

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ENDODONTIA**

ANDRÉA LONGONI FREDRICH

**IMUNOEXPRESSÃO DE RANKL, CCL5/RANTES E CCR5
EM INFLAMAÇÃO PULPAR AGUDA EM RATOS,
INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO TECIDUAL,
ÁCIDO LIPOTEICÓICO OU LIPOPOLISSACARÍDEO**

***IMUNOEXPRESSION OF RANKL, CCL5/RANTES AND CCR5
IN ACUTE DENTAL PULP INFLAMMATION IN RATS,
INDUCED BY TISSUE EXPOSURE,
LIPOTEICHOIC ACID OR LIPOPOLYSACCHARIDE***

Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

Orientador

PORTO ALEGRE

2014

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL: DOUTORADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA**

**IMUNOEXPRESSÃO DE RANKL, CCL5/RANTES E CCR5
EM INFLAMAÇÃO PULPAR AGUDA EM RATOS,
INDUZIDA POR EXPOSIÇÃO TECIDUAL,
ÁCIDO LIPOTEICÓICO OU LIPOPOLISSACARÍDEO**

***IMUNOEXPRESSION OF RANKL, CCL5/RANTES AND CCR5
IN ACUTE DENTAL PULP INFLAMMATION IN RATS,
INDUCED BY TISSUE EXPOSURE,
LIPOTEICHOIC ACID OR LIPOPOLYSACCHARIDE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como requisito para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, na área de concentração de Endodontia.

ANDRÉA LONGONI FREDRICH

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo

PORTO ALEGRE

2014

Agradecimientos

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** por me dar saúde, força e determinação para seguir esta jornada.

Aos meus pais, **Artur Villamil Fredrich** e **Maria Regina Longoni Fredrich**, e aos meus irmãos **Luciana Longoni Fredrich** e **Fábio Artur Longoni Fredrich**, pelo apoio incondicional, motivação e carinho. Minha família é meu alicerce para enfrentar qualquer adversidade.

À **Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)**, juntamente com seus **professores do Mestrado/Doutorado em Odontologia**, pelas oportunidades oferecidas para o desenvolvimento deste estudo e pelos ensinamentos passados.

Ao meu orientador **Eraldo Luiz Batista Júnior**, pela confiança, oportunidade de realização deste trabalho e pelos ensinamentos.

Ao meu segundo orientador, **José Antônio Poli de Figueiredo**, pelo grande apoio, dedicação, e credibilidade em ter me aceito como orientada no final deste Doutorado.

Aos meus **colegas do Mestrado/Doutorado em Endodontia da PUCRS**, pela união, convivência e amizade.

À minha colega de Doutorado e amiga, **Roberta Kochenborger Scarparo**, pela valiosa colaboração e dedicação neste trabalho; amizade que ficará para sempre.

À colega e amiga **Lenara Dondoni**, pela colaboração na execução da parte prática da pesquisa.

Ao **Tiago Giulianni** pela dedicação no processamento histológico das amostras deste trabalho.

Ao **Juliano Soares** e à aluna de graduação **Eveline**, pela ajuda na manutenção dos animais no Biotério da PUCRS.

À professora **Fernanda Morroni** pela disponibilização do Laboratório de Farmacologia Aplicada.

À professora **Marta G. Amaral**, do Centro Desenvolvimento Tecnológico/CDTec da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), pela disponibilização de fazer as fotos no microscópio.

Aos professores da Faculdade de Odontologia da UFPel, **Luis Fernando Silveira** e **Antônio Leites**, por me incentivarem na busca de minha qualificação profissional.

Ao ex-chefe do Posto Médico da Guarnição de Pelotas (PMGu-Pel), **Ubiratã Leão Terres**, pelo grande apoio e incentivo que tive para associar meu trabalho no Exército juntamente com o Doutorado.

Aos meus **colegas do PMGu-Pel** por terem me apoiado e auxiliado durante este período.

Resumo

RESUMO

Estudos de cárie demonstraram aspectos inflamatórios nos tecidos pulpaes decorrentes de infecção estabelecida. Citocinas seriam capazes de ativar células ligadas à resposta inflamatória e imune no sentido de neutralizar potenciais agentes invasores e permitir o reparo dos tecidos pulpaes. Algumas destas, denominadas quimiocinas, poderiam contribuir no estabelecimento de uma imunoterapia capaz de bloquear aquelas citocinas responsáveis pelo processo inflamatório. Na inflamação crônica estas pesquisas já possuem resultados satisfatórios. Na inflamação aguda, os estudos ainda estão inconclusivos. Este estudo teve como objetivo testar as quimiocinas CCL5/RANTES, CCR5 e RANKL na inflamação pulpar aguda. Métodos: 18 Ratos Wistar foram anestesiados. Foram feitas cavidades até a exposição pulpar nos primeiros molares inferiores. Eles foram divididos em três grupos onde se administrou solução salina estéril, lipopolissacarídeo (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) (n= 6 por grupo). Os segundos molares inferiores hígidos foram utilizados como controle. As cavidades foram seladas com amálgama e a eutanásia foi realizada após 48h. As mandíbulas foram dissecadas para exame histológico e da imunoexpressão das quimiocinas em estudo. Obteve-se como resultados: CCL5/RANTES é expressa em todos os grupos, ao contrário do CCR5, que não foi expressa. RANKL aparece apenas em células inflamatórias. Somente a expressão de RANKL foi capaz de demonstrar atividade celular na inflamação pulpar inicial.

