

ANDRESSA LAMARI DA SILVA PEREIRA REIS

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CITOCINAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *FUSOBACTERIUM*  
*NUCLEATUM* E *ENTEROCOCCUS*  
*FAECALIS*.

Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2011

Andressa Lamari da Silva Pereira Reis

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE  
CITOCINAS EM RESPOSTA À INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL POR *FUSOBACTERIUM*  
*NUCLEATUM* E *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.

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

Orientador: Prof. Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho.

Co-Orientador: Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli.

Faculdade de Odontologia – UFMG  
Belo Horizonte  
2011


R375a      Reis, Andressa Lamari da Silva Pereira  
2011      Avaliação da expressão gênica de citocinas em resposta a infecção  
T      experimental por *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis* /  
Andressa Lamari da Silva Pereira Reis. 2011.  
54 f.:il.  
Orientador: Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho  
Co-orientador: Jacques Robert Nicoli  
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais,  
Faculdade de Odontologia.  
1. Citocinas – uso terapêutico – Teses. 2. Expressão gênica - Teses.  
I. Ribeiro Sobrinho, Antônio Paulino. II. Nicoli, Jacques Robert  
III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia.  
IV. Título.


BLACK D047




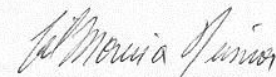
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE DONTOLOGIA  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

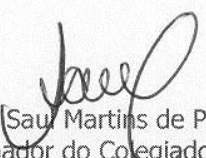
Dissertação intitulada "**Avaliação da expressão gênica de citocinas em resposta à infecção experimental por Fusobacterium nucleatum e Enterococcus faecalis**", área de concentração em **Endodontia**, apresentada por **Andressa Lamari da Silva Pereira Reis**, para obtenção do grau de **Mestre em Odontologia**, **APROVADA** pela Comissão Examinadora constituída pelos seguintes professores:

  
Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho  
FO-UFMG - Orientador

  
Dr. Jacques Robert Nicoli  
ICB-UFMG - Co-Orientador

  
Dra. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho  
ICB-UFMG

  
Dr. Gil Moreira Júnior  
FOUI

  
Prof. Dr. Saul Martins de Paiva  
Coordenador do Colegiado do  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Belo Horizonte, 27 de julho de 2011.

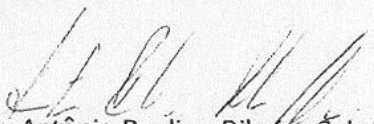



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de Odontologia  
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia  
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Pampulha  
Belo Horizonte – MG – 31.270-901  
Tel: (31) 3409 2470 Fax: (31) 3409 2472  
Email: posgrad@odonto.ufmg.br

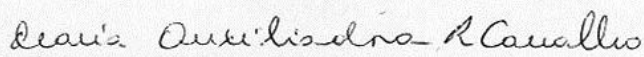


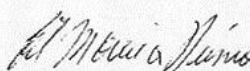
Ata da Comissão Examinadora para julgamento da Dissertação de Mestrado em Odontologia, área de concentração em **Endodontia**, da candidata **Andressa Lamari da Silva Pereira Reis**.

Aos 27 de julho de 2011, às 09:00 h, na sala de Pós-Graduação (3403) da Faculdade de Odontologia, reuniu-se a Comissão Examinadora, composta pelos professores Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Dr. Jacques Robert Nicoli, Dra. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho e Dr. Gil Moreira Júnior. O Professor Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Orientador da Dissertação, na qualidade de Presidente da sessão, apresentou a Comissão Examinadora e declarou abertos os trabalhos. À candidata foi dado o tempo de até 50 (cinquenta) minutos para fazer a exposição oral sobre o seu trabalho "**Avaliação da expressão gênica de citocinas em resposta à infecção experimental por *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis***". Encerrada a exposição, foi iniciada a argüição, dentro do limite de tempo de 30 (trinta) minutos, pelos Professores Dra. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, Dr. Gil Moreira Júnior, Dr. Jacques Robert Nicoli e Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, com limite de 30 (trinta) minutos para a resposta. Terminadas as argüições, o Presidente suspendeu os trabalhos por 10 minutos para que os examinadores pudessem decidir pelo resultado a ser dado à candidata. A Comissão Examinadora opta pela ..... da candidata. Para constar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada por mim, Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, Presidente e pelos demais membros desta comissão examinadora. Belo Horizonte, 27 de julho de 2011.

  
Dr. Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho  
FO-UFMG - Orientador

  
Dr. Jacques Robert Nicoli  
ICB-UFMG - Co-Orientador

  
Dra. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho  
ICB-UFMG

  
Dr. Gil Moreira Júnior  
FOUI

## **Dedicatória**

Ao meu amado e inesquecível pai, José Roberto, a pessoa que me ensinou a ser quem sou. Você me ensinou a lutar e nunca desistir. Sem você nada disso seria possível. Obrigada por cuidar de mim aí de cima. Você sempre fará parte de cada uma das minhas conquistas. Te amo muito!

## **Agradecimentos**

À minha mãe, Silvana, por tornar minha vida mais fácil, me dar grandes exemplos e ser minha fortaleza.

Às minhas irmãs, Angela e Carla, que eu amo tanto e são muito importantes pra mim.

Ao meu marido, Ricardo, pela paciência, amor, dedicação. Por ser meu maior incentivador, conselheiro e por estar sempre ao meu lado. Amo você.

Ao professor Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho, por me incentivar a descobrir os caminhos da pesquisa e por acreditar em mim.

À equipe do Laboratório de Gnotobiologia e Imunologia, em especial professora Leda Quércia Vieira.

Aos professores Luíz Macedo Faria e Maria Auxiliadora Roque de Carvalho por me receberem de forma tão gentil e cederem o laboratório e os ensinamentos de coração tão aberto.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, especialmente Renata, Jaqueline e José Sérgio, por toda a ajuda e pela amizade.

À Kamilla por ter feito parte dessa caminhada e ter se tornado uma amiga que vou levar comigo para sempre.

Aos amigos da endodontia. Obrigada pelos ensinamentos, pela ampliação dos horizontes e pelo carinho.

## Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (RANKL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e regulatórias (TGF- $\beta$  e IL-10) em resposta à infecção experimental em molares de camundongos Balb/c com os microrganismos *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), em mono ou em bi-associação. Os animais foram sacrificados após 10 e 20 dias, e os tecidos periapicais coletados, dosando-se a presença das citocinas por PCR em tempo real. Observou-se que a mono-infecção com o *F. nucleatum* induziu, no 10º dia, alta expressão de RANKL e TNF- $\alpha$  e que a modulação dessa resposta se deveu à IL-10. O *E. faecalis* provocou uma alta expressão de IFN- $\gamma$  no 20º dia, mas essa modulação observada na expressão do RANKL e TNF- $\alpha$  foi independente da IL-10 e TGF- $\beta$ . A bi-associação (*F. nucleatum* e *E. faecalis*) estimulou uma alta expressão das citocinas RANKL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , no 10º dia, que seria modulada pela presença aumentada do TGF- $\beta$ . Pode-se concluir que, neste modelo, a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias prevalece nos períodos iniciais de indução das alterações periapicais com concomitante redução no período tardio e isto se deve à modulação promovida pelas citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$ , mas de uma maneira infecção-específica.

Unitermos: Citocinas, bactéria Gram-positiva, bactéria Gram-negativa, lesão periapical.



## Abstract

Evaluation of cytokine gene expression in response to experimental infection by *Fusobacterium nucleatum* e *Enterococcus faecalis*

The aim of this study was evaluate the gene expression of proinflammatory (RANKL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) and regulatory (TGF- $\beta$  e IL-10) cytokines in response to experimental infection in Balb/c mice molars by microorganisms *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 10953) and *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) in single and bi association. The animals were sacrificed after 10 and 20 days, the periapical tissues were collected and the PCR real time dosed the cytokine expression. It was observed that the single infection with *F. nucleatum* induced high expression, on the 10<sup>o</sup> day, of RANKL and TNF- $\alpha$  and this response modulation was due to IL-10. *E. faecalis* caused high expression of IFN- $\gamma$  at 20<sup>o</sup> day, but this modulation in RANKL e TNF- $\alpha$  expression was independent of IL-10 e TGF- $\beta$ . The bi association (*F. nucleatum* e *E. faecalis*) encouraged high expression of RANKL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , on the 10<sup>o</sup> day, would be modulated by TGF- $\beta$  increased expression. It can be concluded that, in this model, gene expression of proinflammatory cytokines prevails in earlier periods of periapical changes induction with concomitant decrease in the late periods, and this is due to the regulatory cytokines IL-10 e TGF- $\beta$  modulation, but in a way infection-specific.

Unitherms: Cytokines, Gram-positive bacteria, Gram-negative bacteria, periapical lesion.

## **Lista de Figuras**

Tabela 1.....	pag 25
Gráfico 1.....	pag 27
Gráfico 2.....	pag 28
Gráfico 3.....	pag 29
Gráfico 4.....	pag 30
Gráfico 5.....	pag 31

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

APC: Célula apresentadora de antígeno

cDNA: Ácido desoxirribonucleico complementar

Ct: Limiar do ciclo (*threshold cycle*)

CV: Coeficiente de variação

DEPC: Dietil pirocarbonato

HPRT: *Gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase*

IFN- $\gamma$ : Interferon-gama

Ig : Imunoglobulina

IL: Interleucina

iNOS: óxido nítrico sintase

Limas K: Limas Kerr

LPS: Lipopolissacarídeo

M-CSF: Fator estimulador de colônia de macrófago

MDA: Amplificação múltipla de deslocamentos

MMP: Matriz metaloproteinase

mRNA: Ácido ribonucleico mensageiro

NK: *Natural killers*

NO: Óxido nítrico

OPG: Osteoprotegerina

PCR: Reação da cadeia da polimerase

PMNs: Neutrófilos polimorfonucleares

RANK: Receptor ativador do fator nuclear Kappa B

RANKL: Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B

SCR : Sistema de canais radiculares

TGF- $\beta$ : Fator de crescimento e transformação

Th: Linfócitos T-helper

TLRs: Receptores *Toll-like*

TNF- $\alpha$ : Fator de necrose tumoral-alfa

Treg: Linfócitos T regulatórios

UFC: Unidade formadora de colônias

## Sumário

1. Introdução.....	9
2. Revisão de Literatura.....	10
3. Objetivo.....	21
4. Materiais e Métodos.....	22
4.1 Caracterização do estudo.....	22
4.2 Animais.....	22
4.3 Microrganismos.....	22
4.4 Procedimentos operatórios e laboratoriais.....	22
4.4.1 Recuperação dos microrganismos.....	22
4.4.2 Preparo do Inóculo.....	23
4.4.3 Procedimento experimental.....	23
4.4.4 Inoculação bacteriana.....	23
4.4.5 Sacrifício dos animais e extração das amostras.....	24
4.4.6 Extração do RNA.....	24
4.4.7 Quantificação do mRNA.....	24
4.4.8 Obtenção dos cDNAs.....	24
4.4.9 Detecção e quantificação das citocinas.....	25
4.5 Análise dos dados.....	26
5. Resultados.....	27
6. Discussão.....	32
7. Síntese dos resultados.....	37
8. Conclusão.....	37
9. Referências.....	38

## 1. Introdução

A infecção dos SCR é necessária e suficiente para que ocorra a instalação e o desenvolvimento de uma lesão perirradicular. Seu desenvolvimento dependerá, contudo, da composição da microbiota infectante, bem como da resposta do próprio hospedeiro (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002; Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2005).

Os microrganismos e seus subprodutos ativam as células da imunidade inata e adaptativa que, em resposta, produzem citocinas, que são proteínas que medeiam muitas das funções dessas células (Hahn & Liewehr, 2007; Abbas *et al.*, 2007). Suas ações podem estimular uma resposta pró-inflamatória, como aquelas induzidas pela interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), o Interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), o ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANKL), dentre outras. Também ativam uma resposta anti-inflamatória e os processos de cicatrização tecidual, como aqueles induzidos pela interleucina 4 (IL-4), a interleucina-10 (IL-10), o fator de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ), dentre outros.

Em estudos posteriores a associação de diferentes bactérias resultou em perfis variados de liberação de citocinas, tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Acredita-se que tal resposta depende das características dos componentes polimicrobianos, visto que bactérias Gram-positivas e Gram-negativas estimularam de forma distinta a produção de citocinas e quimiocinas por células imunes (Khabbaz *et al.*, 2000; Horst *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2011)

Neste contexto, avaliou-se a expressão de citocinas pró-inflamatórias (RANKL, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ) em infecções endodônticas experimentais induzidas em camundongos Balb/c inoculados com *Fusobacterium nucleatum* e o *Enterococcus faecalis*, em mono ou em bi-associação.

## 2. Revisão de Literatura

O complexo dentino-pulpar encontra-se envolto pelo cemento e esmalte, que garantem-lhe proteção contra lesões físicas, químicas e biológicas. A transposição dessas barreiras de proteção, seja por fraturas, lesões cariosas, exposição pulpar, forames apicais e canais acessórios, é o caminho pelo qual os microrganismos chegam à polpa (Tronstad, 1992). A invasão dos microrganismos se dá pelos túbulos dentinários até o interior do sistema de canais radiculares, instalando-se uma infecção nestes sítios e desenvolvendo lesões periapicais (Haapsalo, 1993; Sundqvist, 1994; Gomes *et al.*, 1996; Siqueira *et al.*, 2001; Pinheiro *et al.*, 2003).

A destruição óssea periapical resulta da ativação de mecanismos imunoinflamatórios em resposta à infecção dos SCR. Esta correlação entre infecção e desenvolvimento das lesões perirradiculares foi demonstrada por Kakehashi *et al.* (1965). Eles compararam as respostas de polpas radiculares de ratos convencionais com aquelas dos isentos de germes quando expostas à cavidade oral. Observaram a presença de necrose pulpar e destruição óssea periapical somente nos ratos convencionais, portadores de uma microbiota residente. Nos animais isentos de germes houve formação de barreira mineralizada e reparo do tecido pulpar. Concluiu-se que a presença da microbiota é um fator determinante na evolução do processo patológico e que a formação das lesões ocorre após a infecção pulpar causada pela colonização de bactérias patogênicas e consequente ativação dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

As lesões periapicais resultam da ativação de reações inflamatórias específicas e não específicas. Essa resposta patológica envolve a ativação de uma extensa rede de mecanismos imunológicos: alguns agem primariamente para proteger a polpa e a região periapical, outros medeiam a destruição dos tecidos periapicais propiciando a reabsorção óssea (Stashenko *et al.*, 1998). O estudo das respostas inflamatórias periapicais abrange múltiplos aspectos: a ecologia e patogenicidade bacteriana, as respostas imune inata e adquirida do hospedeiro, a regulação dessas respostas e seus efeitos nos tecidos, particularmente no osso (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002). Para conter a infecção bacteriana no interior do sistema de canais, monta-se uma estrutura

organizada em volta do ápice radicular, contendo células e mediadores da inflamação envolvidos nas respostas imunes inata e adaptativa. Porém, com a persistência e avanço da infecção, essa resposta protetora causará a destruição óssea tecidual (Kashashima *et al.*, 1996; Stashenko *et al.*, 1998, Takahashi *et al.*, 1998).

