in response to endodontic infection”

The progression and development of pulpal and periapical pathologies are closely related to the presence of microorganisms and their by-products in the infected root canal system (RCS), which induces a defense response adjacent to the root apex. Angiogenesis has been identified as an essential factor in the pathogenesis of chronic periapical alterations, being related to its establishment and maintenance, being a constant source of cytokines, chemokines and proteases. Angiogenesis is also related to the tissue repair that follows the resolution of the periradicular alterations after the implementation of endodontic therapy. In this study, was evaluated the expression of pro-angiogenic factors and correlated cytokines in samples collected from patients ( $n = 20$ ) on teeth with Chronic Apical Periodontitis immediately after RCS instrumentation and 7 days after disinfection procedures. Samples were analyzed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). The gene expression of pro-angiogenic factors and cytokines Angiopoetin-1 (AGT1), Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), Basic fibroblast growth factor (FGF- $\beta$ ), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2/MCP-1), Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (CCL4), C-X-C chemokine receptor motif 4 (CXCR4), C-C chemokine receptor motif 6 (CCR6), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, IL-6, RANK-L and MMP-9. The mRNA expression of the mediators evaluated revealed a significant increase in levels of AGT1, CCL2/MCP-1, CCL4, CCR6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, RANK-L and MMP-9 on day 7 when compared to day 0 ( $P < 0.05$ ). As for VEGF-A, FGF- $\beta$ , CXCR4, IL-17 and IL-6 their mRNA expressions was similar at both observed times ( $P > 0.05$ ). In conclusion, after cleaning and shaping procedures of the RCS, there was an increase in mRNA expression levels of important mediators involved in angioproliferative and osteogenic phenomenon.

**Key words:** Endodontic treatment. Pulp necrosis. Angiogenesis. Endodontic infection. Immunology.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AGT</b>	Angiopoetina
<b>cDNA</b>	Ácido desoxirribonucléico complementar
<b>CCL</b>	Chemokine (C-C motif) ligand
<b>CCR</b>	Chemokine (C-C motif) receptor
<b>CXCR</b>	C-X-C chemokine receptor type
<b>Ct</b>	Limiar do ciclo ( <i>threshold cycle</i> )
<b>DEPC</b>	Dietil pirocarbonato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico
<b>DNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
<b>FGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento fibroblástico básico
<b>GAPDH</b>	Gene Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
<b>HIF</b>	Fator indutor de hipóxia
<b>IFN</b>	Interferón
<b>IL</b>	Interleucina
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemotactic protein-1
<b>MMP</b>	Matriz metaloproteinase
<b>mRNA</b>	Ácido ribonucleico mensageiro
<b>PDGF</b>	Fator de crescimento derivado de plaquetas
<b>PCR-RT</b>	Reação da cadeia da polimerase em tempo real
<b>PMNs</b>	Neutrófilos polimorfonucleares
<b>RANK-L</b>	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
<b>RNA</b>	Ácido ribonucléico
<b>SCR</b>	Sistema de canais radiculares
<b>TCD4+</b>	Linfócito T CD4+
<b>TCD8+</b>	Linfócito T CD8+
<b>TGF</b>	Fator de crescimento transformante
<b>Th</b>	Linfócitos T-helper
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>VEGF</b>	Fator de crescimento do endotélio vascular

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** *Primers* utilizados para detecção da expressão dos fatores pró-angiogênicos e citocinas. **27**
- FW (*forward primer*), RV (*reverse primer*).
- \*Mt: melting temperature; bp: base pairs of amplicon size.

## SUMÁRIO

<b>1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....</b>	<b>14</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
2.1 Objetivo geral.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
<b>3 METODOLOGIA EXPANDIDA.....</b>	<b>20</b>
3.1 Etapa Clínica.....	20
3.1.1 Seleção dos pacientes.....	20
3.1.2 Coleta dos espécimes clínicos.....	20
3.2 Etapa laboratorial.....	22
3.2.1 Identificação da expressão de fatores pró-angiogênicos e citocinas.....	22
3.2.1.1 Extração do RNA.....	22
3.2.1.2 Quantificação do mRNA.....	23
3.2.1.3 Preparo de cDNA por Transcrição Reversa.....	23
3.2.1.4 Detecção e quantificação das fatores fatores pró-angiogênicos e citocinas .....	24
3.3 Análise dos dados.....	25
3.4 Aspectos éticos.....	26
<b>4 ARTIGOS CIENTÍFICOS.....</b>	<b>27</b>
4.1 Artigo 1: “Analysis of pro-angiogenic factors and cytokines in response to endodontic infection.”.....	27
4.2 Artigo 2: "Analysis of the expression of pro-angiogenic mediators in response to endodontic therapy".....	43
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>59</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>60</b>



<b>7 ANEXOS.....</b>	<b>65</b>
<b>7.1 Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....</b>	<b>65</b>
<b>7.2 Anexo B - Parecer do Comitê de Ética.....</b>	<b>68</b>

## 1. CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A progressão e desenvolvimento de patologias pulpares e periapicais estão intimamente relacionados à presença de microrganismos e seus subprodutos. Uma vez instalados nos sistema de canais radiculares (SCR), os microrganismos induzem uma resposta de defesa adjacente ao ápice radicular (Stashenko, 1990; Siqueira et al., 2004). A resposta inflamatória, que aí se processa, recruta células imunocompetentes para conter e impedir a disseminação dessa infecção para outros sítios, culminando com a formação de uma lesão crônica e a concomitante reabsorção dos tecidos de suporte periodontais adjacentes (Stashenko, 1990; Virtej et al., 2013; Márton et al., 2014). Grande parte dos efeitos patogênicos microbianos sobre os tecidos periapicais operam-se de forma indireta, via estimulação de mediadores solúveis derivados do hospedeiro, como as citocinas e quimiocinas. O objetivo deste fenômeno é eliminar o agente agressor, permitindo que o reparo tecidual ocorra (Stashenko et al., 1998). Um influxo robusto de células de defesa é iniciado pela interação entre os microrganismos do canal radicular infectado com a região periapical. Há uma grande diversidade de células nas lesões perirradiculares humanas, dentre elas destacam-se os linfócitos TCD4+ e TCD8+, macrófagos, células plasmáticas, mastócitos, eosinófilos. As células T, entretanto, são as mais numerosas nessas lesões (Márton et al., 2014).

Os linfócitos TCD4+ e TCD8+, após seu contato com antígenos ou ao serem estimulados por outras células inflamatórias, podem produzir uma grande variedade de citocinas. As células TCD4+ atualmente subdividem-se em vários subgrupos que incluem as células: Th1, Th2, Th17 e T regulatórias (Treg) (Colic et al., 2009; de Brito et al., 2012). A resposta Th1 caracteriza-se pela produção de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-2, e TNF, envolvendo-se na progressão e destruição óssea perirradicular. A resposta Th2 induz a síntese e atividade das citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13, relacionando-se com a cicatrização e regeneração dos tecidos perirradiculares (Stashenko et al., 1998, Kawashima & Stashenko, 1999, Teixeira-Salum et al., 2010). O subgrupo Th17 produz a IL-17, citocina pró-inflamatória com atuação em várias células da resposta inata, e é considerada ponte entre esta e a resposta adaptativa (Marcal, et al., 2010,

Márton *et al.*, 2014). As células Treg, produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10 apresentam um efeito inibitório sobre a reabsorção óssea durante a formação e diferenciação dos osteoclastos, além de atuarem na regulação da resposta imune contra a infecção (Colic *et al.*, 2009). As quimiocinas participam do processo inflamatório ao promoverem a ativação de selectinas que, por sua vez, estão envolvidas na adesão de células às paredes endoteliais. Sua expressão localizada nos tecidos gera gradientes quimiotáticos, que são responsáveis pela migração guiada e a manutenção de células inflamatórias nesses locais (Mantovani *et al.*, 1998, Silva *et al.*, 2005).

Diante desse panorama, estudos relatam uma estreita correlação entre angiogênese e lesões inflamatórias crônicas, e em muitas condições, como nas lesões periapicais, elas ocorrem concomitantemente (Saghiri *et al.*, 2015, Bletsa *et al.*, 2012; Virtej *et al.*, 2013). A angiogênese tem sido apontada como fator essencial na patogênese das lesões periapicais crônicas, estando relacionada ao estabelecimento e manutenção da lesão, uma vez que os vasos sanguíneos neoformados suprem a contínua demanda de nutrientes e oxigênio das células em proliferação. Contribui para a inflamação por serem uma fonte constante de citocinas, quimiocinas e proteases. (Fabricius *et al.*, 2006; Bletsa *et al.*, 2012; Sette-Dias *et al.*, 2016; Virtej *et al.*, 2013). Participa também do reparo tecidual que se segue à resolução da patologia periradicular após a instituição da terapia endodôntica (Bletsa, *et al.*, 2012; Virtej *et al.*, 2016).

Após os procedimentos de limpeza e modelagem do SCR, a angiogênese relaciona-se ao reparo tecidual periapical (Siqueira *et al.*, 2004). Isto se deve ao fato de a resolução da infecção e consequente cicatrização periradicular, depender também da angiogênese (Fabricius *et al.*, 2006; Bletsa *et al.*, 2012; Sette-Dias *et al.*, 2016; Virtej *et al.*, 2013). Após a remoção dos agentes microbianos do interior dos SCR, por meio dos procedimentos de limpeza e modelagem, a carga bacteriana do canal radicular diminui drasticamente permitindo que se inicie o processo de cicatrização periapical (Sette-Dias *et al.*, 2016; Bakhshayesh *et al.*, 2012; Rodrigues *et al.*, 2017; Bambirra *et al.*, 2015). O reparo ósseo requer um processo coordenado entre osteogênese e angiogênese envolvendo múltiplos passos que inclui migração, proliferação e diferenciação de vários tipos de células, como endoteliais, fibroblastos, osteoblastos e osteoclastos (Santos, 2000). A angiogênese e a

oferta eficiente de sangue são pré-requisitos para apoiar e sustentar o desenvolvimento e a manutenção óssea (Liu et al., 2014). A cicatrização dos tecidos periapicais requer o recrutamento de células-tronco mesenquimais/ células precursoras osteoblásticas e sua diferenciação em osteoblastos comprometidos para a síntese da matriz mineralizada. Isso está intimamente associado aos eventos locais de angiogênese/vascularização (Stegen et al., 2015), e a ligação entre as células osteoblásticas e endoteliais é necessária para o resultado positivo do processo reparador (Stegen et al., 2015; Laranjeira et al., 2012).

O estímulo à angiogênese está relacionado com a produção de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, incluindo fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas que atuam para manter a quiescência da microvasculatura responsável pelo desenvolvimento endotelial (Folkman, 1995; Virtej *et al.*, 2013; Saghiri et al., 20015). Uma ampla variedade de fatores angiogênicos endógenos é descrita na literatura tais como o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF- $\beta$ , *basic fibroblastic growth factor*), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, *vascular endothelial growth factor*), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, *-derived growth factor*), fator estimulador de granulócitos (G-CSF, do inglês *granulocyte-colony stimulating factor*), fator de crescimento placentário (PIGF, *placental growth factor*), fator de crescimento dos hepatócitos (HGF, *hepatocyte Growth Factor*), a Angiopoetina (AGT), a proliferina, o TGF- $\alpha$ , o TGF- $\beta$ , o TNF- $\alpha$  e a IL-8 (Folkman, 1995; Virtej *et al.*, 2013).

Pesquisas recentes demonstraram a presença dos fatores pró-angiogênicos FGF- $\beta$  e VEGF nas lesões perirradiculares humanas (Moldauer *et al.*, 2006; Bletsa, *et al.*, 2012; Virtej *et al.*, 2016). A Angiopoetina (AGT) se liga aos receptores das células endoteliais, fazendo com que elas produzam fatores de migração, proliferação e diferenciação das células periendoteliais que irão envolver os tubos de endotélio, sustentar e definir a arquitetura dos vasos, bem como permitir a maturação dos mesmo (Saghiri *et al.*, 2015).

O VEGF é o fator essencial para a diferenciação do sistema vascular, sendo um potente mitógeno para as células endoteliais, pois pode promover a sua proliferação e migração. O VEGF-A é membro da família VEGF, que inclui também VEGF-B, C, e D, que são expressos no tecido pulpar, tendo efeito

autócrino e parácrino (Saghiri et al., 2015; Bletsa, et al., 2012; Virtej et al., 2013). A produção do VEGF pode ser induzida em células endoteliais, células epiteliais, macrófagos, linfócitos e fibroblastos por diversos estímulos, tais como Lipopolissacarídeos, citocinas inflamatórias (IL-1, IL-8, TNF- $\alpha$ ), fatores de crescimento (TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  e PDGF) e hipóxia tecidual. Nesta situação, as células produzem o fator de transcrição HIF (hipoxia inducible factor) que estimula a secreção de VEGF (Dvorak et al., 1995; Hanaha & Folkman, 1996). A presença de VEGFs e seus receptores em osteoblastos e osteoclastos sugere uma ligação entre o crescimento vascular e a remodelação óssea (Virtej et al., 2013). Estudos recentes em modelo animal de periodontite apical demonstraram a presença do VEGF e seus receptores nos vasos sanguíneos, bem como em macrófagos, PMN, fibroblastos. VEGF-R 2 e 3 também foram encontrados em osteoclastos (Virtej et al., 2013).

Outro importante fator envolvido na angiogênese é o FGF- $\beta$  e também está relacionado a patogênese das lesões periapicais (Saghiri et al., 2015).. Este fator de crescimento, reconhecidamente um fator angiogênico, além de estimular a neoformação vascular, pode participar da formação do tecido de granulação e da ativação das células epiteliais, culminando na formação cística. (Moldauer et al, 2006) Além disso, induz a proliferação de fibroblastos durante fase de reparo tecidual (Moldauer et al., 2006). Pode também aumentar a proliferação de células endoteliais e a sua organização na rede capilar (Saghiri et al., 2015).

Citocinas, quimiocinas e metaloproteinases são também mediadores importantes da angiogênese (Leonardi et a., 2003). Quimiocinas e seus receptores tais como CCL2/MCP-1, CCL4, CXCR4 e CCR6 são um grupo especializado de citocinas que coordenam o movimento dos leucócitos para dentro e através dos tecidos. Elas estão envolvidas em uma série de processos biológicos, incluindo a homeostase, angiogênese e ativação e regulação imunológica (Bryant et al., 2015). A proteína quimiotática de monócitos, CCL2/MCP-1, está associada à quimiotaxia e diferenciação de osteoclastos, enquanto medeia o recrutamento de monócitos para sítios inflamatórios ósseos (Sette-Dias et al., 2016; Virtej et al., 2016). A expressão de CCL2 pode desencadear a migração de células endoteliais e a neoformação vascular (Virtej et al., 2016).