Palavras-chave: inflamação pulpar, ácido lipoteicóico (LTA), lipopolissacarídeo (LPS), quimiocinas, CCR5, CCL5/RANTES, RANKL.

Abstract

ABSTRACT

Studies on dental caries demonstrate inflammation on dental pulp tissues following infection. Cytokines are able to activate those cells linked to inflammatory and immune response thus neutralizing potentially aggressive agents and allowing tissue repair. Some of those cytokines, denominated chemokines, could contribute to the establishment of an immunotherapy able to control those cytokines involved with the triggering of dental pulp inflammation. Research on chronic inflammation has provided some relevant insights. However, the role of certain chemokines on acute inflammation is yet not conclusive. This study attempts to unveil the role of the chemokines CCL5/RANTES, CCR5 and RANKL on initial and acute pulpal inflammation. Methods: 18 Wistar rats were subjected to anesthesia. Access was performed on their first lower molars until pulp exposure. They were divided into three experimental groups considering the solution administered: Saline, lipopolysaccharide (LPS) and lipoteichoic acid (LTA) (n=6 each group). Higid second lower molars were used as controls. The cavities were sealed with amalgam and euthanasia occurred after 48 h and the jaws were dissected for histologic evaluation. CCL5/RANTES is expressed in all groups, unlike CCR5, that was not expressed. RANKL appears only in inflammatory cells, including control group. Only RANKL could be expressed during initial pulpal inflammation, being able to detect inflammatory cell activity.

Key words: pulp inflammation, lipoteichoic acid (LTA), lipopolyssaccharide (LPS), chemokines, CCR5, CCL5/RANTES/RANTES, RANKL.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
1.1 FISILOGIA PULPAR E RESPOSTA A AGONISTAS BACTERIANOS	13
1.2 O PAPEL DAS QUIMIOCINAS NO PROCESSO INFLAMATÓRIO	16
1.3 OBJETIVO	20
2. CAPÍTULO I	22
<i>ARTIGO: Immunoexpression of CCL5/RANTES and CCR5 in dental pulp inflammation induced by tissue exposure, lipoteichoic acid or lipopolysaccharide</i>	
3. DISCUSSÃO GERAL	42
5. CONCLUSÕES	46
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
7. ANEXO 1	
<i>Tabela de abreviações</i>	55

1. Introdução geral

1. INTRODUÇÃO GERAL

1.1- Fisiologia pulpar e resposta a agonistas bacterianos

A estrutura dentária é alvo de bactérias intra-orais que iniciam o processo cariioso através da desmineralização do esmalte dentário, pelos ácidos bacterianos decorrentes da conversão da dieta cariogênica. O rompimento desta barreira dentária torna o complexo dentino-pulpar vulnerável ao meio oral e a dentina passa a ser degradada inicialmente por bactérias G+, incluindo lactobacilos, estreptococos e actinomicetes. Estes microrganismos desencadeiam uma resposta imune/inflamatória através da liberação de seus subprodutos nos túbulos dentinários, chegando até a polpa (FARGES *et al.*, 2009). Quando o processo é desenfreado, ocorre pulpíte irreversível, necrose pulpar, infecção do sistema de canais radiculares e doença periapical (HEYERAAS, BERGGREEN, 1999; LOVE, JENKINSON, 2002). Recentes estudos mostram que os odontoblastos são fundamentais pelo desenvolvimento das respostas imune/inflamatória frente à contaminação bacteriana (DURAND *et al.*, 2006; VEERAYUTTHWILAI *et al.*, 2007).

Os odontoblastos derivam das células mesenquimais da crista neural, produzindo colágeno do tipo I, que forma a camada de pré-dentina (HAHN, LIEWEHR, 2007a). Os mesmos formam prolongamentos que se estendem pelos túbulos dentinários, onde as bactérias e/ou produtos provenientes da parede celular os contatam (HAHN, LIEWEHR 2007b; JONTELL, GUNRAJ, BERGENHOLTZ, 1987). No elemento dentário, constituem a primeira linha de defesa da unidade dentária. As células imunes estão presentes tanto em

polpas sadias quanto inflamadas e podem contribuir no processo de resolução na inflamação em polpas expostas. Dentre elas estão células dendríticas e macrófagos, que ativam linfócitos T (JONTELL *et al.*, 1988; JONTELL *et al.*, 1998; NISHIKAWA, SASAKI, 1999; GOLDBERG *et al.*, 2008). Estas células migram independentemente, contrastando com os fibroblastos da polpa, que estão distribuídas uniformemente (WADACHI, HARGREAVES, 2006).