O osso é continuamente remodelado em eventos fisiológicos resultantes da atividade de diversas linhagens de células, incluindo, principalmente, osteoclastos e osteoblastos. Os osteoclastos têm a capacidade de reabsorver tecidos minerais; os osteoblastos são células que sintetizam uma matriz orgânica, que posteriormente será mineralizada. Essas células, progressivamente, se transformam em osteócitos, quando ficam confinadas em sua própria matriz. Tipos secundários de células como monócitos/macrófagos e células endoteliais também contribuem para o remodelamento ósseo pelo contato direto com células osteogênicas ou pela liberação de fatores solúveis, como as citocinas e os fatores de crescimento (Teitelbaum *et al.*, 1997; Kwan Tat *et al.*, 2004).

A resposta imune inata é imediata e inespecífica, ocorrendo precocemente nos processos imunoinflamatórios, e se caracteriza pela fagocitose e apresentação dos antígenos. As principais células envolvidas nessa resposta são os neutrófilos polimorfonucleares (PMNs), os macrófagos e as células dendríticas (Kawashima *et al.*, 1996; Stashenko *et al.*, 1998; Kopitar *et al.*, 2006). A resposta imune adaptativa, porém, é antígeno-específica e funciona para aumentar os mecanismos de proteção da resposta não específica, tendo como principais células os linfócitos B e T e as células natural killers (NK) (Marton & Kiss, 1993; Takahashi, 1998).

Células da imunidade inata e adaptativa, quando ativadas por microrganismos e seus antígenos, são capazes de produzir citocinas, que são proteínas que medeiam muitas das funções dessas células (Abbas *et al.*, 2007). Podem atuar sobre receptores nas células que as produzem, é a chamada ação autócrina, e em outros tipos celulares como osteoblastos e osteoclastos, desenvolvendo ação parácrina e influenciando a função dessas células (Pereira, 2000). Muitas citocinas produzidas pelas células da imunidade inata também se expressam pelas células T ativadas durante a imunidade



adaptativa. A natureza da resposta imune adaptativa é, no entanto, predeterminada pela reação imune inata (Hahn & Liewehr, 2007).

Existem citocinas cuja ação é pró-inflamatória e outras cuja ação é antiinflamatória. São citocinas com ação pró-inflamatória: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , RANKL e as interleucinas (IL) como IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12, IL-18. A produção dessas citocinas tem como objetivo principal ativar células efetoras, como os macrófagos, para eliminar os microrganismos fagocitados. São citocinas com ação antiinflamatória: IL-4, IL-10, IL-13 e fator de crescimento e transformação (TGF- $\beta$ ). Sua principal função é induzir a produção de imunoglobulinas por plasmócitos, que têm a capacidade de neutralizar as toxinas bacterianas, prevenir a aderência bacteriana ou opsonizar antígenos para posterior fagocitose por macrófagos (Abbas *et al.*, 2007; Hahn & Liewer, 2007).

RANKL é um mediador sintetizado pelos osteoblastos podendo existir na forma solúvel ou transmembrana. Seu principal papel na fisiologia óssea é estimular a diferenciação e ativação dos osteoclastos, além de inibir sua apoptose (Simonet *et al.*, 1997; Lacey *et al.*, 1998; Khosla, 2001; Ikeda *et al.*, 2001). RANKL associado ao fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF) é necessário e suficiente para a completa diferenciação da célula precursora de osteoclasto em osteoclasto maduro (Yasuda *et al.*, 1998; Yasuda *et al.*, 1999). O trio de peptídeos formado pelo RANKL, osteoprotegerina (OPG), e o receptor ativador do fator nuclear Kappa B (RANK) estimula a diferenciação dos osteoclastos através do receptor RANK. A interação entre RANKL e RANK pode ser inibida competitivamente pela OPG, uma proteína solúvel produzida por osteoblastos (Yasuda, 1999). Essa correlação explica porque camundongos deficientes em OPG tiveram uma grave osteoporose, com grande redução da massa óssea (Mizuno *et al.*, 1998), enquanto camundongos *knockouts* para o RANKL apresentaram osteopetrose grave e total perda de osteoclastos (Kong *et al.*, 1999). Lin e colaboradores (2007) relataram que tanto RANKL quanto OPG têm interações diretas com os osteoclastos e que são mais efetivos na regulação da diferenciação do precursor celular em osteoclasto do que em sua atividade. Estudos recentes comprovam que a supressão do RANKL é dependente da produção de óxido nítrico (NO), um radical livre produzido por macrófagos inflamatórios e outros

tipos celulares (Rahnert *et al.*, 2008). Demonstram, também, que o próprio RANKL induz a ativação da óxido nítrico sintase, enzima responsável pela produção do NO, atuando como um *feedback* negativo para limitar a osteoclastogênese (Zheng *et al.*, 2006). Silva *et al.* (2010) utilizaram camundongos deficientes em iNOS (portanto, não produtores de NO) nos quais induziram lesões periapicais. Verificaram que a deficiência da enzima resultou numa produção exagerada de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e moduladores da reabsorção óssea (RANK e RANKL), o que contribuiu para que se observassem uma reabsorção óssea periapical exagerada.

TNF- $\alpha$  é uma citocina multifuncional, produzida principalmente por monócitos e macrófagos, mas também por osteoblastos. Juntamente com a IL-1, é uma das mais importantes na etiopatogênese de doenças periradiculares (Stashenko *et al.*, 1998). Acredita-se que tem relevante papel na reabsorção óssea em doenças inflamatórias, pois osteoclastos induzidos por TNF- $\alpha$ , na presença de IL-1 $\alpha$ , produziram áreas de reabsorção em lâminas de dentina *in vitro* (Kobayashi *et al.*, 2000). Esta citocina é capaz de mediar a diferenciação osteoclástica por RANKL, por meio de um mecanismo autócrino (Zou *et al.*, 2001). Também estimulam osteoclastos a reabsorverem osso, *in vitro* (Thomson *et al.*, 1987; Lader & Flanagan, 1998), e *in vivo* (König *et al.*, 1988; Azuma *et al.*, 2000). Já se observou a expressão de TNF- $\alpha$  na inflamação periapical (Torabinejad, 1994; Takahashi, 1998; Seymour & Gemmel, 2001). Zhang *et al.* (2003) demonstraram que a IL-1 e, mais particularmente o TNF- $\alpha$ , são importantes para o processo de indução da reabsorção radicular em ratos. Promovem a migração de macrófagos e neutrófilos para o sítio de infecção ativando essas células (Satashenko *et al.*, 1998; Locksley *et al.*, 2001; Xanthoulea *et al.* 2004, Silva *et al.*, 2005).

O IFN- $\gamma$  é produzido por células NK e linfócitos CD8 $^{+}$  e CD4 $^{+}$  e tem papel importante na resposta imune inata e adaptativa (Silva *et al.*, 2008; Hahn & Liewer, 2007). Componentes microbianos, como os lipopolissacarídeos (LPS), juntamente com essa citocina, são capazes de ativar macrófagos (Mosser, 2003). A presença de células de memória produzindo IFN- $\gamma$  teria um importante papel nas infecções recorrentes, estimulando a atividade fagocitária diretamente (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002). IFN- $\gamma$  ativa macrófagos, APCs e

potencializa ações do TNF- $\alpha$  nas células endoteliais. Acredita-se que essa citocina é inibida pela produção de NO, já que a deficiência desse radical livre aumenta a produção de IFN- $\gamma$  (Gao *et al.*, 2007)

Os linfócitos T-helper (Th) podem ser polarizados em diversos tipos, com funções diferentes: Th1, Th2, Th17 ou T-regulatório (Vernal *et al.*, 2008). A resposta imune do tipo Th1, mediada pelo IFN- $\gamma$ , se envolve na progressão da lesão e reabsorção óssea, os mecanismos imunorregulatórios (Treg) são mediados pelo fator de crescimento e transformação beta (TGF- $\beta$ ), pela IL-10, e pelas citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-5) responsáveis pelo processo de cura e restrição dos mecanismos imune e inflamatório ( Kawashima & Stashenko, 1999; Colic *et al.*, 2009; Colic *et al.*, 2010). Macrófagos e células dendríticas são apresentadores de antígenos muito importantes nas doenças inflamatórias crônicas, incluindo as lesões periodontais e periapicais; também são as maiores fontes de IL-10 (Cutler & Jotwani, 2000; Lukic *et al.*, 2006; Colic *et al.*, 2009). A IL-10 liga-se à síntese de colágeno e proliferação celular mediando a polarização dos macrófagos para o subtipo 2 (Bogdan *et al.*, 1991; Mosser, 2003; de Oliveira Mendes *et al.*, 2003; Bronte & Zanollo, 2005). Inibe a ativação de osteoclastos na lesão periapical (Satashenko *et al.*, 1998; Kawashima & Stashenko, 1999) e as funções de macrófagos e células dendríticas, atuando como uma citocina regulatória do processo inflamatório (Hahn & Liewer, 2007)

O TGF- $\beta$  é secretado por linfócitos T ativados, linfócitos T regulatórios, antígenos e monócitos estimulados por LPS (Hahn & Liewer, 2007). Está presente na matriz óssea e funciona como um fator de estímulo aos osteoblastos. Quando a referida matriz é reabsorvida, libera-se esse fator estimulando a proliferação dos osteoblastos e a formação óssea (Howard *et al.*, 1981; Martin & Sims, 2005). Está presente na dentina humana (Finkelman *et al.*, 1990; Zhao *et al.*, 2000) e aí desempenha múltiplos papéis na formação e reparo do complexo dentinopulpar (Smith, 2003). Essa citocina também age como um importante regulador da quimiotaxia, ativação e sobrevivência de células imunocompetentes como os linfócitos, macrófagos e granulócitos. Dessa forma, controlam o início e a resolução das respostas inflamatórias (Li *et al.*, 2006). Desativa macrófagos, causando a deposição de matriz e o

remodelamento tecidual, por secretar a matriz metaloproteinase (MMP), colágeno e integrinas (Hahn & Liewer, 2007).

Os odontoblastos estendem seus processos celulares pelos túbulos dentinários, onde existem receptores para TGF- $\beta$ 1 (Smith *et al.*, 1998; Sloan *et al.*, 1999) e para microrganismos, receptores *Toll-like* (TLRs) (Veerayutthwai *et al.*, 2007). Horst *et al.* (2009) realizaram um estudo, *in vitro*, para elucidar a importância do TGF- $\beta$ 1 na modulação das respostas dos odontoblastos às bactérias orais. Observaram que o TGF- $\beta$ 1 inibe a expressão de TLRs nos odontoblastos e conseqüentemente reduz a produção de citocinas inflamatórias em resposta às bactérias orais. O balanço, pois, entre os sinais inflamatórios dos TLRs e as atividades antiinflamatórias do TGF- $\beta$ 1 teria papel chave no desenvolvimento das inflamações pulpares. O capeamento pulpar direto com TGF- $\beta$ 1 possibilitou também a cura de tecidos pulpares, aumentando a formação de dentina reparadora em dentes de animais (Hu *et al.* 1998, Tziafas & Papadimitriou, 1998; Zhang *et al.*, 2008).

A gravidade das doenças periapicais varia amplamente entre os indivíduos. Isso estaria associado à resposta do hospedeiro, bem como à composição da microbiota infectante (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2005). Huang *et al.* (2011) avaliaram, *in vitro*, as citocinas produzidas por macrófagos e células dendríticas (imaturas e maduras) em resposta a desafios polimicrobianos orais. Os resultados demonstraram que havia diferenças claras na capacidade das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas estimularem citocinas e quimiocinas. A associação de duas bactérias diferentes também resultou em perfis variados de liberação de citocinas, tanto na resposta imune inata quanto na adaptativa. Acredita-se que tal resposta depende das características dos componentes polimicrobianos. Bactérias Gram-negativas, dos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas* e *Fusobacterium*, e seu LPS, recuperadas de lesões cariosas estavam fortemente associadas à dor e à hipersensibilidade térmica (Massey *et al.*, 1993; Khabbaz *et al.*, 2000; Hahn & Liewehr, 2007). Também Horst e colaboradores (2009) afirmaram que os odontoblastos humanos são mais responsivos às bactérias Gram-negativas como a *P. intermedia* e o *F. nucleatum*. Quando estimulados *in vitro*, os odontoblastos aumentam a produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-8 e TNF- $\alpha$ . Já o

ácido lipoteicoico isolado de bactérias Gram-positivas, como o *E. faecalis*, estimula a liberação de TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-8 por leucócitos.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento das técnicas de isolamento e cultivo de anaeróbios obrigatórios aumentou o interesse sobre o papel de tais microrganismos na patogênese das infecções endodônticas. Pode-se então demonstrar que as infecções endodônticas têm um caráter polimicrobiano, sendo constituídas, principalmente, por bactérias anaeróbias Gram-positivas e Gram-negativas (Sundqvist, 1994; Dahlén, 2002). Sundqvist (1976), utilizando técnicas de isolamento adequadas e cultivo anaeróbio, avaliou 32 dentes com necrose pulpar. Observou radiograficamente, em 19 dentes, a presença de lesão perirradicular. Curiosamente, os microrganismos foram recuperados apenas desses dentes e, em sua maioria (90%) eram espécies anaeróbias obrigatórias.

As técnicas baseadas em cultura microbiológica apresentam, contudo, limitações, pois possuem moderada sensibilidade e especificidade, dificuldade de detecção de microrganismos anaeróbios fastidiosos, mais tempo para sua execução, exigência de condições controladas durante a coleta e transporte dos espécimes clínicos para assegurar a viabilidade dos microrganismos. Algumas dessas limitações podem levar a resultados que não refletem a real composição microbiana de determinada infecção (Siqueira & Rôças, 2005).