Citocinas como, IL-1 e TNF- $\alpha$  são indutores conhecidos de respostas angiogênicas, enquanto a IL-6 demonstrou-se promotora da angiogênese dependente de VEGF em sítios tumorais (Leonardi *et al.*, 2003). O IFN- $\gamma$  é uma importante citocina pró-inflamatória liberada principalmente por células T em resposta a estimulação antigênica (Sette-Dias *et al.*, 2016). Está envolvida na ativação de macrófagos e células endoteliais e também na regulação da resposta imune específica, potencializando muitas das ações do TNF- $\alpha$  sobre as células endoteliais (Cardoso *et al.*, 2010). O TNF- $\alpha$  sustenta o crescimento de tumores e dos vasos sanguíneos por meio da estimulação de fatores angiogênicos, tais como o VEGF e a IL-8 (Virtej *et al.*, 2016). Além do seu papel na osteoclastogênese, a IL-8 influencia na angiogênese ao intensificar a resposta vascular na periodontite apical (Li, *et al.*, 2003).

Estudos relatam uma estreita correlação entre angiogênese e lesões inflamatórias crônicas, tais como as lesões periapicais (Santos, 2000). Na presença de um estímulo inflamatório, a expressão de RANK-L aumenta nos tecidos periodontais e periapicais, aumentando a permeabilidade endotelial e estimulando a angiogênese (Moldauer *et al.*, 2006; Cardoso *et al.*, 2010; Li, *et al.*, 2003). As metaloproteinases da matriz são um grupo de enzimas importantes na angiogênese (Saghiri *et al.*, 2015).

Outro fator relacionado, a MMP-9 é uma enzima que atua na inflamação aguda e crônica e em doenças neoplásicas. É principalmente secretada por neutrófilos, embora macrófagos, células T, mastócitos e odontoblastos também podem secretar esta enzima. A MMP-9 é essencial para se iniciar o processo de reabsorção osteoclástica, removendo camada colágena da superfície óssea antes do início da desmineralização. Evidências sugerem que a MMP-9 poderia desempenhar um papel importante no desenvolvimento e progressão da lesão (Wan *et al.*, 2014).

No entanto, ainda não há informações claras sobre a regulação da angiogênese na patogênese das lesões periapicais antes e após a instituição da terapia endodôntica (Yamanaka *et al.*, 2012, Saghiri *et al.*, 2015, Bletsa, *et al.*, 2012; Virtej *et al.*, 2013), apesar de muitos estudos terem procurado compreender a dinâmica dos mecanismos de angiogênese que se processam neste sítio (Stashenko *et al.*, 1998; Kawashima *et al.*, 2007; Bletsa, *et al.*, 2012; Saghiri *et al.*, 2015; Virtej *et al.*, 2016).

O estímulo à angiogênese está relacionada com a produção de fatores pró-angiogênico e citocinas (Folkman, 1995; Virtej *et al.*, 2013; Saghiri *et al.*, 20015). Neste estudo, procurou-se avaliar, por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT), fatores pró-angiogênicos e citocinas, com o intuito de subsidiar uma melhor compreensão do papel destes fatores na resposta imune periapical que se processa na presença da infecção endodôntica e após a instituição da terapêutica clínica (redução da carga microbiana intracanal).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Quantificar fatores pró-angiogênicos e citocinas relacionadas, expressos em tecidos perirradiculares, na presença da infecção endodôntica e após a instituição da terapêutica endodôntica (redução da carga microbiana intracanal) por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT),

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Quantificar a expressão gênica dos fatores pró-angiogênicos e citocinas Angiopoetina-1 (AGT1), Fator de crescimento endotelial vascular-A (VEGF-A), Fator de crescimento fibroblástico básico (FGF- $\beta$ ), Proteína quimiotática de monócitos (CCL2/MCP-1), Proteína-inflamatória de macrófagos-1 $\beta$  (CCL4), C-X-C Receptor de quimiocina tipo 4 (CXCR4), C-C Receptor de quimiocina 6 (CCR6), TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, IL-6, RANK-L e MMP-9.
- Relacionar os níveis de expressão de fatores pró-angiogênicos e citocinas com a presença de infecção nos SCR (imediatamente após a instrumentação dos SCR).
- Relacionar os níveis de expressão de fatores pró-angiogênicos e citocinas sete dias após a instituição da terapia endodôntica (após redução da carga microbiana).

### **3. METODOLOGIA EXPANDIDA**

#### **3.1 Etapa clínica**

##### **3.1.1 Seleção dos pacientes**

Foram selecionados 20 pacientes ( $n=20$ ) em uma amostra de conveniência conforme Brito *et al.* (2012) , com indicação de tratamento endodôntico primário, que apresentavam dentes com necrose pulpar e lesões periapicais radiograficamente detectáveis. O diagnóstico de necrose pulpar foi realizado por meio de exames clínicos e radiográficos. A coleta das amostras foi realizada na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG). A cada paciente foi apresentado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A), constando as informações sobre o objetivo da presente pesquisa. As coletas foram realizadas naqueles indivíduos que concordaram em participar do estudo e que possuíam um dente com indicação de tratamento endodôntico que se enquadrasse no grupo amostral proposto acima. Como critérios de exclusão, elegeu-se a utilização de medicação sistêmica antimicrobiana e anti-inflamatória nos três meses que antecederam a coleta ou, pacientes que apresentassem quaisquer desordem sistêmica. Após o exame clínico, os dados coletados foram anotados em uma ficha clínica padrão.

##### **3.1.2 Coleta das amostras clínicas**

O dente selecionado, após os procedimentos clínicos iniciais, teve sua coroa clínica completamente isolada usando um dique de borracha (isolamento absoluto). A coroa clínica foi submetida aos procedimentos de desinfecção pelo método proposto por Möller (1966), que consiste em utilizar água oxigenada 10 volumes por cinco minutos, tintura de iodo a 5% por cinco minutos e, posteriormente, tiosulfato de sódio a 5% por mais cinco minutos. A limpeza e formatação do sistema de canais radiculares foi realizada por meio de limas de NiTi ProTaper Universal (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland), com o calibre final do canal correspondendo a lima F2, associado à irrigação com

hipoclorito de sódio (2,5%). As amostras foram coletadas imediatamente após a instrumentação. Para isso, como descrito por *de Brito et al. (2012)*, três cones de papel absorvente #20, um de cada vez, no interior do conduto de maior calibre, ultrapassando-se o forame radicular em dois milímetros (2 mm) e mantido durante dois minutos, para que o mesmo entre em contato com os tecidos perirradiculares. Posteriormente, os quatro milímetros (4 mm) da porção apical de cada cone foi seccionada, os cones foram inseridos em um eppendorf e armazenados no freezer - 80°. Nenhuma medicação intracanal foi utilizada entre as sessões e o acesso coronário do elemento dental foi selado com cimento à base de óxido de zinco e eugenol (IRM®, Dentsply, Ballaigues, Switzerland). Após 7 dias, o selamento foi removido e o fluido intersticial periapical foi novamente coletado para se caracterizar os fatores pró-angiogênicos e citocinas após a redução da carga microbiana. Semelhante a primeira coleta, três cones de papel absorvente foram inseridos no conduto de maior calibre, seccionados a 4mm, inseridos no eppendorf e armazenados no freezer -80°. Em dentes com múltiplos canais, a primeira e a segunda coleta (sete dias após a primeira) foram realizadas no mesmo canal radicular. Nesse momento, os dentes que não apresentaram nenhum sinal ou sintoma clínico foram obturados por meio da técnica de condensação lateral.

## **3.2 Etapa laboratorial**

### **3.2.1 Identificação da expressão de fatores pró-angiogênicos e citocinas**

#### **3.2.1.1 Extração do RNA**

As amostras armazenadas em eppendorf, congelados á -80°C, foram processadas para a extração do RNA. A cada eppendorf foi adicionado 500µL de Trizol (*GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA*) e, utilizando um triturador elétrico (IKA T10 basic – Merse – SP, Brasil, foi realizada a homogeneização da amostras. As amostras foram incubadas por 10 minutos no gelo, para permitir a completa dissociação de complexos nucleoprotéicos. Em seguida adicionou-se 100 µl de Clorofórmio de alta qualidade em cada amostra. As amostras foram novamente incubadas por 3 minutos no gelo e



centrifugadas a 12.000 xg por 15 minutos a 2° a 8°C. Após a centrifugação a mistura foi separada em uma fase inferior rosa (fenolclorofórmio), uma fase intermediária e uma fase aquosa transparente. A fase aquosa foi transferida para microtubos contendo 250µl de Isopropanol (Merck, São Paulo, Brasil) de altíssima qualidade, vortexadas e incubada no gelo. Após 10 minutos, as amostras foram centrifugadas por 12.000 xg por 10 minutos a 2°C a 8°C. Nesse momento, foi observada a precipitação de um pellet transparente, ao lado e no fundo do tubo, e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi adicionando 500 µl de etanol 75% a cada amostra, os microtubos foram levados ao vórtex para soltar o pellet e novamente as amostras foram centrifugadas a 7.500 xg por 5 minutos de 2° a 8°C. Os sobrenadantes foram novamente descartados e os microtubos foram emborcados sobre um papel de filtro, por 10 minutos para secar o pellet. Após os 10 minutos, os pellets foram ressuspensos em 50 µl de água de alta qualidade DEPC (Dietil pirocarbonato, SIGMA® Chemical Co., Louis, MO, EUA), e armazenadas em freezer a -70°C.

### **3.2.1.2 Quantificação do mRNA**

A solução contendo o mRNA foi lida em espectrofotômetro (Nanodrop®/ND 1000 Wilmington-Delaware, EUA), com comprimento de onda de 260/280OD. Utilizando-se a fórmula  $[\text{mRNA-mg/mL}] = \text{DO}_{260} \times \text{diluição} \times 40$ , obteve-se a quantificação do mRNA de cada amostra (2 µl de amostra no local adequado do equipamento).

### **3.2.1.3 Preparo de cDNA por Transcrição Reversa**

Foi preparada uma solução com os seguintes reagentes:

1. DNTPs (mistura a 2,5 mM).....1,25 µL
2. Reverse Transcriptase Buffer..... 2,50 µL.
3. 0,1 M Dithiothreitol (DTT).....1,00 µL
4. Rnasin (inibidor de Rnase)..... 0,25 µL
5. Oligo dT<sub>15</sub> 1/10 - 7.5 pMoles.....1,00 µL

As amostras de RNA foram acrescidas de 12 µL da solução acima descrita, aquecidas a 70°C por 5 minutos e subsequentemente resfriadas em gelo por 5 minutos. As amostras foram acrescidas de 3 µL de Transcriptase Reversa (12,5 U/reacção – 25 U/reacção), e deixadas em temperatura ambiente, por 5 minutos. As amostras foram incubadas a 37°C durante uma hora, aquecidas a 90°C por 5 minutos e resfriadas em gelo por 5 minutos. A reacção final foi diluída, adicionando-se 87,5 µL de água destilada, sendo a seguir estocadas a – 20°C.

### 3.2.1.4 Detecção e quantificação dos fatores angiogênicos e citocinas

A quantificação dos fatores pró-angiogênicos e citocinas AGT1, VEGF-A, FGF-β, CCL2/MCP-1, CCL4, CXCR4, CCR6, TNF-α, IFN-γ, IL-17, IL-10, IL-6, RANK-L e MMP-9 foi realizada pelo Real-Time PCR (PCR-RT), amplificando-se o mRNA e quantificando-se o cDNA provenientes das amostras clínicas. O GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) foi utilizado como gene normalizador. As sequências de primers humanos foram projetados utilizando o software PRIMEREXPRESS (*Applied Biosystems, Foster City, CA*) com base em sequências de nucleótidos disponíveis na base de dados GenBank.

A Tabela 1 mostra as sequências dos primers utilizados.

**Tabela 1:** Primers utilizados para detecção da expressão dos fatores pró-angiogênicos e citocinas.

Gene	Sequência (5'-3')	Mt* (°C)	bp*
<b>GAPDH</b>	FW 5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3'	65	96
	RV 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'		
<b>AGT1</b>	FW 5'-ACA GTT TGG CAA TTG GAA GCA-3'	65	152
	RV 5'-CAC CCA GAT GAC TCC AAG ATC AG-3'		
<b>VEGF-A</b>	FW 5'-ATC TGC ATG GTG ATG TTG GA-3'	71	214
	RV 5'-GGG CAG AAT CAT CAC GAA GT-3'		
<b>FGF-β</b>	FW 5'-GAG AAG AGC GAC CCT CAC A-3'	62	71
	RV 5'-TAG CTT TCT GCC CAG GTC C-3'		

<b>CCL2/MCP-1</b>	FW 5'- AAG ACC ATT GTG GCC AAG GA -3' RV 5'- CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3'	80	93
<b>CCL4</b>	FW 5'- TCT CCT CAT GCT AGT AGC TGC CTT-3' RV 5'- GCT TCC TCG CAG TGT AAG AAA AG-3'	78	101
<b>CXCR4</b>	FW 5'- TGT TGG CTG AAA AGG TGG TC -3' RV 5'- AAA GAT GTC GGG AAT AGT C -3'	80	71
<b>CCR6</b>	FW 5'- GGA CTG AGA GCC CTG GAA AG - 3' RV 5'- CTT GAA TGG CAG ACA CTC ACA GT - 3'	55	95
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	FW 5'-TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G- 3' RV 5'-TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG- 3'	54	76
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	FW 5'-GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA-3' RV 5'-TGC AGG CAG GAC AAC CAT TA-3'	80	95
<b>IL-17</b>	FW 5'-CAA TGACCT GGA ATT ACC CAA- 3' RV 5'-TGA AGG CAT GTG AAA TCG AGA- 3'	70	52
<b>IL-10</b>	FW 5'-GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3' RV 5'-TCC CCC AGG GAG TTC ACA T- 3'	62	107
<b>IL-6</b>	FW 5'- GGA GAC TTG CCT GGT GAA- 3' RV 5'- CTG GCT TGT TCC TCA CTA CTC-3'	80	76
<b>RANK-L</b>	FW 5'- CAT CCC ATC GGG TTC CCA TAA -3' RV 5'-CCT TAG TTT TCC GTT GCT TAA CGA C -3'	73	203
<b>MMP-9</b>	FW 5'-CCT GGA GAC CTG AGA ACC AAT C-3' RV 5'-GAT TTC GAC TCT CCA CGC ATC T-3'	63	139

FW (*forward primer*), RV (*reverse primer*).