As técnicas de biologia molecular proporcionam melhor custo benefício, especificidade e sensibilidade para avaliar o perfil microbiológico de doenças orais, incluindo infecções endodônticas e periodontais (Sedgley *et al.*, 2006; Seol *et al.*, 2006). Essa tecnologia permitiu a identificação de alguns filotipos bacterianos incultiváveis ou até mesmo desconhecidos, o que propiciou um melhor entendimento da microbiota oral, incluindo as infecções endodônticas (Fouad *et al.*, 2002; Rocas *et al.*, 2004). São exemplos de espécies microbianas recuperadas de infecções endodônticas que não haviam sido isoladas anteriormente, apenas o foram após a disponibilidade dos métodos moleculares: *B. forsythus*, *Prevotella tanneriae* e *Treponema denticola* (Jung *et al.*, 2001; Rôças *et al.*, 2001). Outras espécies bacterianas de difícil crescimento como *P. endodontalis*, *Slackia exígua*, *Mogibacterium tinidum* e *Eubacterium*

*saphenum* vêm sendo detectadas em altas prevalências desde então (Siqueira *et al.*, 2001).

Brito *et al.* (2007) utilizaram a técnica de hibridização DNA-DNA (“Chekerboard”) associado ao Multiple Displacement Amplification (MDA). O MDA permite que se amplifique o material genômico das amostras inicialmente recuperadas, em até mil vezes, tornando-se possível atingir os níveis de detecção da técnica de hibridização DNA-DNA que é acima de  $10^4$  células. Esse método possibilitou a análise de sondas bacterianas quanto à presença de 77 espécies em amostras recuperadas de infecções endodônticas. Esses autores confirmaram o caráter polimicrobiano das infecções endodônticas, e obtiveram, pela primeira vez, um grande número de espécies por canal radicular infectado (aproximadamente 50) de maneira semelhante à observada nos sítios da doença periodontal.

Alguns fatores influenciariam o crescimento bacteriano e sua colonização nos SCR infectados. A disponibilidade de nutrientes, a baixa tensão de oxigênio (potencial redox), a temperatura e o pH, presentes em polpas necróticas, são determinantes no processo de seleção bacteriano. Outro fator importante neste processo seletivo é a interação bacteriana que pode ser cooperativa (sinergismo) ou competitiva (antagonismo) (Sundqvist, 1992; Siqueira *et al.*, 2002).

A disponibilidade de nutrientes é fator crucial para o estabelecimento da microbiota no SCR. Sua fonte pode ser o tecido pulpar desintegrado e/ou os fluidos tissulares. As bactérias sacarolíticas podem obter energia pela fermentação de carboidratos. Como no interior do SCR há deficiência desses nutrientes elas possuem menor chance de crescimento (Gomes *et al.*, 1994). Muitos microrganismos (bactérias assacarolíticas) podem utilizar aminoácidos e peptídeos como fonte de energia, pois são aptos a se multiplicarem no interior dos SCR (Sundqvist, 1994; Gomes *et al.*, 1994). Algumas espécies também podem utilizar metabólitos produzidos por outros integrantes da comunidade microbiana como fonte de energia (Grenier & Mayrand, 1986). Os microrganismos que colonizam o terço apical do SCR obtêm nutrientes (vitaminas, hormônios e componentes do sangue) diretamente do hospedeiro (Siqueira *et al.*, 2004).

Sabe-se que as interações bacterianas são determinantes ecológicos importantes que regulam o estabelecimento de uma microbiota infectante nos SCRs. Produtos do metabolismo bacteriano favorecem ou inibem o crescimento de outras espécies (Sundqvist, 1994). Em associações positivas, uma espécie pode ajudar outra, produzindo fatores de crescimento, alterando as condições físico-químicas do ambiente ou providenciando um sítio de ligação para uma segunda espécie (Socransky *et al.*, 1988).

Uma espécie também pode produzir substâncias antagônicas, competir por nutrientes ou destruir sítios de ligação de uma segunda espécie nas associações negativas. Avaliando a influência da produção de substâncias antagonistas na colonização do SCRs, Ribeiro Sobrinho *et al.* (2001) verificaram grande antagonismo entre *Gemella morbillorum* e *Bifidobacterium adolescentis*, *Clostridium butyricum* e *Fusobacterium nucleatum*. *B. adolescentis* inibia o crescimento de *F. nucleatum*. O *F. nucleatum*, por sua vez, apresentou auto-antagonismo e inibiu o crescimento de *G. morbillorum*. Os autores observaram ainda que o *C. butyricum* não produzia substância antagônica a nenhuma das bactérias testadas. Já Caires *et al.* (2007) verificaram que *C. butyricum* induziu um antagonismo no crescimento do *F. nucleatum* e do *B. adolescentis*, e demonstraram que a substância responsável por isso provavelmente era de natureza não protéica, pois se mostrou termo-resistente.

O *F. nucleatum* é uma bactéria Gram-negativa anaeróbia estrita e, segundo Sundqvist (1992), é a espécie mais isolada em canais radiculares infectados. Em experimentos periodontais, *F. nucleatum* está presente na cavidade oral saudável (Lo Bue *et al.*, 1999; Paster *et al.*, 2001; Aas *et al.*, 2005) e doente (Dzink *et al.*, 1985; Moore *et al.*, 1985). Sua persistência está associada à falha do tratamento periodontal (Paster *et al.*, 2001, Van der Velden *et al.*, 2003), sugerindo um papel como patógeno oportunista (Handfield *et al.*, 2008). Em células do epitélio oral, *F. nucleatum* e os componentes de sua parede celular agiram como potentes estimuladores de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e peptídios antimicrobianos (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2004; Hasegawa *et al.*, 2007). Em células dendríticas maduras, a associação do *F. nucleatum* com a *Porphyromonas gingivalis* e

com a *Porphyromonas intermedia*, resultou em aumento significativo dos níveis de IL-6 e TNF- $\alpha$  (Huang *et al.*, 2011). Demonstrou-se também, a capacidade do *F. nucleatum* em induzir apoptose em células de linfonodos de camundongos gnotoxênicos submetidos à infecção endodôntica e em ensaios, *in vitro* (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2005). Esse microrganismo, associado ao *Bifidobacterium adolescentis* e *Clostridium butyricum* em infecções endodônticas experimentais, induziu a expressão de IL-4 e IFN- $\gamma$  (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002).

O *Enterococcus faecalis* é um anaeróbio facultativo, Gram-positivo, freqüentemente isolado de canais radiculares. Sua presença em dentes refratários ao tratamento endodôntico fez com que muitos lhe imputassem a responsabilidade por tal fato (Molander *et al.*, 1998; Sundqvist *et al.*, 1998; Pinheiro *et al.*, 2003; Siqueira & Rôças, 2004, Pirani *et al.*, 2008; Vianna *et al.*, 2008). Sua prevalência nas infecções endodônticas recorrentes é alta, variando de 56% (método de cultura) (Perciulien *et al.*, 2000) a 77% quando o método de detecção foi o PCR padrão (Siqueira & Rôças, 2004). Essa freqüência tem sido atribuída a sua habilidade em sobreviver em ambientes hostis e ao seu amplo espectro de resistência a antibióticos (Pimentel *et al.*, 2007). O *E. faecalis* possui numerosos fatores de virulência que possibilitam a colonização, competição com outras bactérias, resistência a mecanismos de defesa e a produção de toxinas que direta ou indiretamente induzem a inflamação (Kayaoglu & Ørstavik, 2004; Deng *et al.*, 2009). Sedgley e colaboradores (2005) encontraram maior incidência do *E. faecalis* em amostras coletadas de soluções orais quando analisadas por PCR quantitativo (qPCR), do que por análises que se utilizam de técnicas de cultura. O qPCR também demonstrou maior sensibilidade: Williams *et al.* (2006) coletaram amostras durante o tratamento endodôntico e avaliaram a presença microbiana por qPCR e técnica de cultura. O qPCR detectou significativamente mais dentes positivos para o *E. faecalis* do que a técnica de cultura. Observaram também, os autores, que o *E. faecalis* foi três vezes mais prevalente em infecções recorrentes comparadas às primárias.

Para realização do estudo do desenvolvimento e progressão de lesões perirradiculares, são utilizados diversos modelos. Stashenko *et al.* (1994)



desenvolveram um importante modelo murino. Promoveram a abertura coronária e exposição pulpar à cavidade oral em molares de camundongos e detectaram que 2 dias após o procedimento observava-se necrose pulpar e pequena rarefação óssea; 7 dias após apresentava-se destruição óssea substancial e altas quantidades de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\alpha$  e TNF- $\alpha$ , sendo esta fase chamada ativa; 20 dias depois do procedimento, a destruição óssea ocorria de forma lenta, chamada fase crônica. Nosso trabalho foi desenvolvido baseado nesse modelo.

### **3. Objetivo**

Mensurar, por meio do PCR em tempo real, a expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (RANKL, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ ) e regulatórias (TGF- $\beta$  e IL-10), nos tecidos perirradiculares adjacentes à molares de camundongos Balb/c, infectados com o *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis* e a associação desses microrganismos no 10<sup>o</sup> e 20<sup>o</sup> dias após a inoculação.

## **4. Materiais e Métodos**

### **4.1 Caracterização do estudo**

O presente estudo avaliou os efeitos da inoculação bacteriana em canais radiculares de camundongos e a respectiva resposta perirradicular adjacente. Para tal, uma bactéria Gram-negativa (*F. nucleatum*), uma Gram-positiva (*E. faecalis*) e ambas em associação foram utilizadas. Os animais foram sacrificados em dois momentos: 10 e 20 dias após a inoculação. Os tecidos perirradiculares foram então extraídos e analisados quanto à expressão de citocinas pró-inflamatórias e regulatórias. O protocolo experimental foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA-UFMG) número 152/10.

### **4.2 Animais**

Trinta camundongos Balb/c, fêmeas, com idade aproximada de oito semanas, obtidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/Brasil, foram mantidos em biotério com barreiras, comida e água *ad libitum*.

### **4.3 Microrganismos**

Utilizaram-se as amostras de referência do *F. nucleatum* (ATCC 10953) e do *E. faecalis* (ATCC19433) gentilmente cedidas pelo Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (Instituto de Ciências Biológicas – ICB – UFMG, Belo Horizonte, Brasil).

### **4.4 Procedimentos operatórios e laboratoriais**

#### **4.4.1 Recuperação dos microrganismos**

As amostras de *F. nucleatum* e *E. faecalis*, que se encontravam congeladas em caldo brucela com 10% de glicerol a - 80°C, foram recuperadas em ágar BHI-S suplementado com sangue equino, extrato de levedura, hemina e menadiona e incubados a 37°C, por 48 horas, em câmara de anaerobiose contendo atmosfera de 85% N<sub>2</sub>, 10% H<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub> (Forma Scientific Inc.,

Marietta, OH) e em microaerofilia pelo método da vela. Após confirmação morfológica da pureza das amostras, fez-se a preparação dos inóculos.

#### **4.4.2 Preparo do Inóculo**

As espécies bacterianas crescidas em BHI-S foram repicadas em caldo BHI-S suplementado com extrato de levedura, hemina e menadiona e incubadas, como descrito anteriormente, por 48 horas. Confirmado o crescimento, a concentração do inóculo foi ajustada para  $10^7$  UFC/mL (Fabricius *et al.*, 1982). Alíquotas de 25 microlitros foram introduzidos nos SCR dos animais correspondendo assim a uma concentração de  $10^5$  UFC/mL (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2001; Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002; Melo Maltos *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008).

#### **4.4.3 Procedimento experimental:**

Inicialmente os camundongos foram anestesiados intraperitonealmente com uma solução de 10 mL de Ketamina [10%] (Dopalen<sup>®</sup>Vetbrands Ltda -SP, Brasil) e 7,5 mL de Xilazina [2%] (Anasedan<sup>®</sup>Vetbrands Ltda -SP, Brasil), utilizando-se a dosagem de 100mg/ kg (Silva *et al.*, 2008). Em seguida, sob o microscópio de uso odontológico (Alliance, SP, Brasil), abriu-se o primeiro molar superior direito (controle) com fresas tronco-cônicas número ¼, sob baixa rotação. O tecido pulpar foi desorganizado utilizando-se limas K, números 8 e 10 e selado com material restaurador provisório a base de óxido de zinco e sulfato de zinco (Coltosol<sup>®</sup>). O dente homólogo (do lado esquerdo) foi submetido ao mesmo procedimento sendo selado após receber os microrganismos.

#### **4.4.4 Inoculação bacteriana**

Vinte e cinco microlitros do caldo contendo o *Fusobacterium nucleatum* e/ou *Enterococcus faecalis* em mono ou bi-associação foram inoculados nos SCR dos animais utilizando-se seringas PPD. Em seguida, as cavidades coronárias foram seladas.

#### **4.4.5 Sacrifício dos animais e extração das amostras**

Após 10 e 20 dias, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical. Os molares superiores (esquerdo e direito), juntamente com os tecidos periapicais adjacentes, foram extraídos e inseridos em eppendorfs, contendo 250 µL de solução de Trizol (GIBCO BRL Laboratories, Grand Island-N.Y., EUA). Realizou-se então a trituração das amostras em aparelho elétrico (IKA T10 basic – Merse – SP, Brasil), mantendo-as em freezer -20°C para posterior extração do RNA.

#### **4.5.6 Extração do RNA**

Aos eppendorfs, contendo as amostras, foram adicionados 200µL de clorofórmio. Em seguida, elas foram centrifugadas por 15 minutos a 12,000 x g a 4°C. A fase aquosa obtida foi transferida para outro eppendorf, adicionando-se 250 µL de isopropanol (Merck, São Paulo). A mistura foi incubada na estufa BOD (Q-315D, Quimis®) a 25°C, por 15 minutos e centrifugada por 10 minutos a 12,000 x g a 4°C promovendo-se a precipitação do RNA. O sobrenadante foi descartado e adicionados 250µL de etanol 75% sendo vortexado e centrifugado a 10,000 x g a 4°C por 15 minutos. Descartou-se o sobrenadante e os tubos foram emborcados por 15 minutos em média para escoamento de todo o líquido. Adicionou-se, então, 25µL de água de alta qualidade tratada com DEPC (dietil pirocarbonato, SIGMA® Chemical Co., Louis, MO, EUA). As amostras foram congeladas em freezer a -80°C.

#### **4.4.7 Quantificação do mRNA**

A solução contendo o mRNA foi lida em espectrofotômetro (Nanodrop® /ND 1000 Wilmington-Delaware, EUA) com comprimento de onda 260/280 DO. Utilizando-se a fórmula [mRNA-mg/mL]= DO<sub>260</sub> x diluição x 40, obteve-se a quantificação do mRNA de cada amostra.

#### **4.4.8 Obtenção dos cDNAs**

Sintetizou-se o cDNA pela transcrição reversa, utilizando-se 2 µg de RNA, como descrito por Silva *et al.* (2008). As condições padrão da reação de PCR foram as que se seguem: 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 95°C por 15

segundos, 60°C por 1 minuto; e 95°C for 15 segundos, 60°C por 1 minuto, e 95°C por 15 segundos.

#### 4.4.9 Detecção e quantificação das citocinas

As sequências de primers utilizadas para a detecção das citocinas encontram-se na Tabela 1.

Iniciadores	Sequência 5'- 3'	BP
HPRT	FW: GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTT RV:GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGGC	162
TNF- $\alpha$	FW: ATCTTCTCAAAATTCGAGTGACCA RV: TGGAGTAGACAAGGTACAACCC	171
TGF- $\beta$	FW: TGACGTCACTGGAGTTGTACG RV: GGTTTCATGTCATGGATGGTGC	169
RANKL	FW: CATCCCATCGGGTTCCCATAA RV: CCTTAGTTTTCCGTTGCTTAACGAC	103
IL-10	FW: GGTTGCCAAGCCTTATCGGA RV: ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	190
IFN- $\gamma$	FW: CAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA RV: TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	90

**Tabela 1:** Primers utilizados para detecção da expressão de citocinas.

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

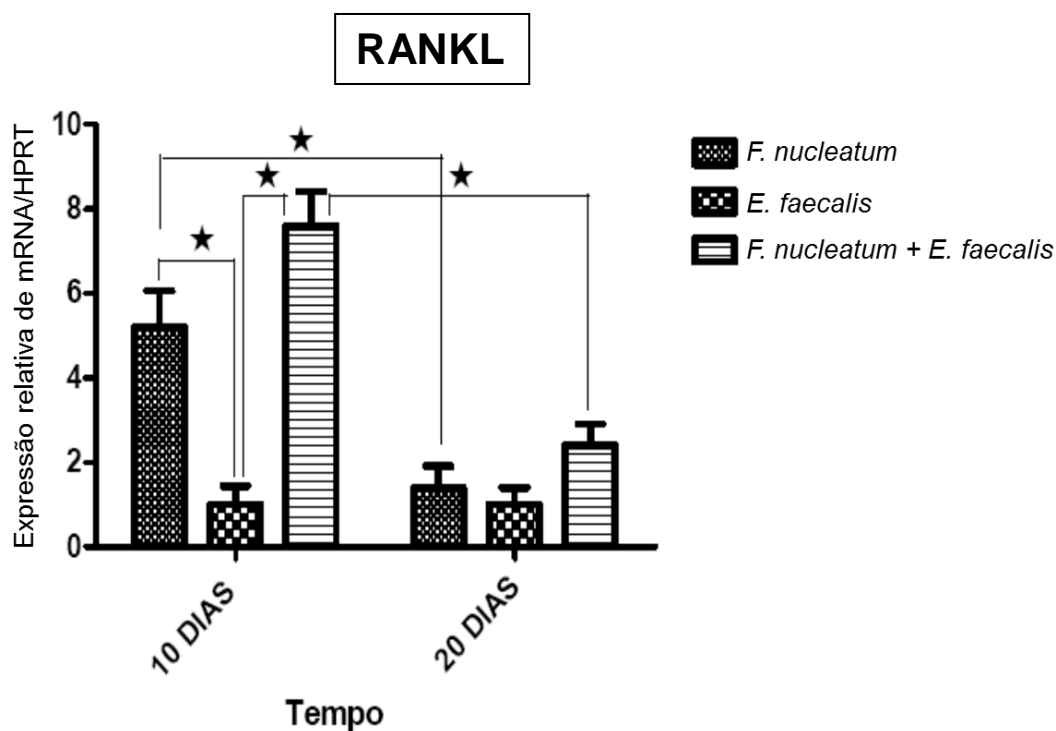
As reações da PCR em tempo real foram realizadas utilizando-se o Step One Real-time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), empregando-se o SYBR-Green detection system (Applied Biosystems). O gene hypoxanthine phosphoribosyltransferase (HPRT) foi amplificado e utilizado para normalizar os níveis de expressão do mRNA. Todas as amostras foram corridas em duplicata em um volume de reação de 20 µl com 1 µg do cDNA. Utilizou-se o Sequence Detection Software, version v 2.0 (Applied Biosystems) na análise dos dados após a amplificação. Os resultados foram obtidos como valores do limiar do ciclo (threshold cycle - Ct), que representa quantas vezes cada sinal de fluorescência passa por um limiar fixo. Os níveis de expressão foram calculados pelo método do  $\Delta\Delta Ct$ . Os valores de Ct são a média de duas medidas independentes, e os níveis de expressão do mRNA das amostras são a razão entre a expressão do gene de interesse e o HPRT. Todos os dados foram analisados utilizando-se o SPSS Statistical Program (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

#### **4.5 Análise dos dados**

Utilizou-se o teste de Kruskal Wallis, pois o coeficiente de variação (CV) foi elevado (maior que 30%), o que caracteriza uma amostra instável e heterogênea. Além disso, algumas variáveis apresentaram distribuição assimétrica.

## 5. Resultados

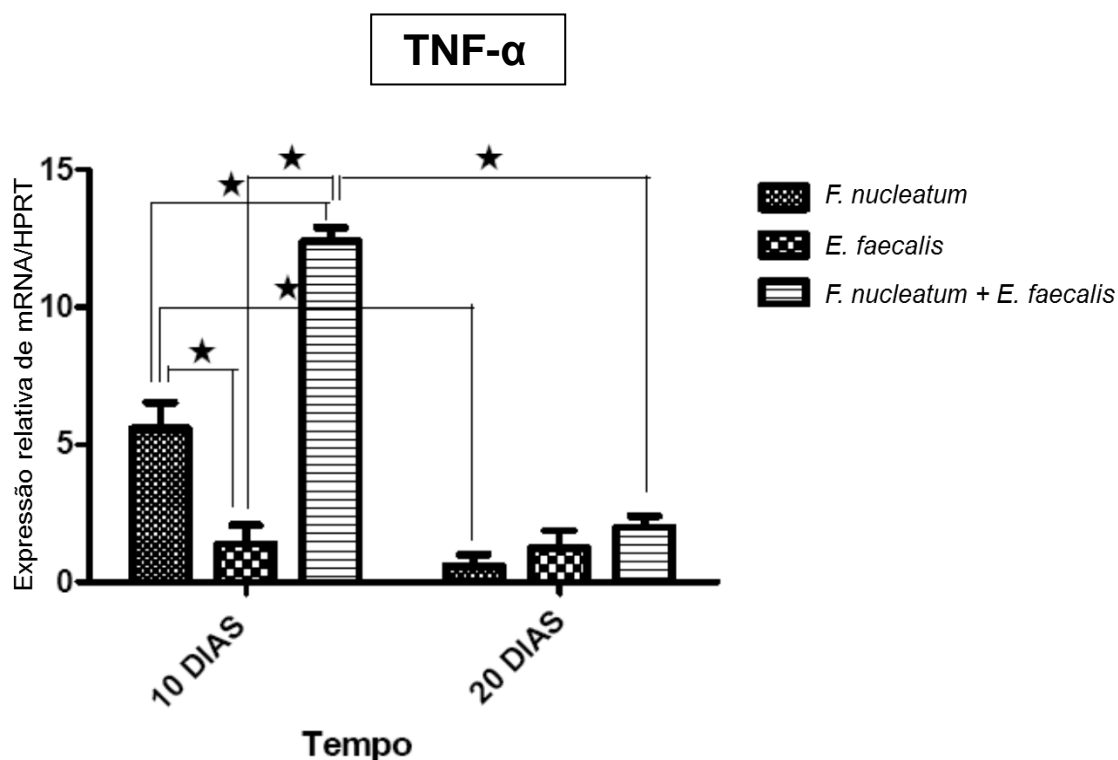
Observou-se a expressão gênica do RANKL nos dois períodos avaliados (10 e 20 dias). O *F. nucleatum* e a bi-associação, induziu uma expressão estatisticamente maior no 10º que no 20º. Observou-se também, que no 10º dia, o *F. nucleatum* e a bi-associação, induziram maior expressão de RANKL que o *E. faecalis* em mono-infecção ( $p < 0,05$ ). No 20º dia, contudo, não se observou diferença entre os três grupos avaliados.



**Gráfico 1:** Avaliação da expressão gênica de RANKL em tecidos perirradiculares de camundongos Balb/c, no 10º e no 20º dias após a inoculação bacteriana. As barras representam a média de 5 experimentos realizados em duplicada, enquanto as linhas representam o erro padrão. ★ indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

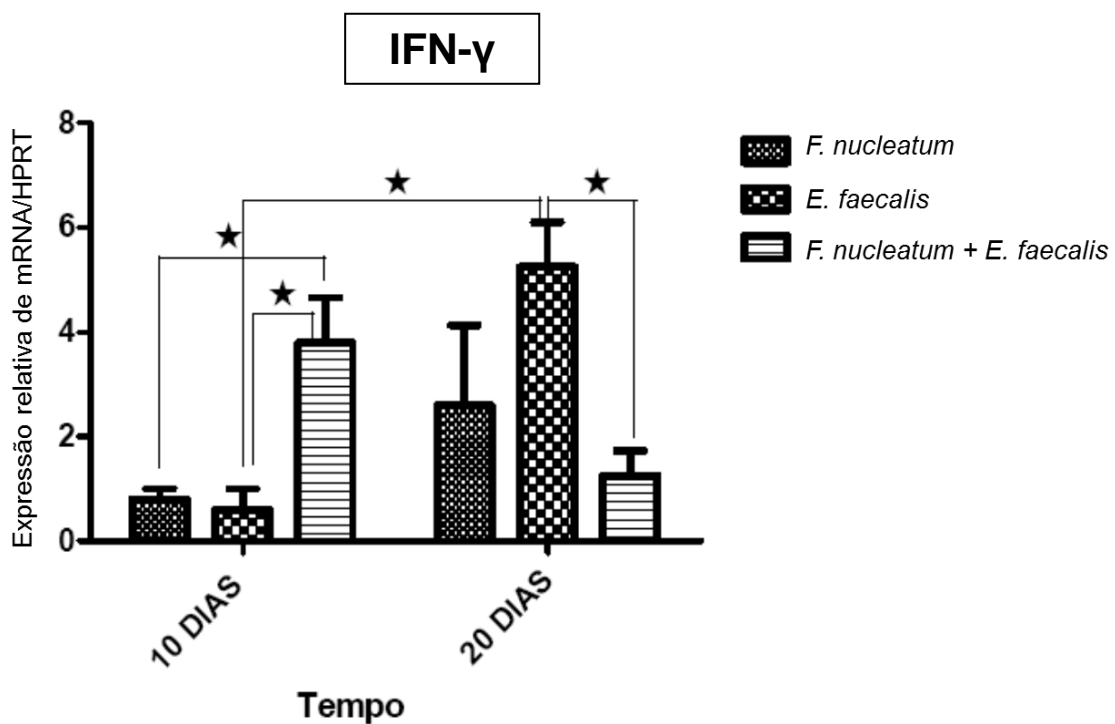


De maneira muito semelhante à observada com o RANKL, a expressão do TNF- $\alpha$  (Gráfico 2) foi significativamente maior nas amostras de 10 dias, quando comparadas às de 20 dias, ao se inocular nos SCR o *F. nucleatum* em mono-associação (Grupo 1) ou em associação com o *E. faecalis* (Grupo 3). No 10º dia, as expressões gênicas do TNF- $\alpha$ , nas amostras dos grupos 1 e 3, foram significativamente maiores que as do grupo 2, não havendo contudo, diferença entre os grupos, no 20º dia. Mais uma vez, o *E. faecalis* induziu a expressão da citocina em níveis basais, nos dois períodos avaliados.



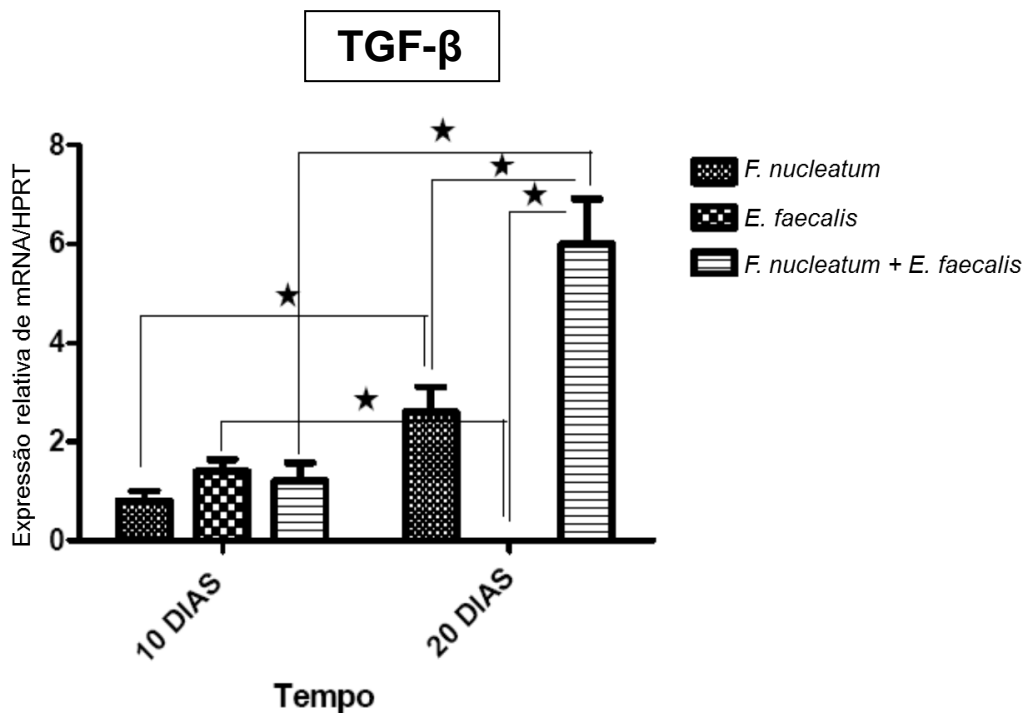
**Gráfico 2:** Avaliação da expressão gênica de TNF- $\alpha$  em tecidos perirradiculares de camundongos Balb/c, no 10º e no 20º dias após a inoculação bacteriana. As barras representam a média de 5 experimentos realizados em duplicada, enquanto as linhas representam o erro padrão. ★ indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A expressão gênica aumentada do IFN- $\gamma$  em resposta à bi-associação, no 10º dia, foi estatisticamente significativa em relação à observada para ambas as mono-infecções, no mesmo período. A mono-infecção com *E. faecalis* induziu expressão significativa de IFN- $\gamma$  no 20º em relação à observada no 10º dia (Grupo 2), bem como em relação à bi-associação, no 20º dia (Grupo 3).