\*Mt: melting temperature; bp: base pairs of amplicon size.

### 3.3 Análise dos dados

Todos os dados obtidos foram analisados utilizando-se o SPSS (SPSS Inc., version 15.0, Chicago, IL, USA). Os dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar sua normalidade. O teste de Wilcoxon foi utilizado para determinar diferenças estatísticas ( $P < 0,05$ ) pois os dados não apresentaram um padrão de distribuição normal.

### **3.4 Aspectos éticos**

Foram observados os aspectos éticos da Resolução 196/96, sendo a pesquisa aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 54215515.4.0000.5149/ Parecer:1.566.680).

## **4. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

### **4.1 Artigo 1: “Analysis of pro-angiogenic factors and cytokines in response to endodontic infection.”**

#### **Analysis of pro-angiogenic factors and cytokines in response to endodontic infection.**

Caroline Christine Santa-Rosa<sup>1</sup>, Marcela Carvalho Espaladori<sup>1</sup>, Julia Mourão Braga Diniz<sup>1</sup>, Luciana Carla Neves de Brito<sup>2</sup>, Leda Quercia Vieira<sup>3</sup> e Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Dentistry, Fundação Universidade de Itaúna (FUI), Itaúna, MG, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.



## **Abstract**

**Background/Aims:** This study aimed to evaluate the expression of pro-angiogenic factors and related cytokines in two clinical conditions: immediately after the chemical and mechanical preparation of the root canal system (corresponding to the response to the infection) and seven days later (restrained bacterial load). **Material and Methods:** It was selected twenty patients with indications for primary endodontic treatment in their teeth and that who presented with pulp necrosis were evaluated. Samples were collected from periapical interstitial fluid adjacent to root canal system. Pro-angiogenic factors and cytokines, including AGT1, VEGF-A, FGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 and IL-6, were analysed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The expression of the mediators that were evaluated showed a significant increase in the levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and AGT1 on day 7 compared to day 0 ( $P < 0.05$ ). For VEGF-A, FGF- $\beta$ , IL-17 and IL-6, the mRNA expression of these factors were similar at both time points ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** Following the cleaning and shaping of the root canal system, there was a clear increase in the mRNA expression levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10 and AGT1, which are important mediators involved in angiogenesis.

**Keywords:** Endodontic treatment, angiogenesis, endodontic infection, angiogenic factors, cytokines.

## Introduction

The progression and development of pulpal and periapical pathologies are closely related to the presence of microorganisms and their by-products. The periapical inflammatory response, which occurs in this region, recruits immunocompetent cells to contain and prevent the spread of infection to other sites (1-3). This culminated in the formation of a chronic lesion and the concomitant reabsorption of adjacent periodontal support tissues (1-3).

Angiogenesis is identified as an essential factor in the pathogenesis of chronic lesions and is related to the establishment and maintenance of the lesion, since newly formed blood vessels supply the continuous demand of nutrients and oxygen by the proliferating cells and contribute to the inflammation (4). Otherwise, the bone healing process requires a coordinated coupling between osteogenesis and angiogenesis involved in a multistep process that includes migration, proliferation, and differentiation of several cell types such as endothelial, fibroblasts, osteoblasts and osteoclasts (5). Angiogenesis promotes efficient blood supply and is a prerequisite to support and sustain the bone development and maintenance (6), during the healing periapical process.

Angiogenesis is related to the synthesis of a constant source of cytokines, chemokines and proteases associated to the tissue repair that follows root canal system (RCS) infection resolution (7-8). During the healing process, angiogenic capillary sprouts permeate the fibrin/fibronectin-rich wound clot and, within a few days, they are organized into a microvascular network throughout the granulation tissue. As collagen accumulates in the granulation tissue to produce a scar, the density of blood vessels diminishes (9). A dynamic interaction occurs among endothelial cells, angiogenic cytokines, such as Angiopoietin-1 (AGT1), Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), Basic fibroblastic growth factor (FGF- $\beta$ ), mast cell and the extracellular matrix (ECM) environment. Specific endothelial cell receptors are critical for morphogenetic changes in blood vessels during wound repair (9).

The stimulus that induces angiogenesis is related to the production of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors, including growth factors (4). AGT1 binds to endothelial cell receptors that support and define vessel architecture (Saghiri et al., 2015). VEGF is the essential factor for vascular system

differentiation and is a potent mitogen for endothelial cells besides promoting their proliferation and migration. FGF- $\beta$  can also increase endothelial cell proliferation and its organisation into the capillary network (10). IFN- $\gamma$  is involved in the activation of macrophages and endothelial cells and regulates the specific immune response, potentiating many of the actions of TNF- $\alpha$  on endothelial cells (11). Furthermore, TNF- $\alpha$  supports the growth of tumours and blood vessels through the stimulation of angiogenic factors such as VEGF and IL-8, an important angiogenic chemokine (8,12). IL-6 has also been shown to be a promoter of VEGF-dependent angiogenesis in tumour sites and, together with IL-17, promotes osteoclastogenesis (13-14).

Several studies have suggested that angiogenic factors are involved in the repair of the dentin-pulp complex (4), but studies on the regulation promoted by these factors in the healing of periapical lesions are still scarce (15). The aim of this study was to evaluate the expression of pro-angiogenic factors and related cytokines, including AGT1, VEGF-A, FGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10 and IL-6, in two clinical conditions: immediately after the chemical and mechanical preparation of the root canal system (corresponding to the response to the infection) and seven days after (the beginning of the healing process). The null hypothesis of this study is that after root canal system cleaning, the pro-angiogenic mediators will be overexpressed, as well as the related cytokines.

## **Materials and Methods**

### *Human subjects*

Twenty patients (n = 20) between the ages of 18 and 80 years with indications for primary endodontic treatment were selected. Clinical samples were taken from teeth with pulp necrosis and apical periodontitis, which were diagnosed based on clinical, radiographic analyses and pulp sensibility tests. Teeth did not present acute periapical symptoms at the time of the appointment. The sample of periapical interstitial fluid adjacent to root canal infections was performed at the Endodontics Clinic of Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG). The exclusion criteria were

as follow: the use of systemic antibacterial and anti-inflammatory medications within the three months before collection or individuals who were diagnosed with any previous systemic disorder. All participants signed the Free Agreement Formulary. This study was conducted by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 54215515.4.0000.5149/ Parecer:1.566.680).

### *Sample collection*

The clinical samples were collected according to previously described methodology (16). Briefly, after the isolation and disinfection of the clinical crown of each tooth (17), the root canal system was cleaned and shaped using ProTaper Universal NiTi files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland), with the final file size corresponding to F2, in association with sodium hypochlorite a 2.5% as irrigation solution. The samples were collected immediately after root canal cleaning to characterize the pro-angiogenic factors and cytokines expression profile. After cleaning and drying, three paper points (# 20) were introduced into the root canal RCS, passing passively through the root apex two millimetre (2 mm). The paper points remained there for two minutes. The paper points were cut at final four millimetres (4 mm) from the tip, placed of the absorbent cones were cut and inserted into an Eppendorf microcentrifuge tube, and were immediately stored frozen at -80°C. Using this procedure, RNA was extracted from the periapical interstitial fluid. No endodontic dressing was inserted into the root canal between sessions. The coronary access cavities of the teeth were to the dental element was restored using an eugenol-based cement (IRM®, Dentsply, Ballaigues, Switzerland). Seven days later (day 7), the teeth coronary cavities were opened, and the periapical interstitial fluid was sampled again, to characterise the pro-angiogenic factors and cytokines in teeth with restrained root canal bacterial loads (the beginning of the healing process). Single and multiple root teeth were included in this study. Both uniradicular and multiradicular teeth were selected. In teeth with multiple canals, the first (day 0) and second (day 7) sample collections were performed in the same canal. At this time, no teeth exhibited clinical signs or symptoms,

and the root canals were filled using the lateral condensation compaction technique.

#### *Preparation of the samples*

Total RNA was extracted from each sample with TRIzol reagent (GIBCO/BRL Laboratories, Grand Island, NY) as previously described (18). The RNA was then stored at -70°C.

#### *Real-Time Polymerase Chain Reaction*

Complementary DNA was synthesised using 1 µg of RNA by the reverse transcription reaction as described (19). The human primer sequences were designed using the PRIMER EXPRESS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) based on available nucleotide sequences in the GenBank database. The primer sequences used for the quantification of the RT-PCR of pro-angiogenic factors AGT1, VEGF-A, FGF-β, and the cytokines TNF-α, IFN-γ, IL-17, IL-10 and IL-6 are shown in Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) was performed according to the standard conditions: holding stage 95 °C (10 minutes), cycling stage with 40 cycles at 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). Real-time PCR was performed using the Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the SYBR-Green detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used to normalise the mRNA expression levels. All of the samples were run in duplicate in a reaction volume of 10 µl with 1 µg of the cDNA. Sequence Detection Software, version v 2.4.1 (Applied Biosystems) was used for data analysis after amplification. The results were obtained as the threshold cycle (Ct), which represents the number of times each fluorescence signal passes through a fixed threshold. The expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method (20). The Ct values are the means of two independent measurements, and the mRNA expression levels of the samples are the ratio of expression of the gene of interest to GAPDH.

## Statistical analysis

SPSS for Windows (version 15.0; SPSS, Chicago, IL, USA) was used to perform the data analysis. The data were subjected to with Shapiro-Wilk test to verify their normality. The Wilcoxon test was used to determine the statistical differences ( $P < 0.05$ ) because the data did not display a normal distribution pattern.

**Table 1.** Primers Sequences

Gene	Sequência (5'-3')	Mt* (°C)	bp*
<b>GAPDH</b>	FW 5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3'	65	96
	RV 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'		
<b>AGT1</b>	FW 5'-ACA GTT TGG CAA TTG GAA GCA-3'	65	152
	RV 5'-CAC CCA GAT GAC TCC AAG ATC AG-3'		
<b>VEGF-A</b>	FW 5'-ATC TGC ATG GTG ATG TTG GA-3'	71	214
	RV 5'-GGG CAG AAT CAT CAC GAA GT-3'		
<b>FGF-β</b>	FW 5'-GAG AAG AGC GAC CCT CAC A-3'	62	71
	RV 5'-TAG CTT TCT GCC CAG GTC C-3'		
<b>TNF-α</b>	FW 5'-TTC TGG CTC AAA AAG AGA ATT G- 3'	54	76
	RV 5'-TGG TGG TCT TGT TGC TTA AGG- 3'		
<b>IFN-γ</b>	FW 5'-GAA CTG TCG CCA GCA GCT AAA-3'	80	95
	RV 5'-TGC AGG CAG GAC AAC CAT TA-3'		
<b>IL-17</b>	FW 5'-CAA TGACCT GGA ATT ACC CAA- 3'	70	52
	RV 5'-TGA AGG CAT GTG AAA TCG AGA- 3'		
<b>IL-10</b>	FW 5'-GGT TGC CAA GCC TTG TCT GA-3'	62	107
	RV 5'-TCC CCC AGG GAG TTC ACA T- 3'		
<b>IL-6</b>	FW 5'- GGA GAC TTG CCT GGT GAA- 3'	80	76
	RV 5'- CTG GCT TGT TCC TCA CTA CTC-3'		

FW (*forward primer*), RV (*reverse primer*).

\*Mt: melting temperature; bp: base pairs of amplicon size.

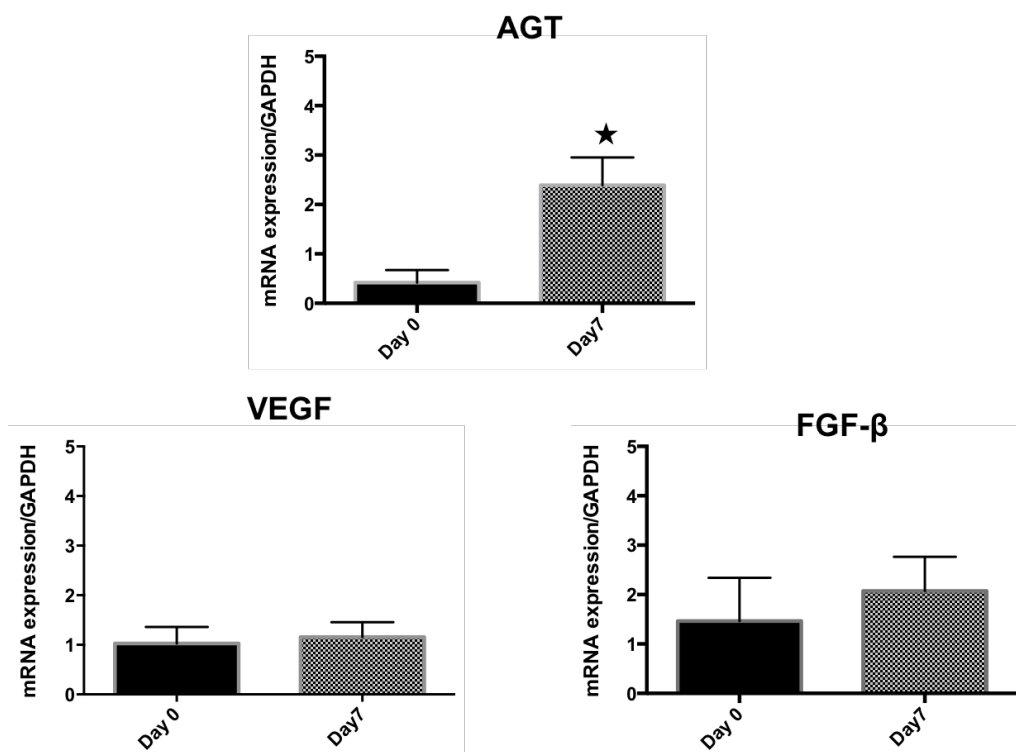
## Results

### *The mRNA expression of pro-angiogenic factors*

Levels of mRNA expression were determined by real-time PCR and were quantified by comparison with the internal control gene, GAPDH. The results revealed significant increases in the expression of AGT1 mRNA in teeth with restrained bacterial loads on day 7 (Day 7) when compared to the first collection on day 0 (Day 0) ( $P < 0.05$ ). However, the mRNA expression levels of VEGF-A and FGF- $\beta$ , was similar at both time points ( $P > 0.05$ ).