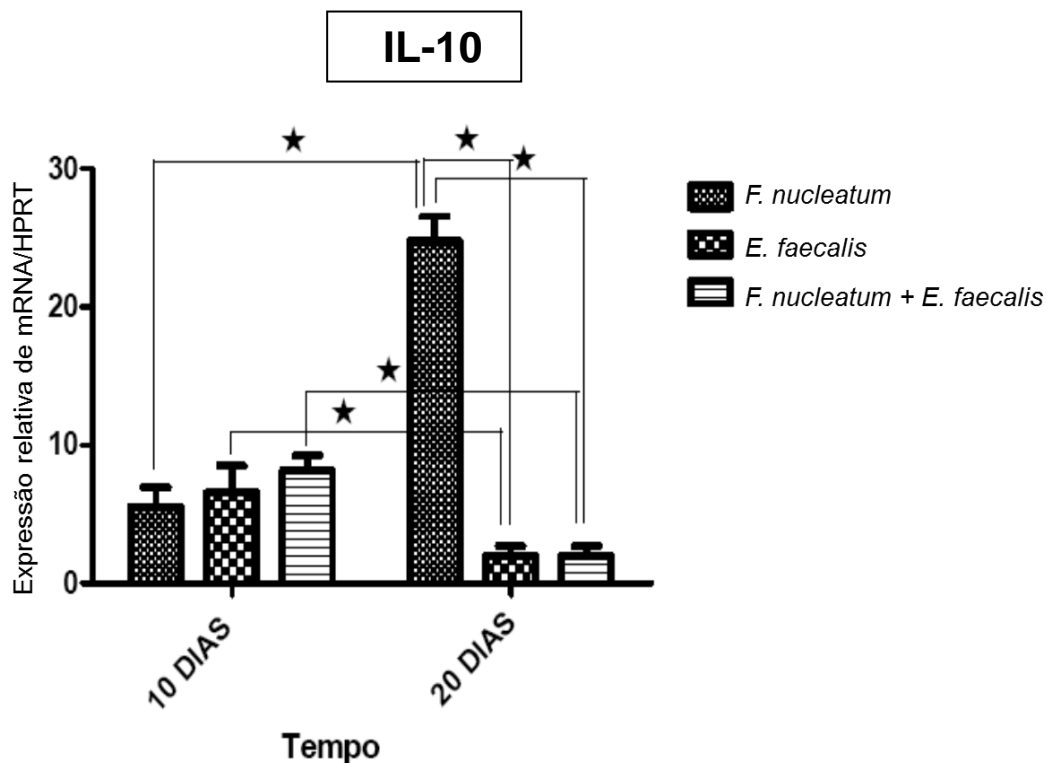
**Gráfico 3:** Avaliação da expressão gênica de IFN- $\gamma$  em tecidos perirradiculares de camundongos Balb/c, no 10º e 20º dias após a inoculação bacteriana. As barras representam a média de 5 experimentos realizados em duplicada, enquanto as linhas representam o erro padrão. ★ indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

A inoculação nos SCR dos camundongos Balb/c com o *F. nucleatum*, em mono ou em bi-associação com *E. faecalis* (Grupos 1 e 3), induziu uma expressão de TGF- $\beta$  (Gráfico 4) estatisticamente aumentada no 20º dia quando comparada à observada no 10º dia. Observou-se também, no 20º dia, que a expressão de TGF- $\beta$  induzida pela bi-associação foi significativa em relação às induzidas por ambas as mono-infecções. Quanto ao *E. faecalis* (Grupo 2), houve indução da expressão de TGF- $\beta$  no 10º dia de maneira significativa em relação à observada no 20º dia.



**Gráfico 4:** Avaliação da expressão gênica de TGF- $\beta$  em tecidos perirradiculares de camundongos Balb/c, no 10º e no 20º dias após a inoculação bacteriana. As barras representam a média de 5 experimentos realizados em duplicada, enquanto as linhas representam o erro padrão. ★ indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

Observou-se uma elevada expressão de IL-10 no 20º dia quando se inoculou nos SCR a linhagem de *F. nucleatum* (Gráfico 5). Essa expressão foi estatisticamente significativa em relação à induzida por esse microrganismos no 10º dia e à observada nos grupos 2 (*E. faecalis*) e 3 (*bi-associação*), no 20º dia. Ao se comparar também a expressão da IL-10 provocada pelo *E. faecalis* e pela *bi-associação* no 10º dia, com a detectada no 20º dia, nos mesmos grupos, de maneira interessante, percebem-se uma redução estatisticamente significativa.



**Gráfico 5:** Avaliação da expressão gênica de IL-10 em tecidos perirradiculares de camundongos Balb/c, no 10º e no 20º dias após a inoculação bacteriana. As barras representam a média de 5 experimentos realizados em duplicada, enquanto as linhas representam o erro padrão. ★ indica diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

## 6. Discussão

As lesões perirradiculares caracterizam-se pela inflamação dos tecidos periapicais adjacentes à infecção endodôntica, seguida pela destruição óssea localizada nos arredores dos ápices radiculares (Wang *et al.*, 1991; Stashenko *et al.*, 1998). O infiltrado presente nessas compõe-se de vários tipos celulares, sendo os principais: macrófagos e linfócitos T e B (Stashenko & Yu, 1989; Kawashima *et al.*, 1996). As células da imunidade inata e adaptativa, quando ativadas por microrganismos e seus subprodutos, são capazes de produzir citocinas, que medeiam muitas funções dessas células (Abbas *et al.*, 2007). Acredita-se, que as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem gerar padrões diferentes de resposta, levando à liberação de diversas citocinas. (Huang *et al.*, 2011).

Muitos pesquisadores utilizam modelos animais para elucidar as múltiplas facetas envolvidas na etiopatogênese das alterações perirradiculares (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002; Silva *et al.*, 2008; Moreira Júnior *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011). Neste estudo, induzindo uma infecção experimental em molares de camundongos Balb/c com linhagens de *F. nucleatum* e *E. faecalis*, em mono ou em bi-associação, nós investigamos, utilizando o PCR em tempo real, a expressão de citocinas pró-inflamatórias (RANKL, TGF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ ) e regulatórias (IL-10 e TGF- $\beta$ ), em resposta a essa infecção.

O RANKL é uma citocina cujo principal papel na fisiologia óssea é estimular a diferenciação e ativação dos osteoclastos, além de inibir a apoptose celular (Simonet *et al.*, 1997; Lacey *et al.*, 1998; Khosla, 2001; Ikeda *et al.*, 2001). Neste estudo, observou-se que *F. nucleatum* (Grupo 1) e a bi-associação (Grupo 3), induziram maior expressão de RANKL, no 10º dia, comparada à detectada no 20º dia. Tais resultados sugerem que a expressão de RANKL é realmente marcante nos estágios iniciais da expansão da lesão periapical e que o *E. faecalis*, isoladamente, não interferiria nesse processo. Apesar de terem avaliado a resposta a uma plethora de microrganismos não identificados, tanto em lesões periapicais (Kawashima *et al.*, 2007) quanto na indução de em periodontites experimentais (Garlet *et al.*, 2006; Garlet *et al.*, 2004, Cochran, 2008). Alguns autores demonstraram que o RANKL está

presente em grandes quantidades nos estágios iniciais do desenvolvimento dessas lesões (Garlet *et al.*, 2004; Kawashima *et al.*, 2007; Repeke *et al.*, 2010). Anteriormente, demonstrou-se também que o bloqueio do RANKL, por meio da OPG, durante a indução experimental da doença periodontal, reduz a perda óssea alveolar (Jin *et al.*, 2007). Em lesões periapicais humanas, percebeu-se que, nas que apresentavam diâmetros maiores do que 5mm (consideradas grandes) detectava-se uma alta expressão gênica de OPG. Observou-se o inverso nas lesões menores (Menezes *et al.*, 2008).

O TNF- $\alpha$  tem ação no processo de migração celular em múltiplos aspectos: induzindo a produção de moléculas de adesão e quimiocinas (Peschon *et al.*, 1998; Dinarello, 2000; Wajant *et al.*, 2003; Kindle *et al.*, 2006). Neste estudo, notou-se que o *F. nucleatum* (Grupo 1) e a bi-associação com *E. faecalis* (Grupo 3), induziu maior expressão de TNF- $\alpha$  no 10º dia quando comparada à detectada no 20º dia. Mais uma vez, percebemos que o *E. faecalis*, isoladamente, não interferiu nessa expressão, como também se demonstrou para o RANKL. Esses resultados estão de acordo com outros que haviam correlacionado altos níveis de TNF- $\alpha$  e RANKL no fluido gengival e tecidos periodontais doentes. (Graves & Cochran, 2003; Garlet *et al.*, 2004; Graves, 2008). Garlet *et al.* (2007) induziram doenças periodontais em camundongos deficientes para o receptor TNF- $\alpha$  p55 e perceberam que houve redução na expressão do RANKL, e em consequência, a diminuição da perda óssea alveolar. Gazivoda *et al.* (2009) detectaram altas proporções de TNF- $\alpha$  nas lesões perirradiculares de grande porte (lesões crônicas), semelhante ao observado em relação ao RANKL (Menezes *et al.*, 2008). Esses autores correlacionaram essa maior expressão de TNF- $\alpha$  à alta proporção de células CD8+ nas lesões maiores, uma vez que o TNF- $\alpha$  tem ação importante na função citotóxica exercida por essas células (Gupta *et al.*, 2006). Danin *et al.* (2000), porém, encontraram níveis detectáveis de TNF- $\alpha$  apenas em duas lesões periapicais crônicas humanas, dentre 25 avaliadas.

As lesões periapicais se desenvolvem em resposta à infecção no SCR; em consequência, a resposta que ali se instala depende da composição microbiana ali presente. O *F. nucleatum* e os componentes de sua parede celular podem agir como potentes estimuladores de citocinas pró-inflamatórias,

quimiocinas e peptídios antimicrobianos (Krisanaprakornkit *et al.*, 2000; Hasegawa *et al.*, 2007). Em um estudo realizado *in vitro*, a associação do *F. nucleatum* com outras bactérias Gram-negativas, *Porphyromonas gingivalis* e *P. intermedia*, foi capaz de induzir a produção de TNF- $\alpha$  em células dendríticas maduras (Huang *et al.*, 2011). No presente experimento, o *F. nucleatum*, sozinho ou em associação com o *E. faecalis*, também promoveu a expressão gênica dessa citocina nos tecidos periapicais avaliados. O ácido lipoteicoico isolado de cepas de *E. faecalis* e outras bactérias Gram-positivas também estimularam leucócitos a liberarem TNF- $\alpha$  em amostras de lesões periapicais em estudos realizados *in vitro* (Kayaoglu & Ørstavik, 2004). No presente trabalho, apesar do *E. faecalis* em mono-infecção ter induzido níveis basais de TNF- $\alpha$  nos dois momentos avaliados (10 e 20 dias), essa expressão no 10º dia foi estatisticamente menor que a observada para o *F. nucleatum*, em mono ou em infecção mista com o *E. faecalis*.

IFN- $\gamma$  é uma citocina do tipo 1 considerada de grande importância na ativação da fagocitose celular, induz a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Murphy & Reiner, 2002; Schroder *et al.*, 2004; Appay *et al.*, 2008; Sallusto & Lanzavecchia, 2009). Está presente em altos níveis em lesões periodontais e se relaciona à progressão e a formas mais severas das respostas perirradiculares (Garlet *et al.*, 2003; Honda *et al.*, 2006; Dutzan *et al.*, 2009b). Neste estudo, a expressão gênica do IFN- $\gamma$  no 10º dia, após a inoculação microbiana com a bi-associação, foi estatisticamente maior em relação às mono-infecções com o *F. nucleatum* e o *E. faecalis*. Por sua vez, no 20º dia, houve a redução da expressão do IFN- $\gamma$  induzido pela bi-infecção, enquanto ocorreu um aumento significativo em sua expressão em resposta ao *E. faecalis*. De maneira similar, Jiang *et al.* (1999) demonstraram que outro patógeno Gram-positivo, o *Streptococcus mutans*, estimulava a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Resultado oposto, entretanto, ocorreu para o *G. morbillorum*, que induziu a redução da expressão das citocinas IL-12 e IFN- $\gamma$  em sobrenadantes de culturas celulares (Ribeiro Sobrinho *et al.*, 2002). IFN- $\gamma$  é um potente ativador de macrófagos, provocando maior expressão de IL-1 e TNF- $\alpha$  por essas células (Ma *et al.*, 2003), modulando o RANKL e a osteoclastogênese em doenças inflamatórias periapicais (Gao *et al.*, 2007;

Garlet *et al.*, 2008; Repeke *et al.*, 2010). O aumento de IFN-  $\gamma$ , no 10<sup>o</sup> dia, em resposta à bi-infecção, está de acordo com esses achados, pois nesse mesmo período e nas mesmas condições, o RANKL e o TNF- $\alpha$  foram encontrados em altas proporções. Essa relação se repetiu no 20<sup>o</sup> dia, quando a redução da expressão do IFN-  $\gamma$  se correlacionou à das citocinas RANKL e o TNF- $\alpha$ . Alguns autores, porém, descrevem um efeito inverso para o IFN-  $\gamma$ ; ele inibiria a osteoclastogênese (Takayanagi *et al.*, 2000; Ji *et al.*, 2009).

Em condições normais, os mecanismos pró-inflamatórios devem ser controlados, pois previnem a destruição excessiva dos tecidos perirradiculares. A IL-10 e o TGF- $\beta$  são duas importantes citocinas imunorreguladoras (Jovanovic *et al.*, 1998; Couper *et al.*, 2008, Colic *et al.*, 2009; Naundorf *et al.*, 2009; Hosokawa *et al.*, 2009). A IL-10 antagoniza os efeitos pró-inflamatórios inibindo a transcrição do mRNA das citocinas desse subgrupo (Yoshimura *et al.*, 2003), agindo num mecanismo de *feed-back* negativo (Yoshimura *et al.*, 2007). De acordo com esses estudos, os elevados níveis de expressão da IL-10 induzidos pela mono-infecção com o *F. nucleatum*, no 20<sup>o</sup> dia, correlacionam-se com a baixa expressão das citocinas pró-inflamatórias RANKL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  no mesmo período, enquanto, uma baixa expressão da IL-10, no 10<sup>o</sup> dia, associa-se a alta expressão das citocinas pró-inflamatórias. Esses achados estão de acordo com o percebido anteriormente: altos níveis de produção de IL-10 por células inflamatórias desafiadas por bactérias Gram-negativas (Karlsson *et al.*, 2002; Rezende, *et al.*, 2005). A modulação da resposta pró-inflamatória induzida pela bi-associação no 20<sup>o</sup> dia, entretanto, estaria associada não à IL-10, mas ao TGF- $\beta$ , pois sua sobre-expressão nesse período, correlaciona-se com a baixa expressão de RANKL e TNF- $\alpha$ . O TGF- $\beta$  é uma citocina pleiotrópica que regula o crescimento, diferenciação e produção de matriz celular, além de ser um potente imunossupressor que controla a transcrição de fatores pró-inflamatórios como a IL-1 $\beta$  e o TNF- $\alpha$  (Okada & Murakami, 1998; Steinsvoll *et al.*, 1999). Interessante mencionar que, a resposta pró-inflamatória tardia observada quando da mono-infecção por *E. faecalis*, com uma alta expressão de IFN- $\gamma$  no 20<sup>o</sup> dia, não demonstrou sofrer os efeitos regulatórios das citocinas IL-10 e TGF-  $\beta$ ; ao contrário, inibiu a expressão de ambas. Como IFN- $\gamma$  é uma importante citocina que medeia o



mudança de isotipos de células B, com o crescimento da produção de IgG2 (Al-Darmaki *et al.*, 2004), esse fenômeno também seria responsável pela redução na expressão do RANKL e TNF- $\alpha$ , no mesmo período, ao aumentar o *clearance* microbiano nesse sítio. Finalmente, é importante ressaltar já ter sido demonstrado que as citocinas regulatórias, IL-10 e TGF- $\beta$ , atuam diretamente sobre a osteoclastogênese. Na ausência da IL-10, observa-se a redução da expressão de osteoblastos e osteócitos (Claudino *et al.*, 2010); na sua presença, percebe-se a modulação do sistema RANK/RANKL (Garlet *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2006; Claudino *et al.*, 2008) e o estímulo à produção de OPG (Zhang & Teng, 2006). Quanto ao TGF- $\beta$ , observou-se em lesões periodontais ativas, que seus níveis correlacionam-se negativamente com RANKL, reforçando seu papel protetor contra a destruição tecidual (Steinsvoll *et al.*, 1999; Dutzan *et al.*, 2009 a, b).

## 7. Síntese dos resultados

Pode-se observar que:

- a) A mono-infecção com *F. nucleatum* induziu uma alta expressão das citocinas RANKL e TNF- $\alpha$ , no 10<sup>o</sup> dia, e uma expressão significativamente menor no 20<sup>o</sup> dia. A modulação imune percebida quanto à expressão dessas citocinas estaria associada à IL-10 que apresentou níveis significativos no 20<sup>o</sup> dia.
- b) A mono-infecção com *E. faecalis* induziu expressão basal das citocinas RANKL e TNF- $\alpha$ , tanto no 10<sup>o</sup> quanto no 20<sup>o</sup> dia, e uma alta expressão de IFN-  $\gamma$  no 20<sup>o</sup> dia. A modulação existente na presença do RANKL e TNF- $\alpha$  no 20<sup>o</sup> dia não se deve à expressão das citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$ , cuja expressão se reduziu nesse período.
- c) A associação de *F. nucleatum* e *E. faecalis* provocou alta expressão das citocinas RANKL, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , no 10<sup>o</sup> dia, e expressão significativamente menor no 20<sup>o</sup> dia. A modulação imune observada no 20<sup>o</sup> dia seria consequência da alta expressão do TGF- $\beta$  observada nesse período.

## 8. Conclusão

No modelo experimental utilizado, a expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias prevalece nos períodos iniciais de indução das alterações periapicais com concomitante redução, como resultado da modulação promovida pelas citocinas regulatórias IL-10 e TGF- $\beta$ , em resposta a uma infecção-específica.

## 9. Referências

AAS, J. A., PASTER, B. J, STOKES, L. N., OLSEN, I., DEWHIRST, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n.11, p. 5721-5732, 2005.

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., PILLAI, S. Cellular and Molecular Immunology, 6th ed. Philadelphia: Elsevier Inc. p.566. 2007.

AL-DARMAKI, S., KNIGHTSHEAD, K., ISHIHARA, Y., BEST, A., SCHENKEIN, H. A., TEW, J. G., BARBOUR, S. E. Delineation of the role of platelet-activating factor in the immunoglobulin G2 antibody response. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 11, n. 4, p. 720-728, 2004.

APPAY, V., VAN LIER, R. A., SALLUSTO, F., ROEDERER, M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. **Cytometry - A Basic Introduction**, v. 73, n. 11, p. 975-983, 2008.

AZUMA, Y., KAJI, K., KATOJI, R., TAKESHITA, S., KUDO, A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 7, p. 4858-4864, 2000.

BRITO, L. C. N., TELES, F. R., FRANÇA, E. C., RIBEIRO SOBRINHO, A. P., HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S. Use of multiple-displacement amplification and checkerboard DNA-DNA hibridization to examine the microbiota of endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 3039-3049, 2007.

BOGDAN C, VODOVOTZ Y, NATHAN C. Macrophage deactivation by interleukin 10. **Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 6, p. 1549-1555, 1991.

BRONTE, V., ZANOVELLO, P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 641-654, 2005.

CAIRES, N. C. M., NICOLI, J. N., MATOS, A. M., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A. R., DRUMMOND, M. N., RIBEIRO SOBRINHO, A. P. Partial characterization of antagonistic substance produced by *Clostridium butyricum* strain. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 265-269, 2007.

CHOU, W. Y., LU, C. N., LEE, T. H., WU, C. L., HUNG, K. S., CONCEJERO, A. M., JAWAN, B., WANG, C. H. Electroporative interleukin-10 gene transfer ameliorates carbon tetrachloride-induced murine liver fibrosis by MMP and TIMP modulation. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 4, p. 469-476, 2006.

CLAUDINO, M., TROMBONE, A. P., CARDOSO, C. R., FERREIRA, S. B. JR, MARTINS, W. JR, ASSIS, G. F., SANTOS, C. F., TREVILATTO, P. C.,

CAMPANELLI, A. P., SILVA, J. S., GARLET, G. P. The broad effects of the functional IL-10 promoter-592 polymorphism: modulation of IL-10, TIMP-3, and OPG expression and their association with periodontal disease outcome. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 84, n. 6, p 1565-1573, 2008.

CLAUDINO, M., GARLET, T. P., CARDOSO, C. R., DE ASSIS, G. F., TAGA, R., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S., GARLET, G. P. Down-regulation of expression of osteoblast and osteocyte markers in periodontal tissues associated with the spontaneous alveolar bone loss of interleukin-10 knockout mice. **European Journal of Oral Sciences**, v. 118, n. 1, p. 19-28, 2010.

COCHRAN, D. L. Inflammation and bone loss in periodontal disease. **Journal of Periodontology**, v. 79(8 Suppl), p.1569-1576, 2008.

COLIC, M., GAZIVODA, D., VUCEVIC D., VASILIJIC, S., RUDOLF, R., LUKIC, A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. **Molecular Immunology** , v. 47, n. 1, p. 101-113, 2009.

COLIC, M., GAZIVODA, D., VASILIJIC, S., VUCEVIC, D., LUKIC, A. Production of IL-10 and IL-12 by antigen-presenting cells in periapical lesions. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 9, p. 690-696, 2010.

COUPER, K. N., BLOUNT, D. G., RILEY, E. M. IL-10: the master regulator of immunity to infection. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 5771-5777, 2008.

CUTLER, C. W., JOTWANI, R. Antigen-presentation and the role of dendritic cells in periodontitis. **Periodontology 2000**, v. 35, p. 135-157, 2004.

DAHLÉN, G. Microbiology and treatment of dental abscesses and periodontal-endodontic lesions. **Periodontology 2000**, v.28, n. 1, p. 208-239, 2002.

DANIN, J., LINDER, L. E., LUNDQVIST, G., ANDERSSON, L. Tumor necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta1 in chronic periapical lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 90, n. 4, p. 514-517, 2000.

DENG, D. M., HOOGENKAMP, M. A., EXTERKATE, R. A., JIANG, L. M., VAN DER SLUIS, L .W., TEN CATE, J. M., CRIELAARD, W. Influence of *Streptococcus mutans* on *Enterococcus faecalis* biofilm formation. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 9, p. 1249-1252, 2009.

DE OLIVEIRA MENDES, S. T., RIBEIRO SOBRINHO, A. P., DE CARVALHO, A. T., DE SOUZA CÔRTEZ, M. I., VIEIRA, L. Q. *In vitro* evaluation of the cytotoxicity of two root canal sealers on macrophage activity. **Journal of Endodontics**, v. 29, n. 2, p. 95-99, 2003.

DINARELLO, C. A. Proinflammatory cytokines. **CHEST Journal**, v. 118, n. 2, p. 503-508, 2000.

DUTZAN, N., GAMONAL, J., SILVA, A., SANZ, M., VERNAL, R. Over-expression of forkhead box P3 and its association with receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand, interleukin (IL) -17, IL-10 and transforming growth factor-beta during the progression of chronic periodontitis. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 36, n. 5, p. 396-403, 2009.

DUTZAN, N., VERNAL, R., HERNANDEZ, M., DEZEREGA, A., RIVERA, O., SILVA, N., AGUILLON, J. C., PUENTE, J., POZO, P., GAMONAL, J. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 80, n. 2, p. 290-296, 2009.

DZINK, J. L., TANNER, A. C., HAFFAJEE, A. D., SOCRANSKY, S. S. Gram negative species associated with active destructive periodontal lesions. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 12, n. 8, p. 648-659, 1985.

FABRICIUS, L., DAHLÉN, G., HOLM, S. R., MÖLLER, A. J. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 90, n. 2, p. 200-206, 1982.

FINKELMAN, R. D., MOHAN, S., JENNINGS, J. C., TAYLOR, A. K., JEPSEN, S., BAYLINK, D. J. Quantitation of growth factors IGF-I, IGF-II, and TGF-beta in human dentin. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 5, n. 7, p. 717-723, 1990.

FOUAD, A. F., BARRY, J., CAIMANO, M., CLAWSON, M., ZHU, Q., CARVER, R., HAZLETT, K., RADOLF, J. D. PCR-based identification of bacteria associated with endodontic infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 9, p. 3223-3231, 2002.

GAO, Y., GRASSI, F., RYAN, M. R., TERAUCHI, M., PAGE, K., YANG, X., WEITZMANN, M. N., PACIFICI, R. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 1, p. 122-132, 2007.

GARLET, G. P., MARTINS, W. JR, FERREIRA, B. R., MILANEZI, C. M., SILVA, J. S. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 2, p. 210-217, 2003.

GARLET, G. P., MARTINS, W. JR, FONSECA, B. A., FERREIRA, B. R., SILVA, J. S. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 31, p. 671-679, 2004.

GARLET, G. P., CARDOSO, C. R., SILVA, T. A., FERREIRA, B. R., AVILA-CAMPOS, M. J., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. Expression of suppressors of cytokine signaling in diseased periodontal tissues: a stop signal for disease progression? **Journal of Periodontal Research**, v. 41, n. 6, p. 580-584, 2006

GARLET, G. P., CARDOSO, C. R., SILVA, T. A., FERREIRA, B. R., AVILA-CAMPOS, M. J., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. Cytokine pattern determines the progression of experimental periodontal disease induced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* through the modulation of MMPs, RANKL, and their physiological inhibitors. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 1, p. 12-20, 2006.

GARLET, G. P., CARDOSO, C. R., CAMPANELLI, A. P., FERREIRA, B. R., AVILA-CAMPOS, M. J., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. The dual role of p55 tumour necrosis factor-alpha receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 147, n. 1, p. 128-138, 2007.

GARLET, G. P., CARDOSO, C. R., CAMPANELLI, A. P., GARLET, T. P., AVILA-CAMPOS, M. J., CUNHA, F. Q., SILVA, J. S. The essential role of IFN-gamma in the control of lethal *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* infection in mice. **Microbes and Infection**, v. 10, n. 5, p. 489-496, 2008.

GARLET, G. P. Destructive and protective roles of cytokines in periodontitis: a re-appraisal from host defense and tissue destruction viewpoints. **Journal of Dental Research**, v. 89, n. 12, p. 1349-1363, 2010.

GAZIVODA, D., DZOPALIC, T., BOZIC, B., TATOMIROVIC, Z., BRKIC, Z., COLIC, M. Production of proinflammatory and immunoregulatory cytokines by inflammatory cells from periapical lesions in culture. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 7, p. 605-611, 2009.

GOMES B. P., DRUCKER, D. B., LILLEY, J. D. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. **International Endodontic Journal**, v. 21, n. 6, p. 291-298, 1994.

GOMES, B. P., DRUCKER, D. B., LILLEY, J. D. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. **Microbios**, v. 80, n. 325, p. 231-243, 1994.

GOMES, B. P. F. A., LILLEY, J. D., DRUCKER, D. B. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. **International Endodontic Journal**, v. 29, p. 69-75, 1996.

GOMES, B. P. F. A., LILLEY, J. D., DUCKER, D. B. Clinical significance of dental root canal microflora. **Journal of Dentistry**, v. 24, n. 1-2, p. 47-55, 1996.

GRAVES, D. T., COCHRAN, D. The contribution of interleukin-1 and tumor necrosis factor to periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v. 74, n. 3, p. 391-401, 2003.

GRAVES, D. Cytokines that promote periodontal tissue destruction. **Journal of Periodontology**, v. 79 (8 Suppl), p. 1585-1591, 2008.

GRENIER, D., MAYRAND, D. Nutritional relationships between oral bacteria. **Infection and Immunity**, v. 53, n. 3, p. 616-620, 1986.

GUPTA, S., SU, H., BI, R., GOLLAPUDI, S. Differential sensitivity of naïve and memory subsets of human CD8+ T cells to TNF-alpha-induced apoptosis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 26, n. 3, p. 193-203, 2006.

HAAPSALO, M. Black-pigmented Gram-negative anaerobes in endodontic infections. **FEMS Immunology Medical Microbiology**, v. 6, p. 213-217, 1993.

HAHN, C. L., LIEWER, F. R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. **Journal of Endodontics**, v. 33, n.6, p.643-651, 2007a.

HAHN, C. L., LIEWER, F. R. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. **Journal of Endodontics**, v. 33, n.7, p.773-781, 2007b.

HANDFIELD, M., BAKER, H. V., LAMONT, R. J. Beyond good and evil in the oral cavity: insights into host-microbe relationships derived from transcriptional profiling of gingival cells. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 3, p. 203-223, 2008.

HONDA, T., DOMON, H., OKUI, T., KAJITA, K., AMANUMA, R., YAMAZAKI, K. Balance of inflammatory response in stable gingivitis and progressive periodontitis lesions. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 144, n. 1, p. 35-40, 2006.

HORST, O. V., TOMPKINS, K. A., COATS, S. R., BRAHAM, P. H., DARVEAU, R. P., DALE, B. A. TGF-beta1 Inhibits TLR-mediated odontoblast responses to oral bacteria. **Journal of Dental Research**, v. 88, n. 4, p. 333-338, 2009.