### *Cytokine mRNA expression*

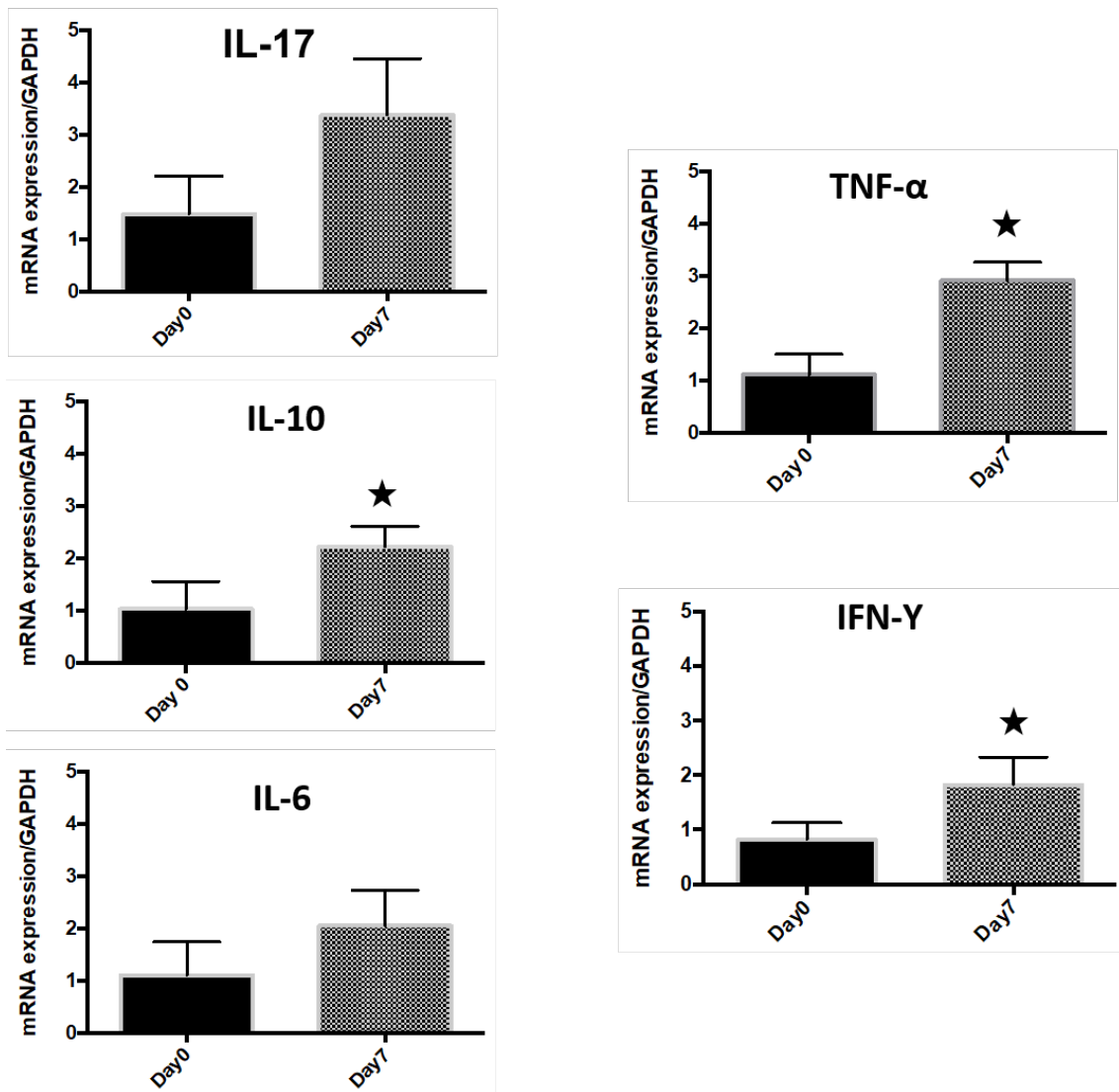
The analysis revealed a significant increase in the mRNA levels of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 on day 7 (Day 7) when compared to day 0 (Day 0) ( $P < 0.05$ ). As for IL-17 and IL-6, their mRNA expression was similar at both observed times ( $P > 0.05$ )(Fig. 2).



**Figure 1.** Expression of AGT1, VEGF-A and FGF- $\beta$  in the periapical tissues of patients with root canal infections. The expression levels were determined by

real-time PCR and quantified compared to the internal control (GAPDH). The bars represent significant sample values of 20 patients; the lines represent the standard error of the mean.

\* P <0.05 as determined by the Wilcoxon test.



**Figure 2.** Expression of TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-17, IL-10, and IL-6 in the periapical tissues of patients with root canal infections. The expression levels were determined by real-time PCR and quantified compared to the internal control (GAPDH). The bars represent significant sample values of 20 patients; the lines represent the standard error of the mean.

\* P <0.05 as determined by the Wilcoxon test.



## Discussion

Once installed in the root canal system, the microorganisms induce an immune response adjacent to the root apex. Conversely, as soon as infected root canal system is cleaned and shaped, the healing process initiates. Both occurrences are closely linked to angiogenesis (4).

AGT1 mRNA expression increased significantly on day 7 when compared to day 0. Angiopoietin binds to endothelial cell receptors, causing them to produce migration, proliferation and differentiation factors for the peri-endothelial cells that will envelop the endothelial tubes, sustain and define the architecture, and allow the maturation of blood vessels (4), a phenomenon of paramount importance in the healing processes and periapical bone remodelling. In agreement with the results of this study, it was demonstrated an increased expression of AGT1 in cells resembling fibroblasts, osteoblasts and immature osteocytes during bone remodelling in human periapical lesions (21).

The expression of factors involved in angiogenesis, such as FGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and VEGF, has already been shown in human periapical lesions (10,13,22). In this study, no significant changes were observed in the expression of mRNA levels of VEGF and FGF- $\beta$  when infected (day 0) and cleaned (day 7) root canals were compared. These findings suggest that, maybe, the sample time points were not sufficient to evidence the difference that was expected after the bacterial load reduction promoted by the cleaning and shaping procedures (23). VEGF is an essential factor for vascular system differentiation and a potent mitogen for endothelial cells, and also promotes their proliferation and migration (2,4,7). The expression of VEGF and their receptors on osteoblasts and osteoclasts suggests a link between vascular growth and bone remodelling (2). FGF- $\beta$  is a multifunctional polypeptide that promotes the growth and differentiation of a broad spectrum of cell types (7), and its role as a potent mitogenic and chemotactic factor to endothelial cells and fibroblasts. Additionally, may be critical in the pathogenesis of periapical lesions (10). Previous studies demonstrated that FGF- $\beta$  stimulates the formation of granulation tissue, angiogenesis and fibroblast mitosis during periapical lesion development (13). Conversely, it was evidenced that FGF- $\beta$

inhibits collagenolytic activity, *in vivo* (10), supporting its role in the wound healing.

TNF- $\alpha$  has numerous biological activities (14), including the ability to stimulate neoangiogenesis (8). As previously suggested, TNF- $\alpha$  leads to the production of secondary mediators, as well as platelet activation factor (PAF), VEGF and IL-8, which play an essential role in periapical inflammation and tissue healing (8, 24). This study showed that after reducing the root canal bacterial load (Day 7), there was an increase in the mRNA TNF- $\alpha$  expression. This suggests that TNF- $\alpha$  overexpression may induce VEGF synthesis in the subsequent time, stimulating the initiation and progression of angioproliferative processes leading to periapical healing (8, 25, 26).

IFN- $\gamma$  gene expression was also observed to increase significantly after the RCS cleaning and shaping procedures. This finding may be associated with the fact that this cytokine is an essential activator of macrophages and is involved in clearance that occurs in the periapical region (27). In human perirapical lesions, an increase in the expression of IFN- $\gamma$ , in interaction with TNF- $\alpha$ , was demonstrated after root canal cleaning and shaping (16), in agreement with the findings of this study. Studies have shown in periapical lesions, that IFN- $\gamma$  can interact with TNF- $\alpha$  and IL-1 to increase the level of cellular iNOS (28) and RANKL, which later modulate signalling between osteoblasts and osteoclasts (29). Conversely, the osteoprotective role of IFN- $\gamma$ , together with IL-10, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), and CCR5, was confirmed in mice with genetic ablations of the genes encoding for these factors (30).

Tregs act on effector immune cell through multiple mechanisms, including the secretion of inhibitory cytokines, such as IL-10 and TGF- $\beta$ , besides interfering with the metabolic function in effector cells (31,32). There is substantial evidence to support the perspective that angiogenesis and the immune response are mutually dependent (33). In present work, a high level of IL-10 expression was observed after root canal cleaning, which decreases the inflammatory immune response, supporting the healing that may be started at this time. This result is in agreement with those of previous studies that demonstrated the increase of this cytokine in the periapical tissues after the reduction of the intracanal microbial load (16,34). When analysed together,

increased AGT1 expression, simultaneously with increased, expression of IL-10, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  (the former stimulates the expression of angiological factors such as AGT1), demonstrates the importance of immune modulation in periapical tissues after endodontic therapy procedures.

Clinically, high levels of IL-17 are associated with several chronic inflammatory diseases including rheumatoid arthritis and multiple sclerosis (35-36). IL-17 is involved in bone resorption and stimulates the production of RANKL, which affects the activity and formation of osteoclasts, in addition, be a cytokine that work to increase the production of chemokines in several tissues, thereby leading to the recruitment of monocytes and neutrophils to the site of inflammation (37). In the present study, the IL-17 gene expression did not show a significant difference in the two-time points. In other words, the expression of this pro-inflammatory cytokine did not increase after cleaning and shaping procedures. This result reinforces that, after this clinical procedure, anti-inflammatory response should begin in the periapical site, as demonstrated elsewhere (16, 18, 37).

IL-6 is responsible for stimulating acute phase protein synthesis, as well as the production of neutrophils in the bone marrow. It supports the growth of B cells and is antagonist to regulatory T cells (38). It has also been shown to promote VEGF-dependent angiogenesis in tumour settings (8). Similar to what was observed to IL-17, IL-6 mRNA gene expression was similar at both time points analysed in this study. Results homologous to those observed in this study have been demonstrated elsewhere (16, 18, 37). Angiogenesis is a phenomenon that was related not only to the progression and development of periapical pathologies (4), but also, to the bone healing that was expected to occur after root canal cleaning and shaping (14). In this context, it was critical for this research to understand if the expression of the pro-angiogenic mediators and correlate cytokines were expressed in response to the former condition or the pro-inflammatory periapical response. The gene expressions of IL-17 and IL-6, which kept on constant after cleaning and shaping endodontic procedures, reinforce that angiogenesis in this study correlates with healing response, as expected.

The stimulus for angiogenesis is related to the production of pro-angiogenic and anti-angiogenic factors, including growth factors. This study

aims to reduce the lack of knowledge about the molecular mechanisms involved in the angioproliferative processes that occur in periapical tissues after instituting endodontic therapy. Following the cleaning and shaping procedures of the RCS, there was an evident increase in the mRNA expression of AGT1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 which are important mediators involved in angiogenesis.

### **Acknowledgements**

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), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico CNPq) and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq). The authors deny any conflicts of interest related to this study.

### **References**

1. Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6:89-96.
2. Virtej A, Løes S, Berggreen E, Bletsa A. Localization and signalling patterns of vascular endothelial growth factors and receptors in human periapical lesions. *J Endod.* 2013;39:605-11.
3. Márton IJ, Kiss C. Overlapping Protective and Destructive Regulatory Pathways in Apical Periodontitis. *J Endod.* 2014;40:155-63.
4. Saghiri MA, Asatourian A, Sorenson CM, Sheibani N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. *J Endod.* 2015;41:1–7.
5. Santos V. Technological advances in the treatment of wounds and some applications at home. IN: Duarte Y, editor. *Textbook Home care: a gerontological approach.* São Paulo: Atheneu; 2000. p. 265-306.
6. Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J.* 2014 May 16;8:56-65.

7. Bletsa A, Virtej A, Berggreen E. Vascular endothelial growth factors and receptors are up-regulated during development of apical periodontitis. *J Endod.* 2012;38:628–35.
8. Virtej A. Vascular endothelial growth factors and receptors – from normal dental pulp to apical pathology [Dissertation for the degree of philosophiae doctor (PhD) at the University of Bergen]. University of Bergen, Helse Vest; 2016.
9. Tonnesen MG, Feng X, Clark RA. Angiogenesis in wound healing. *J Investig Dermatol Symp Proc.* 2000 Dec;5(1):40-6.
10. Moldauer I, I Velez, S Kuttler. Upregulation of basic fibroblast growth factor in human periapical lesions. *J Endod.* 2006;32:408-11.
11. Cardoso FP, Viana MB, Ribeiro-Sobrinho AP, Diniz MG, Brito JAR, Gomes CC et al. Methylation Pattern of the IFN- $\gamma$  Gene in Human Dental Pulp. *J Endod.* 2010;36:642-46.
12. Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol.* 2003;170:3369-76.
13. Leonardi R, Caltabiano M, Pagano M, Pezzuto V, Loreto C, Palestro G. Detection of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor in periapical lesions. *J Endod.* 2003;29:180-183.
14. Cotti E, Schirru E, Acquas E, Usai P. An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis. *J Endod.* 2014;40:1902-11.
15. Yamanaka Y, Kaneko T, Yoshiba K et al. Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. *J Endod.* 2012;38:313–17.
16. Bambirra W Jr, Maciel KF, Thebit MM, de Brito LCN, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heatshock protein, and proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. *J Endod.* 2015;41:1085-90.
17. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. *Methodological studies. Odontol Tidskr.* 1966;74(5):Suppl:1-380.

18. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. *J Endod.* 2012;38:481-85.
19. 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.
20. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-8.
21. He JF, Xie ZJ, Zhao H, Ge WL, Hu JA, Li YN et al. Immunohistochemical and in-situ hybridization study of hypoxia inducible factor-1alpha and angiopoietin-1 in a rabbit model of mandibular distraction osteogenesis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 37:554–60.
22. Tyler LW, Matossian K, Todd R, Gallagher GT, White RR, Wong DT. Eosinophil-derived transforming growth factors (TGF-alpha and TGF-beta 1) in human periradicular lesions. *J Endod.* 1999; 25:619 –24.
23. Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK, Enersen M, Mdala I, Ørstavik D et al. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2017;44:106-10.
24. Dubois C, Bissonnette E, Rola-Pleszcynski M. Platelet activating factor enhances tumour necrosis factor production by alveolar macrophages: prevention by PAF-receptor antagonists and lipoxygenase inhibitors. *J. Immunol.* 1989;134:964.
25. Montrucchio G, Lupia E, Battaglia E, Passerini G, Bussolino F, Emanuelli G et al. Tumor Necrosis Factor c induced Angiogenesis Depends on In Situ Platelet-activating Factor Biosynthesis. *J Exp Med.* 1994;180: 377-382.
26. Shin MR, Kang SK, Kim YS, Lee SY, Hong SC, Kim EC. TNF-a and LPS activate angiogenesis via VEGF and SIRT1 signalling in human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2015;48:705–16.
27. Sette-Dias AC, Maciel KF, Abdo EN, de Brito LCN, Carvalho MA, Vieira LQ et al. Cytokine Expression in Patients Hospitalized for Severe Odontogenic Infection in Brazil. *J Endod.* 2016;42:706-10.
28. Chae HJ, Park RK, Chung HT, Kang JS, Kim, MS, Choi DY et al. Nitric oxide is a regulator of bone remodelling. *J Pharm Pharmacol.* 1997;49:897–902.

29. Silva MJB, Sousa LMA, Lara VPL, Cardoso FP, Júnior GM, Totola AH *et al.* The Role of iNOS and PHOX in Periapical Bone Resorption. *J Dent Res.* 2011;90: 495-500.
30. 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.
31. Shrestha S, Yang K, Guy C, Peter V, Geoffrey N, Hongbo C. Treg cells require the phosphatase PTEN to restrain TH1 and TFH cell responses. *Nat Immunol.* 2015;16:178–187.
32. Hu C, Jiang X. The effect of anti-angiogenic drugs on regulatory T cells in the tumour microenvironment. *Biomed Pharmacother.* 2017;88:134–137.
33. Ribatti D, Crivellato E. Immune cells and angiogenesis. *J Cell Mol Med.* 2009;13:2822–33.
34. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Nogueira PM, Vieira LQ, Sobrinho AP. Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. *Int Endod J.* 2014;48(6):533-4.
35. Matusevicius D, Kivisäkk P, He B, Kostulas N, Ozenci V, Fredrikson S, Link H. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 1999 Apr;5(2):101-4.
36. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med.* 2002 May;8(5):500-8.
37. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Teles FR, Teles RP, Vieira LQ *et al.* Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod.* 2012;38:1368–71.
38. Cohen S, Doyle WJ, Skoner DP. Psychological stress, cytokine production, and severity of upper respiratory illness. *Psychosom Med.* 1999 Mar Apr;61(2):175-80.

## **4.2 Artigo 2: "Analysis of the expression of pro-angiogenic mediators in response to endodontic therapy."**

### **Analysis of the expression of pro-angiogenic mediators in response to endodontic therapy.**

Caroline Christine Santa-Rosa<sup>1</sup>, Marcela Carvalho Espaladori<sup>1</sup>, Luciana Carla Neves de Brito<sup>2</sup>, Leda Quercia Vieira<sup>3</sup> e Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho<sup>4</sup>.

<sup>1</sup> Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil

<sup>2</sup> Faculty of Dentistry, Fundação Universidade de Itaúna (FUI), Itaúna, MG, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Biochemistry and Immunology, Institute of Biological Sciences, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>4</sup> Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.



## Abstract

**Background/Aims:** Angiogenesis is identified as an essential factor in the pathogenesis of chronic periapical lesions and a prerequisite to support and sustain the bone development and maintenance, during the healing periapical process. This study aimed to evaluate the expression of pro-angiogenic factors and related cytokines in two clinical conditions: immediately after the chemical and mechanical preparation of the root canal system (corresponding to the response to the infection) and seven days later (restrained bacterial load).

**Material and Methods:** It was twenty patients with indications for primary endodontic treatment in their teeth and who presented with pulp necrosis were evaluated. The samples were collected from periapical interstitial fluid adjacent to root canal system. Pro-angiogenic factors and cytokines, including AGT1, VEGF-A, CCL2/MCP-1, CCL4, CXCR4, CCR6, MMP-9 e RANK-L, were analysed by real-time polymerase chain reaction (RT-PCR). **Results:** The expression of the mediators that were evaluated showed a significant increase in the levels of AGT, CCL2/MCP-1, CCL4, CCR6, MMP-9 and RANKL on day 7 compared to day 0 ( $P < 0.05$ ). For VEGF and CXCR4, the mRNA expressions of these factors were similar at both time points ( $P > 0.05$ ). **Conclusions:** This study demonstrated that cleaning and shaping of the root canal system, stimulate the gene expression of pro-angiogenic factor, chemokines and cytokines, all involved in the angioproliferative phenomena that occur in the periodontal tissues adjacent to the root canal system and that will lead to tissue healing after endodontic therapy.

**Keywords:** Endodontic treatment, angiogenesis, endodontic infection, angiogenic factors, cytokines.

## Introduction

Angiogenesis is identified as an essential factor in the pathogenesis of chronic periapical lesions and related to the establishment and maintenance of the lesion (1). After the institution of endodontic therapy, that is, the cleaning and shaping of the root canal system (RCS), angiogenesis is related to the tissue repair that follows this procedure (2). This is because that the resolution of the infection and consequent perirapical healing depends the newly formed blood vessels supply nutrients and oxygen demanded by the cicatricial process, with the synthesis of cytokines, chemokines and proteases (1,3,4,5).

In turn, cytokines, chemokines and metalloproteinases are also important mediators of angiogenesis (6). Chemokines and their receptors such as CCL2/MCP-1, CCL4, CXCR4 and CCR6 are a specialized group of cytokines that coordinate the movement of leukocytes into and through tissues. They are involved in a number of biological processes, including homeostasis, angiogenesis, and immune activation and regulation (7). The Matrix Metalloproteinases (MMP's) are enzymes involved in angiogenesis (8). MMP-9 is essential for initiating the osteoclastic reabsorption process by removing the collagen layer present on the bone surface before demineralization begins (9).

Studies report a close correlation between angiogenesis and chronic inflammatory lesions, such as periapical lesions (5). In the presence of an inflammatory stimulus, RANK-IL expression increases in the periodontal and periapical tissues, increasing endothelial permeability in addition to stimulating angioproliferative phenomena (10,11,12).

In this context, the aim of this study was to evaluate the expression of pro-angiogenic factors, cytokines, chemokines and related metalloproteinases, including Angiopoietin-1 (AGT1), Vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A), Monocyte Chemoattractant Protein-1 (CCL2/MCP-1), Macrophage inflammatory protein-1 $\beta$  (CCL4), C-X-C chemokine receptor motif 4 (CXCR4), C-C chemokine receptor motif 6 (CCR6), RANK-L and MMP-9, using real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), under two clinical conditions: immediately after the chemical mechanical preparation of root canal system (corresponding to the response to the infection present) and, seven days after (restrained bacterial load). The null hypothesis of this study is that after root canal system

cleaning, the pro-angiogenic mediators will be overexpressed, as well as the related cytokines, chemokines and metalloproteinases.

## **Materials and methods**

### *Human subjects*

Twenty patients (n = 20) between the ages of 18 and 80 years with indications for primary endodontic treatment were selected. Clinical samples were taken from teeth with pulp necrosis and apical periodontitis, which were diagnosed based on clinical, radiographic analyses and pulp sensibility tests detectable. Teeth did not present acute periapical symptoms at the time of the appointment. The sample of periapical interstitial fluid adjacent to root canal infections was performed at the Endodontics Clinic of Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG). The exclusion criteria were as follows: the use of systemic antibacterial and anti-inflammatory medications within the three months before collection or individuals who were diagnosed with any previous systemic disorder. All participants signed the Free Agreement Formulary. This study was conducted by the Research Ethics Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 54215515.4.0000.5149/ Parecer:1.566.680).

### *Sample collection*

The clinical samples were collected according to previously described methodology (13). Briefly, after the isolation and disinfection of the clinical crown of each tooth (14), the root canal system was cleaned and shaped using ProTaper Universal NiTi files (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) with the final file size corresponding to F2, in association with sodium hypochlorite a 2.5% as irrigation solution. After cleaning and drying, three paper points (# 20) were introduced into the root canal, passing passively through the root apex two millimetres (2 mm). The paper points remained there for two minutes. The paper points were cut at four millimetres (4 mm) from the tip, placed into microcentrifuge tube, and immediately stored at -80°C. Using this procedure,

RNA was extracted from the periapical interstitial fluid. No endodontic dressing was inserted into the root canal between sessions. The coronal access cavities of the teeth were restored using an eugenol-based cement (IRM®, Dentsply, Ballaigues, Switzerland). Seven days later (day 7), the teeth were opened, and the periapical interstitial fluid was sampled again, to characterize the pro-angiogenic factors, chemokines and cytokines in teeth with restrained root canal bacterial loads (the beginning of the healing process). In teeth with multiple canals, the first (day 0) and second (day 7) samples were collected from the same canal. At this time, no teeth exhibited clinical signs or symptoms, and the root canals were filled using the lateral compaction technique.

#### *Preparation of the samples*

Total RNA was extracted from each sample with TRIzol reagent (GIBCO/BRL Laboratories, Grand Island, NY) as previously described (15). The RNA was then stored at -70°C.

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

Complementary DNA was synthesized using 1 µg of RNA by the reverse transcription reaction as described (16). The human primer sequences were designed using the PRIMEREXPRESS software (Applied Biosystems, Foster City, CA) based on available nucleotide sequences in the GenBank database. The primer sequences used for the quantification of the RT-PCR of pro-angiogenic factors and the cytokines AGT1, VEGF-A, CCL2/MCP-1, CCL4, CXCR4, CCR6, MMP-9 e RANK-L are shown in Table 1. Polymerase chain reaction (PCR) was performed according to the standard conditions: holding stage 95 °C (10 minutes), cycling stage with 40 cycles at 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). Real-time PCR was performed using the Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the SYBR-Green detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene was used to normalize the mRNA expression levels. All of the samples were run in

duplicate in a reaction volume of 10 µl with 1 µg of the cDNA. Sequence Detection Software, version v 2.4.1 (Applied Biosystems) was used for data analysis after amplification. The results were obtained as the threshold cycle (Ct), which represents the number of times each fluorescence signal passes through a fixed threshold. The expression levels were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (17). The Ct values are the means of two independent measurements, and the mRNA expression levels of the samples are the ratio of expression of the gene of interest to GAPDH.

### *Statistical analysis*

SPSS for Windows (version 15.0, Chicago, IL, USA) was used to perform the data analysis. The data were analysed with the Shapiro-Wilk test to verify their normality. The Wilcoxon test was used to determine the statistical differences ( $P < 0.05$ ) because the data did not display a normal distribution pattern.

**Table 1.** Primers Sequences

<b>Gene</b>	<b>Sequência (5'-3')</b>	<b>Mt* (°C)</b>	<b>bp*</b>
<b>GAPDH</b>	FW 5'-GCA CCA CCA ACT GCT TAG CA-3'	65	96
	RV 5'-TGG CAG TGA TGG CAT GGA GGA-3'		
<b>AGT1</b>	FW 5'-ACA GTT TGG CAA TTG GAA GCA-3'	65	152
	RV 5'-CAC CCA GAT GAC TCC AAG ATC AG-3'		
<b>VEGF-A</b>	FW 5'-ATC TGC ATG GTG ATG TTG GA-3'	71	214
	RV 5'-GGG CAG AAT CAT CAC GAA GT-3'		
<b>CCL2/MCP-1</b>	FW 5'- AAG ACC ATT GTG GCC AAG GA -3'	80	93
	RV 5'- CGG AGT TTG GGT TTG CTT GT-3'		
<b>CCL4</b>	FW 5'- TCT CCT CAT GCT AGT AGC TGC CTT-3'	78	101
	RV 5'- GCT TCC TCG CAG TGT AAG AAA AG-3'		
<b>CXCR4</b>	FW 5'- TGT TGG CTG AAA AGG TGG TC -3'	80	71
	RV 5'- AAA GAT GTC GGG AAT AGT C -3'		
<b>CCR6</b>	FW 5'- GGA CTG AGA GCC CTG GAA AG - 3'	55	95
	RV 5'- CTT GAA TGG CAG ACA CTC ACA GT - 3'		

<b>RANK-L</b>	FW 5'- CAT CCC ATC GGG TTC CCA TAA -3'	73	203
	RV 5'-CCT TAG TTT TCC GTT GCT TAA CGA C -3'		
<b>MMP-9</b>	FW 5'-CCT GGA GAC CTG AGA ACC AAT C-3'	63	139
	RV 5'-GAT TTC GAC TCT CCA CGC ATC T-3'		

FW (*forward primer*), RV (*reverse primer*).

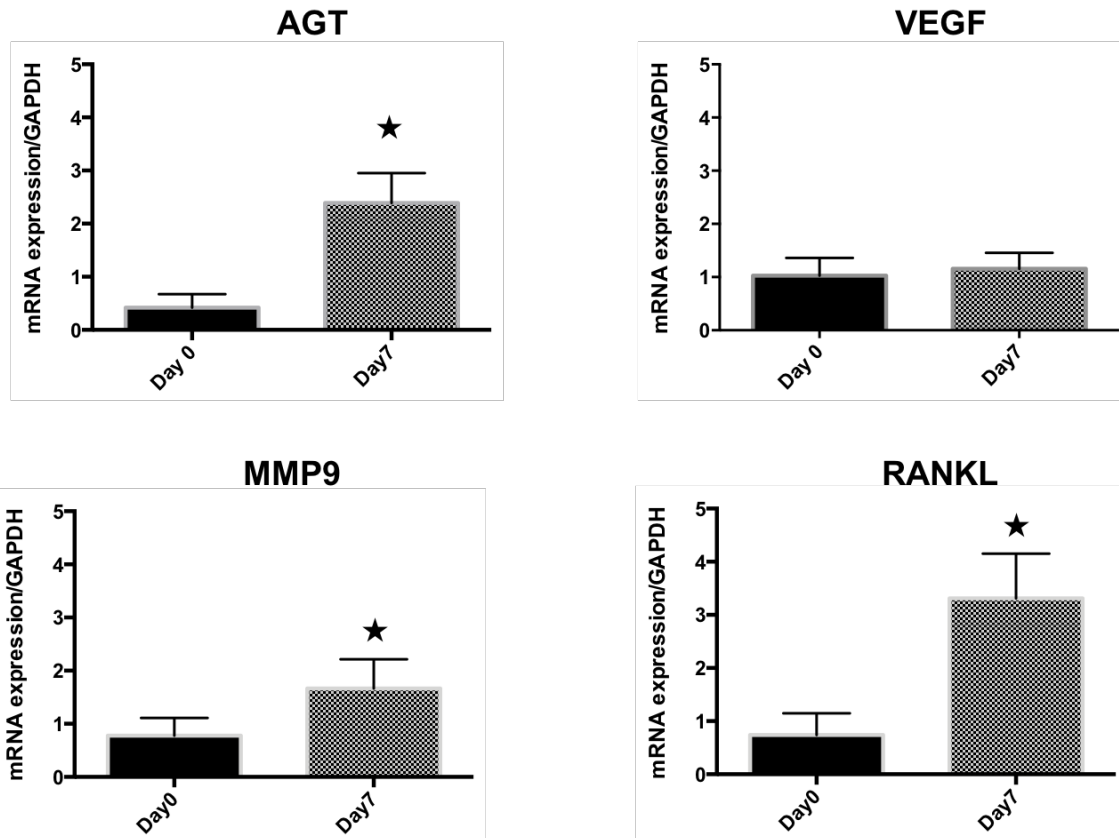
\*Mt: melting temperature; bp: base pairs of amplicon size.