HASEGAWA, Y., MANS, J. J., MAO, S., LOPEZ, M. C., BAKER, H. V., HANDFIELD, M., LAMONT, R. J. Gingival epithelial cell transcriptional responses to commensal and opportunistic oral microbial species. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 5, p. 2540-2547, 2007.

HOSOKAWA, Y., HOSOKAWA, I., OZAKI, K., NAKAE, H., MATSUO, T. Cytokines differentially regulate CXCL10 production by interferon-gamma-stimulated or tumor necrosis factor-alpha-stimulated human gingival fibroblasts. **Journal of Periodontal Research**, v. 44, n. 2, p. 225-231, 2009.

HOWARD, G. A., BOTTEMILLER, B. L., TURNER, R. T., RADER, J. I., BAYLINK, D. J. Parathyroid hormone stimulates bone formation and resorption in organ culture: evidence for a coupling mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the U. S. A.**, v. 78, n. 5, p. 3204-3208, 1981.

HUANG, G. T., ZHANG, H. B., DANG, H. N., HAAKE, S. K. Differential regulation of cytokine genes in gingival epithelial cells challenged by *Fusobacterium nucleatum* and *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 37, n. 6, p. 303-312, 2004.

HUANG, C. B., ALTIMOVA, Y., STRANGE, S., EBERSOLE, J. L. Polybacterial challenge effects on cytokine/chemokine production by macrophages and dendritic cells. **Inflammation Research**, v. 60, n. 2, p. 119-125, 2011.

HU, C. C., ZHANG, C., QIAN, Q., TATUM, N. B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. **Journal of Endodontics**, v. 24, n. 11, p. 744-751, 1998.

IKEDA, T., KASAI, M., UTSUYAMA, M., HIROKAWA, K. Determination of three isoforms of the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and their differential expression in bone and thymus. **Endocrinology**, v. 142, n. 4, p. 1419-1426, 2001.

JI, S., SHIN, J. E., KIM, Y. S., OH, J. E., MIN, B. M., CHOI, Y. Toll-like receptor 2 and NALP2 mediate induction of human beta-defensins by *Fusobacterium nucleatum* in gingival epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 3, p. 1044-1052, 2009.

JIANG, Y., MAGLI, L., RUSSO, M. Bacterium-dependent induction of cytokines in mononuclear cells and their pathologic consequences in vivo. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 5, p. 2125-2130, 1999.

JIN, Q., CIRELLI, J. A., PARK, C. H., SUGAI, J. V., TABA, M. JR, KOSTENUIK, P. J., GIANNOBILE, W. V. RANKL inhibition through osteoprotegerin blocks bone loss in experimental periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 78, p.1300-1308, 2007.

JOVANOVIC, D. V., DI BATTISTA, J. A., MARTEL-PELLETIER, J., JOLICOEUR, F. C., HE, Y., ZHANG, M., MINEAU, F., PELLETIER, J. P. IL-17 stimulates the production and expression of proinflammatory cytokines, IL-beta and TNF-alpha, by human macrophages. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 7, p. 3513-3521, 1998.

JUNG, I. Y., B. CHOI, K. Y., YOON, S. J. Lee e C. Y. Lee. Identification of oral spirochetes at the species level and their association with other bacteria in



endodontic infections. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 92, p. 329-334, 2001.

KHABBAZ, M. G., ANASTASIADIS, P. L., SYKARAS, S. N. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. **International Endodontics Journal**, v. 33, n. 2, p. 132-137, 2000.

KAKEHASHI, S., STANLEY, H. R., FRITZGERALD, R. J. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 20, n. 3, p. 340-349, 1965.

KARLSSON, H., HESSLE, C., RUDIN, A. Innate immune responses of human neonatal cells to bacteria from the normal gastrointestinal flora. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6688-6696, 2002.

KAWASHIMA, N., OKIJI, T., KOSAKA, T., SUDA, H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. **Journal of Endodontics**, v. 22, n. 6, p. 311-316, 1996.

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

KAWASHIMA, N., SUZUKI, N., YANG, G., OHI, C., OKUHARA, S., NAKANO-KAWANISHI, H., SUDA, H. Kinetics of RANKL, RANK and OPG expressions in experimentally induced rat periapical lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 103, n. 5, p. 707-711, 2007.

KAYA OGLU, G., ØRSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 15, n. 5, p. 308-320, 2004.

KHOSLA S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050-5055, 2001

KINDLE, L., ROTHE, L., KRISS, M., OSDOBY, P., COLLIN-OSDOBY, P. Human microvascular endothelial cell activation by IL-1 and TNF-alpha stimulates the adhesion and transendothelial migration of circulating human CD14+ monocytes that develop with RANKL into functional osteoclasts. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 2, p. 193-206, 2006.

KOBAYASHI, K., TAKAHASHI, N., JIMI, E., UDAGAWA, N., TAKAMI, M., KOTAKE, S., NAKAGAWA, N., KINOSAKI, M., YAMAGUCHI, K., SHIMA, N., YASUDA, H., MORINAGA, T., HIGASHIO, K., MARTIN, T. J., SUDA, T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism

independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. **Journal of Experimental Medicine**, v. 191, n. 2, p. 275-286,2000.

KONG, Y. Y., YOSHIDA, H., SAROSI, I., TAN, H. L., TIMMS, E., CAPPARELLI, C., MORONY, S., OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J., VAN, G., ITIE, A., KHOO, W., WAKEHAM, A., DUNSTAN, C. R., LACEY, D. L., MAK, T. W., BOYLE, W. J., PENNINGER, J. M. OPGL is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. **Nature**, v. 397, n. 6717, p. 315-323, 1999.

KÖNIG, A., MÜHLBAUER, R. C., FLEISCH, H. Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary [3H]tetracycline excretion from prelabeled mice. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 3, n. 6, p. 621-627, 1988.

KOPITAR, A. N., IHAN HREN, N., IHAN, A. Commensal oral bacteria antigens prime human dendritic cells to induce Th1, Th2 or Treg differentiation. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 21, n. 1, p. 1-5, 2006.

KRISANAPRAKORNKIT, S., KIMBALL, J. .R, WEINBERG, A., DARVEAU, R. P., BAINBRIDGE, B. W., DALE, B. A. Inducible expression of human beta-defensin 2 by *Fusobacterium nucleatum* in oral epithelial cells: multiple signaling pathways and role of commensal bacteria in innate immunity and the epithelial barrier. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2907-2915, 2000.

KWAN TAT, S., PADRINES, M., THÉOLEYRE, S., HEYMAN, D., FORTUN, Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. **Cytokine&Growth Factor Reviews**, v. 15, n. 1, p. 49-60, 2004.

LACEY, D. L., TIMMS, E., TAN, H. L., KELLEY, M. J., DUNSTAN, C. R., BURGESS, T., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., ELLIOTT, G., SCULLY, S., HSU, H., SULLIVAN, J., HAWKINS, N., DAVY, E., CAPPARELLI, C., ELI, A., QIAN, Y. X., KAUFMAN, S., SAROSI, I., SHALHOUB, V., SENALDI, G., GUO, J., DELANEY, J., BOYLE, W. J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165-176, 1998.

LADER, C. S., FLANAGAN, A. M. Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor alpha increase human osteoclast formation and bone resorption *in vitro*. **Endocrinology**, v. 139, p. 3157-3164, 1998.

LO BUE, A. M., NICOLETTI, G., TOSCANO, M. A., ROSSETTI, B., CALÌ, G., CONDORELLI, F. *Porphyromonas gingivalis* prevalence related to other microorganisms in adult refractory periodontitis. **New Microbiologica**, v. 22, n. 3, p. 209-218, 1999.

LOCKSLEY, R. M., KILLEEN, N., LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell*, v. 104, n. 4, p. 487-501, 2001.

LUKIC, A., VASILIJIC, S., MAJSTOROVIC, I., VUCEVIC, D., MOJSILOVIC, S., GAZIVODA, D., DANILOVIC, V., PETROVIC, R., COLIC, M. Characterization of antigen-presenting cells in human apical periodontitis lesions by flow cytometry and immunocytochemistry. **International Endodontic Journal**, v. 39, n. 8, p. 626-636, 2006.

MA, J., CHEN, T., MANDELIN, J., CEPONIS, A., MILLER, N. E., HUKKANEN, M., MA, G. F., KONTTINEN, Y. T. Regulation of macrophage activation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, n. 11, p. 2334-2346, 2003.

MARTIN, T. J., SIMS, N. A. Osteoclast-derived activity in the coupling of bone formation to resorption. **Trends in Molecular Medicine**, v. 11, n. 2, p. 76-81, 2005.

MARTON, I. J., KISS, C. Characterization of inflammatory cell infiltrate in dental periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 26, p. 131-136, 1993.

MASSEY, W. L., ROMBERG, D. M., HUNTER, N., HUME, W. R. The association of carious dentin microflora with tissue changes in human pulpitis. **Oral Microbiology and immunology**, v. 8, n. 1, p. 30-35, 1993.

MELO MALTOS, S. M., RIBEIRO SOBRINHO, A. P., SILVA, F. V., NICOLI, J. R., CARVALHO, M. A. R., VIEIRA, L. Q., FARIAS, L. M. Bacterial Concentrations Determine the Ability to Implant in the Root Canal System and Translocate to Lymph Nodes in Germ-free Mice. **Journal of endodontics**, v.29, n. 1, p. 24- 27, 2003.

MENEZES, R., GARLET, T. P., LETRA, A., BRAMANTE, C. M., CAMPANELLI, A. P., FIGUEIRA, R. D. E. C., SOGAYAR, M. C., GRANJEIRO, J. M., GARLET, G. P. Differential patterns of receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in human periapical granulomas: possible association with progressive or stable nature of the lesions. **Journal of Endodontics**, v. 38, n. 8, p. 932-938, 2008.

MIZUNO, A., AMIZUKA, N., IRIE, K., MURAKAMI, A., FUJISE, N., KANNO, T., SATO, Y., NAKAGAWA, N., YASUDA, H., MOCHIZUKI, S., GOMIBUCHI, T., YANO, K., SHIMA, N., WASHIDA, N., TSUDA, E., MORINAGA, T., HIGASHIO, K., OZAWA, H. Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 247, n. 3, p. 610-615, 1998.

MOORE, W. E., HOLDEMAN, L. V., CATO, E. P., SMIBERT, R. M., BURMEISTER, J. A., PALCANIS, K. G., RANNEY, R. R. Comparative

bacteriology of juvenile periodontitis. **Infection and Immunity**, v. 48, n. 2, p. 507-519, 1985.

MOREIRA JR., G.; RIBEIRO SOBRINHO, A. P.; BAMBIRRA, B. H. S.; BAMBIRRA, F. H. S.; CARVALHO, M. A. R.; FARIAS, L. M.; NICOLI, J. R.; MOREIRA, E. S. Synergistic growth effect among bacteria recovered from root canal infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2011 (*in press*).

MOSSER, D. M. The many faces of macrophage activation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 2, p. 209-212, 2003.

MUELLER, K. L. Innate immunity. Recognizing the first responders. Introduction. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 283, 2010.

MURPHY, K. M., REINER, S. L. The lineage decisions of helper T cells. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 12, p. 933-944, 2002.

NAUNDORF, S., SCHRÖDER, M., HÖFLICH, C., SUMAN, N., VOLK, H. D., GRÜTZ, G. IL-10 interferes directly with TCR-induced IFN-gamma but not IL-17 production in memory T cells. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 4, p. 1066-1077, 2009.

OKADA, H., MURAKAMI, S. Cytokine expression in periodontal health and disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 9, n. 3, p. 248-266, 1998.

PASTER, B. J., BOCHES, S. K., GALVIN, J. L., ERICSON, R. E., LAU, C. N., LEVANOS, V. A., SAHASRABUDHE, A., DEWHIRST, F. E. Bacterial diversity in human subgingival plaque. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 12, p. 3770-3783, 2001.

PECIULIENE, V., BALCIUNIENE, I., ERIKSEN, H. M., HAAPASALO, M. Isolation of *Enterococcus faecalis* in previously root-filled canals in a Lithuanian population. **Journal of Endodontics**, v. 26, n. 10, p. 593-595, 2000.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: FILHO, GB. *Bogliolo Patologia Geral*. 6ª edição. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2000. c. 7, p. 112-148.

PESCHON, J. J., TORRANCE, D. S., STOCKING, K. L., GLACCUM, M. B., OTTEN, C., WILLIS, C. R., CHARRIER, K., MORRISSEY, P. J., WARE, C. B., MOHLER, K. M. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. **Journal of Immunology**, v. 160, n. 2, p. 943-952, 1998.

PESTKA, S., KRAUSE, C. D., SARKAR, D., WALTER, M. R., SHI, Y., FISHER, P. B. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 929-979, 2004.

PIMENTEL, L. L., SEMEDO, T., TENREIRO, R., CRESPO, M. T., PINTADO, M. M., MALCATA, F. X. Assessment of safety of enterococci isolated throughout traditional Terrincho cheesemaking: virulence factors and antibiotic susceptibility. **Journal of Food Protection**, v. 70, n. 9, p. 2161-2167, 2007.

PINHEIRO, E. T., GOMES, B. P. F. A., FERRAZ, C. C. R., SOUZA, E. L. R., TEIXEIRA, F. B., SOUZA-FILHO, F. J. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **International Endodontic Journal**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2003.

PIRANI, C., BERTACCI, A., CAVRINI, F., FOSCHI, F., ACQUAVIVA, G. L., PRATI, C., SAMBRI, V. Recovery of *Enterococcus faecalis* in root canal lumen of patients with primary and secondary endodontic lesions. **New Microbiologica**, v. 31, n. 2, p. 235-240, 2008.

QUINN, J. M., ITOH, K., UDAGAWA, N., HAUSLER, K., YASUDA, H., SHIMA, N., MIZUNO, A., HIGASHIO, K., TAKAHASHI, N., SUDA, T., MARTIN, T. J., GILLESPIE, M. T. Transforming growth factor beta affects osteoclast differentiation via direct and indirect actions. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.16, n. 10, p. 1787-1794, 2001.

RAHNERT, J., FAN, X., CASE, N., MURPHY, T. C., GRASSI, F., SEN, B., RUBIN, J. The role of nitric oxide in the mechanical repression of RANKL in bone stromal cells. **Bone**, v. 43, n. 1, p. 48-54, 2008.

REPEKE, C. E., FERREIRA, S. B. JR, CLAUDINO, M., SILVEIRA, E. M., DE ASSIS, G. F., AVILA-CAMPOS, M. J., SILVA, J. S., GARLET, G. P. Evidences of the cooperative role of the chemokines CCL3, CCL4 and CCL5 and its receptors CCR1+ and CCR5+ in RANKL+ cell migration throughout experimental periodontitis in mice. **Bone**, v. 46, n. 4, p. 1122-1130, 2010.