## Results

### *The mRNA expression of pro-angiogenic factors and chemokines*

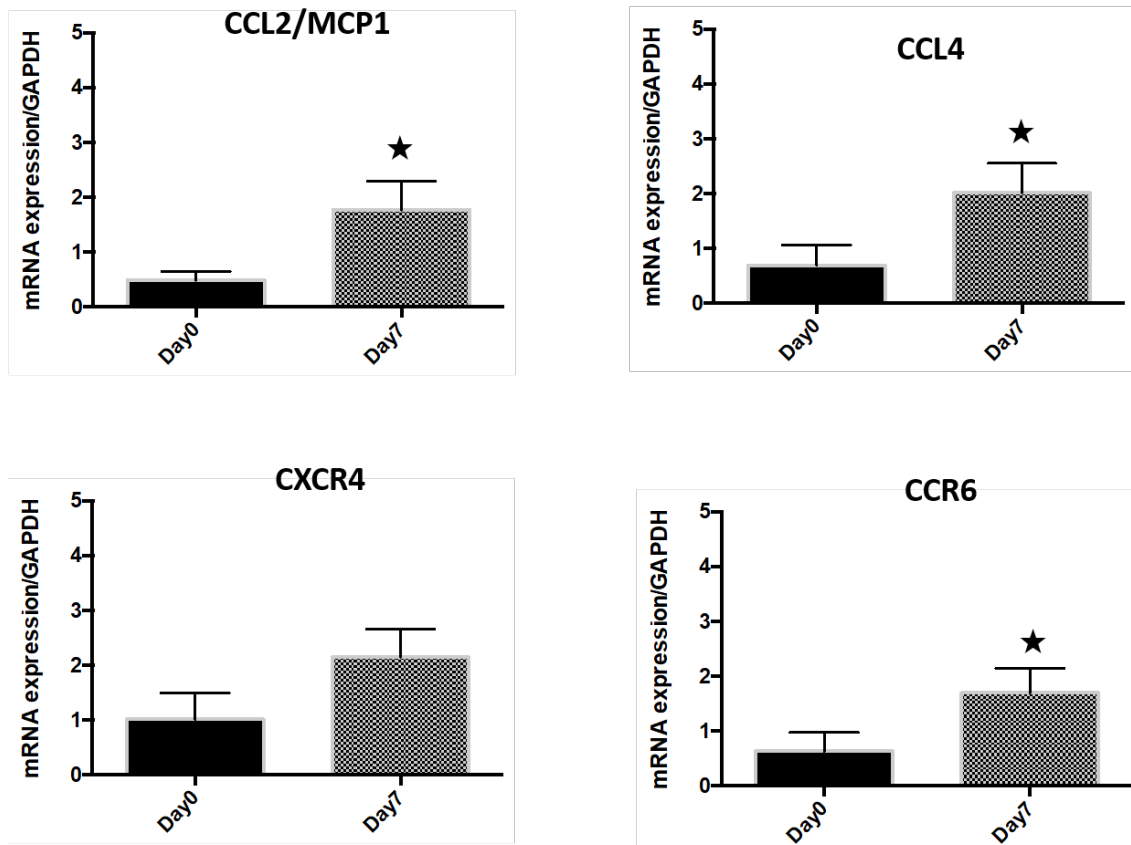
Levels of mRNA expression were determined by real-time PCR and quantified by comparison with the internal control gene, GAPDH. The results revealed significant increase in the expression of AGT1 mRNA in teeth with restrained bacterial load on day 7 (Day 7) when compared to the first collection on day 0 (Day 0). ( $P < 0.05$ ). However, the mRNA expressions levels of VEGF-A was similar in both observed times points ( $P > 0.05$ ) (Fig. 1). A significant increase was also observed in the mRNA levels of MMP-9 and RANK-L on day 7 (Day 7) when compared to day 0 (Day 0) ( $P < 0.05$ ) (Fig 1).

The analysis revealed a significant increase in the mRNA levels of CCL2/MCP-1, CCL4 and CCR6 mRNA on day 7 (Day 7) when compared to day 0 (Day 0). The mRNA expression levels of CXCR4 was similar in both observed times points ( $P < 0.05$ ) (Fig. 2).



**Figure 1.** Expression of AGT1, VEGF-A, MMP-9 and RANK-L in periapical tissues of patients with root canal infections. The expression levels were determined by real-time PCR and quantified as compared to the internal control (GAPDH). The bars represent significant sample values of 20 patients; the lines represent the standard error of the mean.

\* P < 0.05 as determined by the Wilcoxon test.



**Figure 2.** Expression of CCL2/MCP-1, CCL4, CXCR4, CCR6 in periapical tissues of patients with root canal infections. The expression levels were determined by real-time PCR and quantified as compared to the internal control (GAPDH). The bars represent significant sample values of 20 patients; the lines represent the standard error of the mean.

\* P < 0.05 as determined by the Wilcoxon test.

## Discussion

The presence of microorganisms and their by-products in the infected root canals stimulate the immune response of the host, in order to avoid the microbial spread through the periapical foramen. The cleaning and shaping procedures strongly reduce the bacterial load of the root canal allowing the periapical healing process to begin (3,18,19,20). Several cytokines and chemokines are involved in the immunological responses that occur during the development and repair of periapical lesions (3,21). In the present study, detectable gene expressions of AGT1, VEGF-A, CCL2/MCP-1, CCL4, CXCR4,



CCR6, MMP-9 and RANK-L were observed in the periapical interstitial fluid after RCS cleaning and shaping procedures (Day 0), as well as 7 days after (Day 7).

It is known that, the inflammatory response can not occur without the vascular components. Angiogenesis has been identified as an essential factor in the pathogenesis of chronic periapical lesions, being related to the establishment and maintenance of these lesions (1). Newly formed blood vessels supply the continuous demand for nutrients and oxygen by proliferating cells and contribute to inflammation by being a constant source of cytokines, chemokines and proteases (1). After the removal of the microbial agents inside the RCS, the vascular phenomena will be involved in periapical microbial clearance and in the productive phenomena that will lead to healing. In this study, after the reduction of the intracanal microbial load (Day 7), significantly increased gene expression of AGT1 pro-angiogenic factor, was observed in comparison with the zero time samples (Day 0). Such a result undoubtedly demonstrates that RCS cleansing and shaping has a positive impact in inducing increased expression of this mediator. Angiopoietins are groups of proteins that participate in angiogenesis and lymphangiogenesis (22,23). In addition, other factors, such as different neuropeptides, including calcitonin gene-related peptide (CGRP), neuropeptide Y (NY), substance P (SP), and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) may induce expression of factors of angiogenic growth, modulating vascular phenomena in periapical lesions (23).

VEGF is considered to be one of the main regulators of vascular permeability and inducer of angiogenesis (24). In this study, VEGF mRNA expression did not change after bacterial load was reduced in RCS. These results seem to be based on the literature, when it is known that the expression of this mediator increases vascular permeability and is partially involved in the accumulation of inflammatory cells (6), and expression dependent on the aggression suffered by the perirapical tissues. In addition, Nonaka et al. (25) have demonstrated that VEGF expression is closely related to the intensity of inflammatory infiltrate in periapical inflammatory lesions.

Vascular phenomena, more specifically angiogenic ones, inexorably relate to the migration of cells to sites that deal with microbial infection or, conversely, during phenomena that will culminate in post-infection healing. Thus, angiogenesis and the expression of chemotactic factors are related

phenomena. The chemotactic monocyte protein, CCL2/MCP-1, is associated with chemotaxis and osteoclast differentiation, while mediating the recruitment of monocytes to inflammatory bone sites (3,5). Increased expression of CCL-2 may trigger endothelial cell migration and vascular neoformation (5). Thus, the relation between chemokine and angiogenic phenomena (5) is observed. In the present study, the CCL2/MCP-1 gene expression increased significantly on day 7 (Day 7) when compared to day 0 (Day 0), as demonstrated elsewhere (3,5). This result demonstrates that the cleaning and shaping procedures stimulated the expression of this mediator, promoting the monocytic migration to the perirapical site, which will facilitate the post disinfection clearance of RCS, in parallel to the findings obtained with respect to AGT1. In addition, CCL2/MCP-1 is associated with chemotaxis and osteoclast differentiation, probably through interaction with the CCR2 receptor (11).

CCL4 and CXCR4 are involved in many biological processes, including organ development, homeostasis, angiogenesis, and immune activation and regulation (7). In this study, expression of CCL4 mRNA increased significantly on day 7 (Day 7) when compared to day 0 (Day 0) ( $p < 0.05$ ), while the CXCR4 receptor gene expression was similar at both time points ( $P < 0.05$ ). CCL4 is chemotactic for monocytes (26). Taken together with CCL2/MCP1 and AGT1 expressions, such results demonstrate the participation of these mediators in the processes that occur after the reduction of the intracanal microbial load. In turn, CXCR4 is a natural ligand of ubiquitin (26), a protein that is highly conserved among eukaryotic cells and that acts as an anti-inflammatory immune modulator (27). Non-modification of the expression of this receptor after the established clinical procedures may be related once again to the time of sample collection, when the pro-inflammatory mediators still prevail during periradicular microbial clearance that will be succeeded by tissue healing. Probably, at a later time, its expression will increase, since the cicatricial processes will already be prevailing.

CCR6 belongs to a subclass of receptors that binds CCL20 chemokine, regulating immune function by mediating memory T cell responsiveness and directing immune cells to the sites of infection (28,29,30,31). The CCR6-CCL20 axis plays an important role in the progression and pathogenicity of various diseases, in both mice and humans (29,30,31). In this study, the gene

expression of CCR6 increased significantly on day 7 (Day 7) when compared to day 0 (Day 0) ( $p < 0.05$ ). According to previous findings (27), the participation of this receptor in tumor angiogenesis is demonstrated, since its overexpression increases VEGF levels.

The matrix metalloproteinases are a group of enzymes that act in the degradation of the extracellular matrix of the vessel walls, allowing the migration of endothelial cells (5). The collagen degradation activity promoted by these enzymes allows the endothelial cells to invade the basement membrane of the vascular structures (32). The results of this study demonstrate that there was a significant increase in MMP-9 expression on day 7 (Day 7) when compared to day 0 (Day 0). In agreement, MMP-9 expression has been shown to be more significant in periapical lesions than in normal periodontal ligament (9,33,34,35,36).

A significant increase in RANKL gene expression on day 7 (Day 7) was observed when compared to day 0 (Day 0). It has been shown that RANKL increases endothelial permeability in addition to stimulating angiogenesis, and it reveals that these effects are dependent on endothelium-derived NO (7). RANKL levels in the vascular area may lead directly to endothelial activation and may make an important contribution to the occurrence of angiogenesis-dependent inflammatory vascular diseases, as well as the healing process.

In conclusion, this study demonstrated that cleaning and shaping procedures by reducing the microbiota present in RCS stimulated the gene expression of pro-angiogenic factor (AGT), chemokines and cytokines (CCL2, CCL4, CCR6 and RANKL), as well as metalloproteinases (MMP-9). All are involved in the angiogenic phenomena that occur in the periodontal tissues adjacent to the infected root canal system and that will lead to tissue healing after endodontic therapy.

## **Acknowledgements**

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), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento

Tecnológico CNPq) and Pró-Reitoria de Pesquisa da UFMG (PRPq). The authors deny any conflicts of interest related to this study.

## References

1. Bletsa A, Virtej A, Berggreen E. Vascular endothelial growth factors and receptors are up-regulated during development of apical periodontitis. *J Endod.* 2012;38:628–35.
2. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol.* 2004 Dec;19(6):363-70.
3. Sette-Dias AC, Maciel KF, Abdo EN, et al. Cytokine Expression in Patients Hospitalized for Severe Odontogenic Infection in Brazil. *J Endod* 2016;42:706-10.
4. 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.
5. Virtej A. Vascular endothelial growth factors and receptors – from normal dental pulp to apical pathology [Dissertation for the degree of philosophiae doctor (PhD) at the University of Bergen]. University of Bergen, Helse Vest; 2016.
6. Leonardi R, Caltabiano M, Pagano M, Pezzuto V, Loreto C, Palestro G. Detection of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor in periapical lesions. *J Endod.* 2003;29:180-183.
7. Bryant VL, Slade CA. Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy. *Immunol Cell Biol* 2015;93:364–71.
8. Saghiri MA, Asatourian A, Sorenson CM, Sheibani N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. *J Endod.* 2015;41:1–7.
9. Wan C, Yuan G, Yang J, Sun Q, Zhang L, Zhang J, Zhang L, Chen Z. MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis. *J Endod.* 2014 May;40(5):658-64.

10. Min JK, Cho YL, Choi JH, Kim Y, Kim JH, Yu YS, Rho J, Mochizuki N, Kim YM, Oh GT, Kwon YG. Receptor activator of nuclear factor (NF)-kappaB ligand (RANKL) increases vascular permeability: impaired permeability and angiogenesis in eNOS-deficient mice. *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1495-502.
11. Menezes R, Garlet TP, Letra A, Bramante CM, Campanelli AP, Figueira Rde C, Sogayar MC, Granjeiro JM, Garlet GP. 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 the lesions. *J Endod*. 2008 Aug;34(8):932-8.
12. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol*. 2011 Jan 17;3.
13. Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr*. 1966;74(5):Suppl:1-380.
14. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. *J Endod*. 2012;38:481-85.
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. de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Nogueira PM, Vieira LQ, Sobrinho AP. Immunological profile of periapical endodontic infections from HIV- and HIV+ patients. *Int Endod J*. 2014;48(6):533-4.
17. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc*. 2008;3(6):1101-8
18. Bakhshayesh 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
19. Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK et al. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod* 2017;44:106-10.