REZENDE, T. M., VARGAS, D. L., CARDOSO, F. P., SOBRINHO, A. P., VIEIRA, L. Q. Effect of mineral trioxide aggregate on cytokine production by peritoneal macrophages. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 12, p. 896-903, 2005.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P., LANNA, M. A., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A., NICOLI, J. R., UZEDA, M., VIEIRA, L. Q. Implantation of bacteria from human pulpal necrosis and translocation from root canals in gnotobiotic mice. **Journal of endodontics**, v. 27, n. 10, p. 605-609, 2001.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P., MELO MALTOS, S. M., FARIAS, L. M., CARVALHO, M. A., NICOLI, J. R., UZEDA, M., VIEIRA, L. Q. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. **Oral Microbiology and Immunology**, v.17, n. 6, p. 344-353, 2002.

RIBEIRO SOBRINHO, A. P., RABELO F. L., FIGUEIREDO, C. V., ALVAREZ LEITE, J. L., NICOLI, J. R., UZEDA, M., VIEIRA, L. Q. Bacteria recovered from dental pulp induce apoptosis of lymph node cells. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 413-416, 2005.

ROCAS, I. N., JUNG, I.Y., LEE, C. Y., SIQUEIRA, J. F., Jr. Polymerase chain reaction identification of microorganisms in previously root-filled teeth in a South Korean population. **Journal of endodontics**, v. 30, p. 504-508, 2004.

RÔÇAS, I. N., SIQUEIRA, J. F., Jr., SANTOS, K. R., COELHO, A. M. "Red Complex" (*Bacteroides forsythus*, *Porphyromonas gingivalis*, and *Treponema denticola*) in endodontic infections: a molecular approach. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 91, p. 468-471, 2001.

RÔÇAS, I. N., SIQUEIRA, J. F. Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. **Journal of Endodontics**, v. 36, n. 1, p. 45-52, 2010.

SALLUSTO, F., LANZAVECCHIA, A. Heterogeneity of CD4+ memory T cells: functional modules for tailored immunity. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 8, p. 2076-2082, 2009.

SASAKI, H., OKAMATSU, Y., KAWAI, T., KENT, R., TAUBMAN, M., STASHENKO, P. The interleukin-10 knockout mouse is highly susceptible to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss. **Journal of Periodontal Research**, v. 39, n. 6, p. 432-441, 2004.

SCHRODER, K., HERTZOG, P. J., RAVASI, T., HUME, D. A. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 75, n. 2, p. 163-189, 2004.

SEDGLEY, C. M., NAGEL, A. C., SHELBURNE, C. E., CLEWELL, D. B., APPELBE, O., MOLANDER, A. Quantitative real-time PCR detection of oral *Enterococcus faecalis* in humans. **Archives of Oral Biology**, v. 50, n. 6, p. 575-583, 2005.

SEDGLEY, C. M., LENNAN, S. L., APPELBE, O. K. Survival of *Enterococcus faecalis* in root canals ex vivo. **International Endodontic Journal**, v. 38, n. 10, p. 735-742, 2005.

SEDGLEY, C., NAGEL, A., DAHLÉN, G., REIT, C., MOLANDER, A. Real-time quantitative polymerase chain reaction and culture analyses of *Enterococcus faecalis* in root canals. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 3, p. 173-177, 2006.

SEOL, J. H., CHO, B. H., CHUNG, C. P., BAE, K. S. Multiplex polymerase chain reaction detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **Journal of Endodontics**, v. 32, n. 2, p. 110-114, 2006.

SEYMOUR, G. J., GEMMELL, E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 59, n. 3, p. 167-173, 2001.

SILVA, M. J., VIEIRA, L. Q., RIBEIRO SOBRINHO, A. P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 105, n. 5, p. 70-76, 2008.

SILVA, M. J., SOUSA, L. M., LARA, V. P., CARDOSO, F. P., JÚNIOR, G. M., TOTOLA, A. H., CALIARI, M. V., ROMERO, O. B., SILVA, G. A., RIBEIRO-SOBRINHO, A. P., VIEIRA, L. Q. The role of iNOS and PHOX in periapical bone resorption. **Journal of Dental Research**, v. 90, n. 4, p. 495-500, 2011.

SILVA, T. A., GARLET, G. P., LARA, V. S., MARTINS, W. Jr, SILVA, J. S., CUNHA, F. Q. Differential expression of chemokines and chemokine receptors in inflammatory periapical diseases. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 20, n.5, p. 310-316, 2005.

SIMONET, W. S., LACEY D. L., DUNSTAN, C. R., KELLEY, M., CHANG, M. S., LÜTHY, R., NGUYEN, H. Q, WOODEN, S., BENNETT, L., BOONE, T., SHIMAMOTO, G., DEROSE, M., ELLIOTT, R., COLOMBERO, A., TAN, H. L., TRAIL, G., SULLIVAN, J., DAVY, E., BUCAY, N., RENSHAW-GEGG, L., HUGHES, T. M., HILL, D., PATTISON, W., CAMPBELL, P., SANDER, S., VAN, G., TARPLEY, J., DERBY, P., LEE, R., BOYLE, W. J. Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 309-319, 1997.

SIQUEIRA, J. F., Jr., RÔÇAS, I. N., FAVIERI, A., OLIVEIRA, J. C. M., SANTOS, K. R. N. Polymerase chain reactions detection of *Treponema denticola* in endodontic infections within root canals. **International Endodontic Journal**, v. 34, n. 4, p. 280-284, 2001.

SIQUEIRA, J. F., Jr., ROCAS, I. N., OLIVEIRA, J. C., SANTOS, K. R. Molecular detection of Black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. **Journal of Endodontics**, v. 27, p. 563-566, 2001.

SIQUEIRA, J. F., RÔÇAS, I. N., DE UZEDA, M., COLOMBO, A. P., SANTOS, K. R. Comparison of 16S rDNA-based PCR and checkerboard DNA-DNA hybridisation for detection of selected endodontic pathogens. **Journal of Medical Microbiology**, v.51, n.12, p. 1090-1096, 2002.

SIQUEIRA, J. F., RÔÇAS, I. N., ALVES, F. R., SANTOS, K. R. Selected endodontic pathogens in the apical third of infected root canals: a molecular investigation. **Journal of Endodontics**, v. 30, n. 9, p. 638-643, 2004.

SIQUEIRA, J. F. Jr., RÔÇAS, I. N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. **Journal of Endodontics**, v. 31, n. 6, p. 411-423, 2005.

SIQUEIRA, J. F., Jr., RÔÇAS, I. N., ROSADO, A. S. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) to the analysis of endodontic infections. **Journal of Endodontics**, v. 31, n.11, p. 775-782, 2005.

SIQUEIRA, J. F. JR, RÔÇAS I. N. PCR methodology as a valuable tool for identification of endodontic pathogens. **Journal of Dental Research**, v. 31, n. 5, p. 333-339, 2005.

SLOAN, A. J., MATTHEWS, J. B. TGF-beta receptor expression in human odontoblasts and pulpal cells. **Histochemical Journal**, v. 31, p. 565-569, 1999.

SMITH, A. J., MATTHEWS, J. B., HALL, R. C. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. **European Journal of Oral Sciences**, v. 1, p. 179-184, 1998.

SMITH, A. J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. **Journal of Dental Education**, v. 67, n. 6, p. 678-689, 2003.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D., DZINK, J. L., HILMAN, J. D. Associations between microbial species in subgingival plaque samples. **Oral Microbiology Immunology**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 1988.

STASHENKO, P., YU, S. M. T helper and T suppressor cell reversal during the development of induced rat periapical lesions. **Journal of Dental Research**, v. 68, n. 5, p. 830-834, 1989.

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

STEINSVOLL, S., HALSTENSEN, T. S., SCHENCK, K. Extensive expression of TGF-beta1 in chronically-inflamed periodontal tissue. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 26, n. 6, p. 366-373, 1999.

SUNDQVIST, G. Bacteriological studies of necrotic dental pulps. Umea, 1976. 94p. Dissertation (Master) – University of Umea, Sweden.

SUNDQVIST, G. Association between microbial species in dental root canal infections. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 7, p. 257-262, 1992.



SUNDQVIST, G. Ecology of root canal flora. **Journal of Endodontics**, v. 18, p. 427-430, 1992.

SUNDQVIST, G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 78, n. 4, p. 522-530, 1994.

TAKAHASHI, K. Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. **International Endodontic Journal**, v. 31, n. 5, p. 311-325, 1998.

TAKAYANAGI, H. OGASAWARA, K., HIDA, S., CHIBA, T., MURATA, S., SATO, K., TAKAOKA, A., YOKOCHI, T., ODA, H., TANAKA, K., NAKAMURA, K., TANIGUCHI, T. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signalling cross-talk between RANKL and IFN-gamma. **Nature**, v. 408, n. 6812, p. 600-605, 2000.

TEITELBAUM, S. L., TONDRAVI, M. M., ROSS, F. P. Osteoclasts, macrophages, and the molecular mechanisms of bone resorption. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 61, n. 4, p. 381-388, 1997.

TENG, Y. T., MAHAMED, D., SINGH, B. Gamma interferon positively modulates *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-specific RANKL+ CD4+ Th-cell-mediated alveolar bone destruction in vivo. **Infection and Immunity**, v.73, n. 6, p. 3453-3461, 2005.

THOMSON, B. M., MUNDY, G. R., CHAMBERS, T. J. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. **Journal of Immunology**, v. 138, n. 3, p. 775-779, 1987.

TING, J. P., DUNCAN, J. A., LEI, Y. How the noninflammasome NLRs function in the innate immune system. **Science**, v. 327, n. 5963, p. 266-290, 2010.

TORABINEJAD, M. Mediators of acute and chronic periradicular lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 78, n. 4, p. 511-521, 1994.

TRONSTAD, L. Recent development in endodontic research. **Scandinavian Journal of Dental Research**, v. 110, n. 1, p. 52-59, Feb. 1992.

TZIAFAS, D., PAPADIMITRIOU, S. Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis in vivo. **European Journal of Oral Sciences**, v. 1, p. 192-196, 1998.

VAN DER VELDEN, U., VAROUFAKI, A., HUTTER, J. W., XU, L., TIMMERMAN, M. F., VAN WINKELHOFF, A. J., LOOS, B. G. Effect of smoking and periodontal treatment on the subgingival microflora. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 30, n. 7. p. 603-610, 2003.

VEERAYUTTHWILAI, O., BYERS, M. R., PHAM, T. T., DARVEAU, R. P., DALE, B. A. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 22, n. 1, p. 5-13, 2007.

VERNAL, R., GARCIA-SANZ, J. A. Th17 and Treg cells, two new lymphocyte subpopulations with a key role in the immune response against infection. **Infectious Disorders – Drug Targets**, v. 8, n. 4, p. 207-220, 2008.

VIANNA, M. E., HORZ, H. P., CONRADS, G., FERES, M., GOMES, B. P. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 4, p. 282-290, 2008.

WAJANT, H., PFIZENMAIER, K., SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor signaling. **Cell Death & Differentiation**, v. 10, n. 1, p. 45-65, 2003

WANG, C. Y., STASHENKO, P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. **Journal of Dental Research**, v. 70, n. 10, p. 1362-1366, 1991.

WILLIAMS, J. M., TROPE, M., CAPLAN, D. J., SHUGARS, D. C. Detection and quantitation of *E. faecalis* by real-time PCR (qPCR), reverse transcription-PCR (RT-PCR), and cultivation during endodontic treatment. **Journal of endodontics**, v. 32, n. 8, p. 715-721, 2006.

XANTHOULEA, S., PASPARAKIS, M., KOUSTENI, S., BRAKEBUSCH, C., WALLACH, D., BAUER, J., LASSMANN, H., KOLLIAS, G. Tumor necrosis factor (TNF) receptor shedding controls thresholds of innate immune activation that balance opposing TNF functions in infectious and inflammatory diseases. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 200, n. 3, p. 367-376, 2004.

YAMASAKI, M., KUMAZAWA, M., KOHSAKA, T., NAKAMURA, H., KAMEYAMA, Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. **Journal of Endodontics**, v.20, n. 1, p. 13-7, 1994.

YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., MOCHIZUKI, S., TOMOYASU, A., YANO, K., GOTO, M., MURAKAMI, A., TSUDA, E., MORINAGA, T., HIGASHIO, K., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., SUDA, T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 7, p. 3597-3602, 1998.

YASUDA, H., SHIMA, N., NAKAGAWA, N., YAMAGUCHI, K., KINOSAKI, M., GOTO, M., MOCHIZUKI, S. I., TSUDA, E., MORINAGA, T., UDAGAWA, N., TAKAHASHI, N., SUDA, T., HIGASHIO, K. A novel molecular mechanism

modulating osteoclast differentiation and function. **Bone**, v. 25, n. 1, p. 109-113, 1999.

YOSHIMURA, A., MORI, H., OHISHI, M., AKI, D., HANADA, T. Negative regulation of cytokine signaling influences inflammation. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, n. 6, p. 704-708, 2003.

YOSHIMURA, A., NAKA, T., KUBO, M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 6, p. 454-465, 2007.

ZHAO, S., SLOAN, A. J., MURRAY, P. E., LUMLEY, P. J., SMITH, A. J. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. **Histochemical Journal**, v. 32, n. 8, p. 489-494, 2000.

ZHANG, D., GOETZ, W., BRAUMANN, B., BOURAUUEL, C., JAEGER, A. Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats. **Journal of Periodontal Research**, v. 38, n. 3, p. 324-332, 2003.

ZHANG, X., TENG, Y. T. Interleukin-10 inhibits Gram-negative-microbe-specific human receptor activator of NF-kappaB ligand-positive CD4<sup>+</sup>-Th1-cell-associated alveolar bone loss in vivo. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 8, p. 4927-4931, 2006.

ZHANG, W., WALBOOMERS, X. F., JANSEN, J. A. The formation of tertiary dentin after pulp capping with a calcium phosphate cement, loaded with PLGA microparticles containing TGF-beta1. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 85, n. 2, p. 438-444, 2008.

ZHENG, H., YU, X., COLLIN-OSDOBY, P., OSDOBY, P. RANKL stimulates inducible nitric-oxide synthase expression and nitric oxide production in developing osteoclasts. An autocrine negative feedback mechanism triggered by RANKL-induced interferon-beta via NF-kappaB that restrains osteoclastogenesis and bone resorption. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 23, p. 15809-15820, 2006.

ZOU, W., HAKIM, I., ENDRES, S., BAR-SHAVIT, Z. Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 85, n. 1, p. 70-83, 2001.