20. Bambirra W Jr, Maciel KF, Thebit MM et al. Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heatshock protein, and proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. *J Endod* 2015;41:1085-90.
21. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod* 2011;37:1659-62.
22. Thurston G. Role of Angiopoietins and Tie receptor tyrosine kinases in angiogenesis and lymphangiogenesis. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):61-8.
23. El Karim IA, Linden GJ, Irwin CR, Lundy FT. Neuropeptides regulate expression of angiogenic growth factors in human dental pulp fibroblasts. *J Endod*. 2009;35(6):829-33.
24. Nagy JA, Benjamin L, Zeng H, Dvorak AM, Dvorak HF. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. *Angiogenesis*. 2008;11(2):109-19.
25. Nonaka CF, Maia AP, Nascimento GJ, de Almeida Freitas R, Batista de Souza L, Galvao HC. Immunoexpression of vascular endothelial growth factor in periapical granulomas, radicular cysts, and residual radicular cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;106(6):896-902.
26. Saini V, Marchese A, Majetschak M. CXC chemokine receptor 4 is a cell surface receptor for extracellular ubiquitin. *J Biol Chem*. 2010;285(20):15566-76.
27. Majetschak M. Extracellular ubiquitin: immune modulator and endogenous opponent of damage-associated molecular pattern molecules. *J Leukoc Biol*. 2011;89(2):205-19.
28. Zhu CC, Chen C, Xu ZQ, Zhao JK, Ou BC, Sun J, Zheng MH, Zong YP, Lu AG. CCR6 promotes tumor angiogenesis via the AKT/NF- $\kappa$ B/VEGF pathway in colorectal cancer. *Biochim Biophys Acta*. 2018 Feb;1864(2):387-397.
29. Liao F, Rabin RL, Smith CS, Sharma G, Nutman TB, Farber JM. CC-chemokine receptor 6 is expressed on diverse memory subsets of T cells and determines responsiveness to macrophage inflammatory protein 3 $\alpha$ . *J Immunol* 1999;162:186-94.

30. Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, Bridon JM, Oldham E, Ait Yahias S, Briere F, Zlotnik A, Lebecque S, Caux C. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188: 373– 86.
31. Kulkarni N, Meitei HT, Sonar SA, Sharma PK, Mujeeb VR, Srivastava S, Boppana R, Lal G. CCR6 signaling inhibits suppressor function of induced-Treg during gut inflammation. *J Autoimmun.* 2018 Mar;88:121-130.
32. Mäkelä M, Salo T, Uitto VJ, Larjava H. Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) of the oral cavity: cellular origin and relationship to periodontal status. *J Dent Res.* 1994 Aug;73(8):1397-406.
33. Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:127–32.
34. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas M, Edwards DR, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Eur J Oral Sci.* 2003 Apr;111(2):117-27.
35. Shin MR, Kang SK, Kim Y S, Lee SY, Hong SC, Kim EC. TNF- $\alpha$  and LPS activate angiogenesis via VEGF and SIRT1 signalling in human dental pulp cells. *Int Endod J.* 2015;48:705–16.
36. Campos K, Gomes CC, Farias LC, Silva RM, Letra A, Gomez RS. DNA Methylation of MMP9 Is Associated with High Levels of MMP-9 Messenger RNA in Periapical Inflammatory Lesions. *J Endod.* 2016 Jan;42(1):127-30.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A angiogênese é apontada como fator essencial na patogênese das lesões periapicais crônicas, estando relacionada ao estabelecimento e manutenção da lesão, como também, após a instituição da terapia endodôntica, qual seja, a limpeza e formatação do sistema de canais radiculares, relaciona-se ao reparo tecidual que se segue a este procedimento. A angiogênese está relacionada com a produção de fatores pró-angiogênicos e anti-angiogênicos, incluindo fatores de crescimento. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos permanecem pouco compreendidos.

Após os procedimentos de limpeza e modelagem do SCR, houve um evidente aumento na expressão gênica de fatores pró-angiogênicos e citocinas, tais como, AGT1, CCL2/MCP-1, CCL4, CCR6, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-10, RANK-L e MMP-9 todos envolvidos nos fenômenos angiogênicos que se processam nos tecidos periodontais adjacentes ao SCR infectado e que levarão à cicatrização tecidual após a terapia endodôntica. Para VEGF-A, FGF- $\beta$ , CXCR4, IL-17 e IL-6 as expressões de mRNA foram semelhantes em ambos tempos mensurados. A não modificação da expressão destes fatores após os procedimentos clínicos instituídos, pode se relacionar-se ao momento da coleta, quando os mediadores pró-inflamatórios ainda prevalecem durante o clearance microbiano perirradicular que será sucedido pela cicatrização tecidual.

Os resultados permitem concluir que, após a limpeza e instrumentação do SCR, houve aumento nos níveis de expressão de mRNA de importantes mediadores envolvidos nos fenômenos angioproliferativos e osteogênicos que se processam nos tecidos periodontais adjacentes ao SCR infectado e que levarão à cicatrização tecidual após a terapia endodôntica. No entanto, estudos longitudinais que analisem a expressão de mediadores envolvidos na angiogênese, em períodos mais prolongados que os aqui analisados, devem contribuir para uma melhor compreensão deste importante fenômeno.

Os achados desse trabalho podem certamente contribuir para pesquisas futuras levando-se em consideração que a angiogênese tem relação direta com a revascularização além de ser um possível alvo terapêutico em Endodontia.



## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Bakhshayesh 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.

Bambirra W Jr, Maciel KF, Thebit MM et al. Assessment of apical expression of alpha-2 integrin, heatshock protein, and proinflammatory and immunoregulatory cytokines in response to endodontic infection. *J Endod* 2015;41:1085-90.

Bletsa A, Virtej A, Berggreen E. Vascular endothelial growth factors and receptors are up-regulated during development of apical periodontitis. *J Endod* 2012;38:628–35.

Bryant VL, Slade CA. Chemokines, their receptors and human disease: the good, the bad and the itchy. *Immunol Cell Biol* 2015;93:364–71.

de Brito LCN, Teles FRF, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Ribeiro-Sobrinho AP. T-Lymphocyte and Cytokine Expression in Human Inflammatory Periapical Lesions. *J Endod* 2012; 38(4):481-85.

Cardoso FP et al. Methylation Pattern of the IFN- $\gamma$  Gene in Human Dental Pulp. *J Endod* 2010;36(4):642-46.

Colić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Mol Immunol* 2009; 47:101-13.

Dvorak HF et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hypermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol*, v. 146, n. 5, p. 1029-1039, May 1995.

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.

Folkman J. Seminars in Medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. *N Engl J Med*. 1995 Dec 28;333(26):1757-63.

Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996 Aug;68(3):353-64.

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

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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007 May;103(5):707-11.

Laranjeira MS, Fernandes MH, Monteiro FJ. Reciprocal induction of human dermal microvascular endothelial cells and human mesenchymal stem cells: time- dependent profile in a co-culture system. *Cell Prolif* 2012;45:320–34.

Leonardi R et al. Detection of vascular endothelial growth factor/ vascular permeability factor in periapical lesions. *J Endod* 2003;29(3):180-183.

Li A et al. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol*, 2003;170(6):3369-76.

Liu J, Kerns DG. Mechanisms of guided bone regeneration: a review. *Open Dent J*. 2014 May 16;8:56-65.

Mantovani A, Allavena P, Vecchi A, Sozzani S. Chemokines and chemokine receptors during activation and deactivation of monocytes and dendritic cells and in amplification of Th1 versus Th2 responses. *Int J Clin Lab Res* 1998;28:77-82.

Marcal JRB, 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.

Márton IJ, Kiss C. Overlapping Protective and Destructive Regulatory Pathways in Apical Periodontitis. *J Endod* 2014 Feb;40(2):155-63.

Moldauer I, I Velez, S Kuttler. Upregulation of basic fibroblast growth factor in human periapical lesions. *J Endod* 2006;32(5):408-11.

Moller AJ. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966;74(5):Suppl:1-380.

Rodrigues RCV, Zandi H, Kristoffersen AK et al. Influence of the Apical Preparation Size and the Irrigant Type on Bacterial Reduction in Root Canal-treated Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod* 2017;44:106-10.

Santos V. Technological advances in the treatment of wounds and some applications at home. IN: Duarte Y, editor. *Textbook Home care: a gerontological approach*. São Paulo: Atheneu; 2000. p. 265-306.

Saghiri MA, Asatourian A, Sorenson CM, Sheibani N. Role of angiogenesis in endodontics: contributions of stem cells and proangiogenic and antiangiogenic factors to dental pulp regeneration. *J Endod* 2015;41(6):1–7.

Sette-Dias AC, Maciel KF, Abdo EN, et al. Cytokine Expression in Patients Hospitalized for Severe Odontogenic Infection in Brazil. *J Endod* 2016;42:706-10.

Silva TA, Garlet GP, Lara VS, Martins W Jr, Silva JS, Cunha FQ. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:310-6.

Siqueira JF Jr, Rôças IN, Rosado AS. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. *Oral Microbiol Immunol*. 2004 Dec;19(6):363-70.

Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:89-96.

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

Stegen S, van Gestel N, Carmeliet G. Bringing new life to damaged bone: the importance of angiogenesis in bone repair and regeneration. *Bone* 2015;70:19–27.

Teixeira-Salum TB, Rodrigues DB, Gervasio AM, Souza CJ, Rodrigues V, Jr. and Loyola AM. Distinct Th1, Th2 and Treg cytokines balance in chronic periapical granulomas and radicular cysts. *Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* 2010;39:250-6.

Virtej A, Løes S, Berggreen E, Bletsa A. Localization and signaling patterns of vascular endothelial growth factors and receptors in human periapical lesions. *J Endod* 2013 Jan; 39:605-11.

Virtej A. Vascular endothelial growth factors and receptors – from normal dental pulp to apical pathology [Dissertation for the degree of philosophiae doctor (PhD) at the University of Bergen]. University of Bergen, Helse Vest; 2016.

Wan C et al. MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis. J Endod 2014 May;40(5):658-63.

Yamanaka Y et al. Expression of angiogenic factors in rat periapical lesions. J Endod 2012;38(3):313–17.

## 7. ANEXOS

### Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa de Doutorado “AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES ANGIOGÊNICOS EM LESÕES ENDODÔNTICAS PERIAPICAIS”. Será solicitado que leia este material de modo a garantir que está sendo informado da natureza deste estudo e de como será sua participação no mesmo, se concordar em fazê-lo. A assinatura deste termo irá indicar que você foi informado e que concorda em participar.

Um consentimento informado por escrito é solicitado pelas regulamentações, antes da participação em qualquer pesquisa, de forma a assegurar que o paciente entendeu a natureza e os riscos de sua participação e para que o mesmo possa decidir em participar ou não, de forma livre e esclarecida.

#### OBJETIVO

Os canais radiculares (canais da raiz do dente), quando saudáveis, não apresentam em seu interior a presença de bactérias. Contudo, na maioria das vezes, quando necessitam ser tratados, isto se deve à presença de bactérias que alcançaram o canal a partir de lesões de cárie, e atingem a região do osso causando as chamadas lesões periapicais. Este estudo avaliará de que maneira essas lesões acontecem em pacientes atendidos na clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG). O tratamento correto que o(a) Sr.(a) terá nessa clínica será a limpeza (desinfecção) e, posteriormente, obturação dos canais radiculares, ou seja, o preenchimento deste canal vazio com uma substância apropriada. O(A) Sr.(a) comparecerá a clínica no mínimo duas vezes para esse tratamento.

#### CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

Você está sendo convidado a participar deste estudo por que possui um dente que necessita de tratamento de canal, devido à presença de uma infecção. Para que decida ou não participar desta pesquisa, você deve entender o suficiente a respeito do protocolo, de modo a fazer um julgamento preciso.

Se houver alguma dúvida que você não tenha entendido sobre este estudo, após a leitura deste consentimento informado, por favor, dirija suas perguntas à Dentista Caroline Christine Santa Rosa. Este estudo terá sua parte clínica realizada na Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FOUFMG) e sua parte laboratorial no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética (COEP/UFMG).

Rubrica da pesquisadora \_\_\_\_\_

Rubrica do paciente \_\_\_\_\_

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

## PROCEDIMENTOS

Serão escolhidos 20 pacientes apresentando dentes com infecção de canal. Após tirar radiografia e definir o diagnóstico, os pacientes serão submetidos à coleta inserindo-se um cone de papel absorvente no interior dos canais radiculares. Todos os pacientes receberão tratamento de canal, a ser realizado na FOUFMG, situada na cidade de Belo Horizonte MG, obedecendo às normas da instituição. Após a coleta, as amostras serão levadas ao Laboratório de Microbiologia para serem processadas.

## RISCOS

Os riscos na participação da pesquisa são os mesmos referentes ao tratamento de canal, principalmente o aparecimento de dor ou inflamação durante o tratamento, que poderão ser diminuídos com o atendimento adequado ou de emergência. Caso necessite, a Dra. Caroline indicará o atendimento de emergência (ligar para ela se isto acontecer).

## BENEFÍCIOS

As informações obtidas com a sua participação podem resultar no melhor conhecimento dos fenômenos existentes nos pacientes portadores de infecção endodôntica (de canal).

## PARTICIPAÇÃO E COMPENSAÇÃO

O(A) Sr.(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação.

## DIREITO DE ABANDONAR O ESTUDO

A participação neste estudo é voluntária. Você tem o direito de se recusar em participar ou retirar-se do estudo a qualquer momento. Caso recuse, mesmo assim o seu dente será tratado normalmente.

## CONFIDENCIALIDADE DOS DADOS

Está garantida a confidencialidade das informações que você fornecer. As informações serão codificadas e mantidas em local reservado o tempo todo, tendo somente acesso às informações os pesquisadores que participam da pesquisa. Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, Prof. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, na Faculdade de Odontologia da UFMG e a outra será fornecida ao Sr. (a). Os dados e materiais utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos e após esse tempo serão destruídos.

Rubrica da pesquisadora \_\_\_\_\_

Rubrica do paciente \_\_\_\_\_

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

## AUTORIZAÇÃO

Antes de fornecer meu consentimento pela assinatura deste termo, os métodos foram explicados a mim e as minhas perguntas foram respondidas. Eu entendo que posso perguntar a qualquer momento e que estou livre para retirar-me deste estudo sem sofrer constrangimentos ou afetar meus cuidados odontológicos. Uma via assinada deste termo de consentimento me será concedida. Declaro ter lido e entendido os termos da pesquisa a ser realizada por:

- CAROLINE CHRISTINE SANTA ROSA - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, FACULDADE DE ODONTOLOGIA: AV: ANTÔNIO CARLOS, N° 6627. B: PAMPULHA – Belo Horizonte - MG.

E-mail: carolinesatarosa@yahoo.com.br. Telefone celular: (31) 99462-5812

- ANTÔNIO PAULINO RIBEIRO SOBRINHO - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, FACULDADE DE ODONTOLOGIA: AV: ANTÔNIO CARLOS, N° 6627. B: PAMPULHA – Belo Horizonte - MG.

E-mail: sobrinho.bhz@gmail.com

Assinatura do paciente

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

Assinatura da pesquisadora

(doutoranda) \_\_\_\_\_ Data \_\_ / \_\_ / \_\_

Assinatura do pesquisador

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

Qualquer dúvida referente aos aspectos éticos quanto à sua participação na pesquisa poderá ser esclarecida no COEP-UFMG ou na CONEP, que são os órgãos que regulam os direitos dos participantes:

Contato COEP - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (DEVE SER CONSULTADO EM CASO DE DÚVIDAS ÉTICAS): Av. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005 - Campus Pampulha - Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901. E-mail: coep@prpq.ufmg.br Telefone: (31) 3409-4592

Horário de atendimento: de 9:00 as 11:00 horas e de 14:00 as 16:00 horas.

Contato CONEP - COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA SEP/11 510 NORTE, Bloco A, 3º Andar Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde CEP: 70750-521 - Brasília-DF – Brasil.

Telefone: (61) 3315-5878.

Horário de atendimento: 8:00 as 18:00 horas.



## Anexo B - Parecer do Comitê de Ética



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

Projeto: CAAE – 542155/5.4.0000.5149

Interessado(a): Prof. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho  
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia  
Odontológica  
Faculdade de Odontologia- UFMG

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 11 de julho de 2016, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da expressão de marcadores angiogênicos em lesões endodônticas periapicais**", bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

Prof.ª Dr.ª Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG

**PARECER DO COLEGIADO**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação da expressão de marcadores angiogênicos em lesões endodônticas periapicais.

**Pesquisador:** Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

**Área Temática:** Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniente com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

**Versão:** 2

**CAAE:** 54215515.4.0000.5149

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

**Patrocinador Principal:** FUND COORD DE APERFEICOAMENTO DE PESSOAL DE NIVEL SUP

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 1.566.680

**Apresentação do Projeto:**

O complexo dentino-pulpar, constituído pelo órgão pulpar e paredes dentinárias circundantes, apresenta algumas particularidades, quando comparado a outros tecidos conjuntivos. Dentre estas, destaca-se o fato de se encontrar envolto por paredes rígidas, que limitam o estabelecimento do edema inflamatório. Outra característica relevante é o fato do órgão pulpar não apresentar uma circulação colateral, o que interfere nos mecanismos de defesa que aí se processam. A transposição das barreiras de proteção pulpar, cemento e esmalte, seja por fraturas, lesões cariosas, exposição pulpar, forames apicais entre outros, é o caminho pelo qual os microrganismos chegam à polpa. Ao atingir o interior do sistema de canais radiculares, instala-se uma infecção nesses sítios e o conseqüente desenvolvimento de lesões periapicais. A destruição óssea periapical resulta da ativação de mecanismos imunoinflamatórios em resposta à infecção do sistema de canais radiculares. A angiogênese é apontada como fator essencial na patogênese das lesões periapicais, estando relacionada ao seu estabelecimento e manutenção. Uma vez que os vasos sanguíneos neoformados suprem a contínua demanda de nutrientes e oxigênio pelas células em proliferação e contribuem para a inflamação por serem uma fonte constante de citocinas,

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SII 005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

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

**Telefone:** (31)3409-4592

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

Continuação do Parecer: 1.566.680

quimiocinas e proteases, estão também relacionada ao reparo tecidual que segue a sua resolução.

Metodologia:

Serão selecionados 20 pacientes na faixa etária de 18 a 70 anos com indicação de tratamento endodôntico primário que apresentem dentes com necrose pulpar e lesões periapicais radiograficamente detectáveis. As amostras serão coletadas em pacientes submetidos ao tratamento endodôntico em atendimento na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG). Os pacientes selecionados serão submetidos ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1), constando as informações sobre o objetivo da presente pesquisa. As coletas serão realizadas naqueles indivíduos que concordarem em participar do estudo e que possuem um elemento dental com indicação de tratamento endodôntico e que não estiverem utilizando medicação sistêmica três meses antes do procedimento ou apresentar qualquer desordem sistêmica. O dente selecionado, após os procedimentos clínicos iniciais, terá sua coroa clínica completamente isolada (isolamento absoluto) usando um dique de borracha, seguido de assepsia completa. A coroa será desinfetada de acordo com o método proposto por Möller (1966) (água oxigenada 10 volumes por cinco minutos, tintura de iodo a 5% por cinco minutos e, posteriormente, tiosulfato de sódio a 5% por mais cinco minutos). A limpeza e formatação dos canais radiculares será realizada através de Limas de níquel-titânio ProTaper (Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland), juntamente com hipoclorito de sódio a 5,2% como solução irrigadora. Depois de finalizada a instrumentação do SCR, como descrito por Brito et al. (2012), um cone absorvente será inserido em seu interior, ultrapassando o forame radicular em um milímetro, para que o mesmo entre em contato com os tecidos perirradiculares. Este cone será mantido em posição por 2 minutos e, após esse tempo, será cortado quatro milímetros a partir da ponta e será inserido em um eppendorf contendo 150 L de Trizol (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island, N.Y., EUA). Realizar-se-ão a homogeneização e centrifugação da amostra, sendo o sobrenadante mantido em gelo. Ao utilizar este procedimento, o mRNA será extraído a partir dos fluidos intersticiais periapicais. Nenhum curativo endodôntico será inserido nos canais radiculares após a instrumentação dos mesmos. O acesso coronário do elemento dental será restaurado com cimento à base de eugenol. Sete dias após esse procedimento os dentes serão abertos, e o fluido intersticial periapical será novamente coletado para caracterização dos marcadores angiogênicos após a redução da carga microbiana através da expressão do mRNA. Em dentes com múltiplos canais, a primeira e a segunda coleta (7 dias após a primeira) serão realizadas a partir do mesmo canal. Nesse momento os dentes que não apresentarem nenhum sinal ou sintoma clínico serão obturados através da técnica de condensação

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/N 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592

E-mail: [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br)



Continuação do Parecer: 1.566.680

lateral. Os sobrenadantes, mantidos em gelo anteriormente, serão transferidos para microtubos contendo 200 µl de clorofórmio. Serão então vortéxados e deixados em descanso por 15 minutos em gelo. Após centrifugados a 13.000 g, por 15 minutos a 4° C, as amostras serão ressuspensas em isopropanol e levadas ao freezer, permanecendo aí por 30 minutos, ou serão mantidas "overnight", em geladeira. As amostras serão novamente centrifugadas e os peletes serão ressuspensos em 1,0 ml de álcool a 95%, sendo em seguida vortéxadas. A quantificação dos marcadores angiogênicos VEGF, VEGFR-2, bFGF, MMP-9, IL-8 e Angiopoetina 1, será realizada pelo Real Time PCR, amplificando-se o mRNA e quantificando-se o cDNA provenientes das amostras clínicas. As sequências dos iniciadores utilizados para análise quantitativa do PCR-RT dos marcadores são apresentados na Tabela 1. As sequências de primers humanos serão projetados utilizando o software PRIMEREXPRESS (Applied Biosystems, Foster City, CA) com base em sequências de nucleótidos disponíveis na base de dados GenBank conforme Bambirra.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

avaliar, por meio de reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR-RT), os marcadores angiogênicos VEGF, VEGFR-2, bFGF, MMP-9, IL-8 e Angiopoetina 1, em lesões endodônticas com o intuito de fornecer subsídio para melhor compreensão do comportamento biológico dessa patologia frente ao fenômeno da angiogênese.

**Objetivo Secundário:**

- Verificar a presença dos marcadores angiogênicos VEGF, VEGFR-2, bFGF, MMP-9, IL-8 e Angiopoetina 1, por meio do PCR-RT, em lesões endodônticas periapicais;
- Verificar se os marcadores angiogênicos selecionados estão associados com o desenvolvimento da lesão periapical;
- Verificar se os níveis de marcadores angiogênicos estão associados com o desenvolvimento da lesão periapical;
- Quantificar os níveis dos marcadores angiogênicos selecionados, por meio do PCR-RT, em lesões endodônticas periapicais;
- Quantificar a expressão dos marcadores angiogênicos nas lesões perirradiculares após a instrumentação do SCR (em resposta a infecção endodôntica);
- Quantificar a expressão dos marcadores angiogênicos nas lesões perirradiculares sete dias após a primeira coleta (após a redução da carga microbiana);
- Correlacionar os níveis dos marcadores angiogênicos presentes em lesões endodônticas periapicais na presença da infecção dos SCR (imediatamente após a instrumentação dos SCR) e

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad. SI 005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

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

**Telefone:** (31)3409-4592

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

Continuação do Parecer: 1.566.680

sete dias após (após redução da carga microbiana).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Os riscos na pesquisa são os mesmos inerentes ao tratamento endodôntico como aparecimento de dor ou inflamação durante o tratamento endodôntico que poderão ser diminuídos com o atendimento adequado ou de emergência.

Benefícios:

- Verificar a presença dos marcadores angiogênicos VEGF, VEGFR-2, bFGF, MMP-9, IL-8 e Angiopoetina 1, por meio do PCR-RT, em lesões endodônticas periapicais;
- Verificar se os marcadores angiogênicos selecionados estão associados com o desenvolvimento da lesão periapical;
- Verificar se os níveis de marcadores angiogênicos estão associados com o desenvolvimento da lesão periapical.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa de Doutorado relevante para as áreas de Endodontia e Imunologia. Previsão de término em 30/06/2018.

Em Carta em resposta às recomendações solicitadas o pesquisador esclarece:

"Foram realizadas as seguintes alterações conforme solicitação enviada:

1. Deixar como título apenas TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.

Foi também retirado o logotipo da UFMG no TCLE do projeto original.

O título da pesquisa foi inserido no texto conforme a recomendação ("Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa de Doutorado "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES ANGIOGÊNICOS EM LESÕES ENDODÔNTICAS PERIAPICAIS". Será solicitado...)

Foi anexado novo TCLE e Projeto de pesquisa com as alterações citadas acima.

2. Em OBJETIVOS foi inserido entre parênteses o que são canais radiculares (canais da raiz do dente).

Foi substituído "lesões cariosas" por "lesões de cárie".

Foi substituído "essas lesões se processam" por "essas lesões acontecem".

3. Ainda em OBJETIVOS foi acrescentado frase final explicativa sobre o tratamento de canal conforme solicitado e a quantidade de vezes que o paciente deverá comparecer para o tratamento.

4. Invertida a frase "à Dentista Caroline".

5. Foram adequados os riscos no campo "RISCOS" na Plataforma Brasil.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/N 005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 1.566.680

Não foi acrescido o campo "RISCOS" no TCLE pois como explicado no Projeto de pesquisa, as amostras serão apenas coletadas em pacientes que estarão em atendimento na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG), portanto quem executa o tratamento endodôntico são os alunos de graduação, sob orientação dos professores responsáveis, presentes nessa clínica.

6. "A participação neste estudo não terá nenhum custo a sua pessoa" foi substituído por "O(A) Sr(a) não terá qualquer tipo de despesa para participar da pesquisa e não receberá remuneração por sua participação.

7. "Confidenciabilidade" foi substituído por "Confidencialidade".

8. "Uma cópia assinada deste termo de consentimento me será concedida" foi substituído por "Uma via assinada deste termo de consentimento me será concedida".

9. Foram incluídos campos de assinatura e endereços dos pesquisadores (doutoranda e pesquisador responsável).

Não foi incluído telefone de contato pois os pacientes são instruídos a entrar em contato com o aluno de graduação responsável pela execução do tratamento endodôntico em questão.

10. Foi retirado o endereço do COEP do meio do texto do TCLE deixando-o ao final de forma completa conforme solicitado.

11. Foi incluído campo de rubrica nas primeiras páginas do TCLE.

Na última página apenas os campos de assinaturas dos pesquisadores e do participante. Alteração da palavra "investigador" por "pesquisador".

12. Foi informado no projeto original e na metodologia da Plataforma Brasil a faixa etária dos participantes de pesquisa. Não foi necessário adição do TALE pois essa faixa de idade não estará incluída na pesquisa."

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

Presentes: Projeto de Pesquisa Plataforma Brasil, projeto de pesquisa original, folha de rosto (devidamente preenchida e assinada pelo coordenador da pesquisa e pelo diretor da Faculdade de Odontologia da UFMG), TCLE, parecer substanciado com aprovação da Câmara do Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas, carta de aprovação da Coordenadora do Colegiado de Pós-Graduação, carta resposta ao COEP-UFMG.

**Recomendações:**

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad S/N 005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br



Continuação do Parecer: 1.566.680

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadimplâncias:**

Somos favoráveis à aprovação do projeto "Avaliação da expressão de marcadores angiogênicos em lesões endodônticas periapicais" do Pesquisador Responsável Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECAROLINE.docx	11/06/2016 10:13:36	Telma Campos Medeiros Lorentz	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_644383.pdf	22/05/2016 15:30:39		Aceito
Outros	Cartaresposta.docx	22/05/2016 15:29:44	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Brochura Pesquisa	Projeto de doutorado.doc	22/05/2016 14:26:45	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de pesquisa final.doc	22/05/2016 14:25:51	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	22/05/2016 14:22:45	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Parecer consubstanciado.pdf	13/03/2016 09:07:03	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto.pdf	21/02/2016 13:49:02	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Doccamaradepartamental.pdf	15/02/2016 14:19:18	Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	22/12/2015	Antônio Paulino	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.566.680

Cronograma	Cronograma.docx	13:59:51	Ribeiro Sobrinho	Aceito
------------	-----------------	----------	------------------	--------

**Situação do**  
Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**  
Sim

BELO HORIZONTE, 11 de Julho de 2016

Assinado por:  
**Telma Campos Medeiros Lorentz**  
(Coordenador)

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