O complexo dentino-pulpar reconhece antígenos bacterianos provenientes do processo carioso inicialmente pela resposta imune inata, através de imunoglobulinas presentes no fluido dentinário, nos odontoblastos, nos neuropeptídeos inflamatórios e células de imunidade inata. Dentre estas, estão DCs, NKs, células T, assim como citocinas e quimiocinas (JONTELL, GUNRAJ, BERGENHOLTZ, 1987) que têm um papel chave na manutenção da integridade da estrutura pulpar. Com o aumento da permeabilidade vascular e com o avanço do processo carioso, as fibras sensoriais são estimuladas e ocorre aumento na expressão e ativação de rotas envolvendo receptores *Toll*-like (TLR) (AKIRA, UEMATSU, TAKEUCHI, 2006). A transição para uma resposta imune adaptativa se dá com a progressão do processo carioso em direção à polpa e a limitação da resposta inata de resolver o processo (HAHN, LIEWEHR 2007b).

A resposta imune inata depende da detecção bacteriana através de PRRs, que são os primeiros a reconhecerem um agente infeccioso através de um conjunto de receptores denominados receptores de padrão *Toll*-like associado a patógenos (PAMPs). Estes últimos reconhecem produtos da parede celular bacteriana como lipopolissacarídeos (LPS) e ácido lipoteicóico (LTA) além de outros produtos (ROSENKILDE, SCHWARTZ, 2004).

A importância dos odontoblastos como primeira linha de sinalização da resposta inflamatória é substanciada pelo fato de que odontoblastos ativado por LTA aumentam a expressão de TLR induzindo a translocação de NF- κ B (FARGES *et al.*, 2009; DURAND *et al.*, 2006; VEERAYUTTHWILAI *et al.*, 2007). Comprovou-se que a ativação de TLR2 modula a resposta odontoblástica, devido ao fato de que a expressão deste gene é levemente suprimida pelo agonista sintético Pam3CSK4, em estudo de camada odontoblástica cultivada *in vitro* (VEERAYUTTHWILAI *et al.*, 2007). O desfecho clínico de um processo mediado por produtos bacterianos e, nesse caso o destino da unidade dentária, dependerá da natureza e quantidade de microrganismos presentes dentro da dentina, da profundidade de penetração dos mesmos em relação à evolução do processo carioso, bem como o grau de erupção e a condição de contato do dente com bactérias orais. Nesse contexto, os odontoblastos assumem importante função, pois são a primeira barreira de células em contato com antígenos bacterianos, que passam a expressar baixos níveis de interleucina (IL)-8, e de alguns genes relacionados a quimiocinas (CCL2, CCL26, CXCL4, CXCL12 e CXCL14) e seus receptores (CXCR2, CCRL1 e CCRL2) (DURAND *et al.*, 2006; JONTELL, GUNRAJ, BERGENHOLTZ, 1987). Com a progressão da lesão cariosa, as bactérias inicialmente G+ aeróbias, passam a dar lugar a bactérias G- anaeróbias e, portanto, o LPS presente nesses microorganismos estimula outros receptores já presentes na polpa sadia, estimulando a produção de inúmeras citocinas, quimiocinas e peptídeos antimicrobianos (ROSENKILDE, SCHWARTZ, 2004).

As quimiocinas são citocinas que possuem propriedades quimioatrativas seletivas, cuja função é coordenar a circulação homeostática dos leucócitos,

assim como os deslocamentos destes em direção a sítios de inflamação/infecção ou injúrias. Odontoblastos não estimulados expressam genes de algumas quimiocinas que fazem o recrutamento de DCs imaturas (FARGES *et al.*, 2009). As quimiocinas também estão envolvidas no processo de angiogênese, proliferação celular, apoptose e metástases tumorais (ALLEN, CROWN, HANDEL, 2007; BILATE 2007; VIOLA, LUSTER, 2008; TRONSTAD, 1988), sendo diferentes em odontoblastos e fibroblastos na resposta imune frente a microrganismos na polpa (FARGES *et al.*, 2009).

1.2- O papel das quimiocinas no processo inflamatório

A reação inflamatória é acompanhada por uma resposta sistêmica conhecida por resposta de fase aguda, no qual é representada por febre, produção de diversos hormônios, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda. Citocinas como IL-1, IL-6, TNF- α , são produzidas no local de inflamação, induzindo a produção de proteínas de fase aguda pelos hepatócitos, dentre elas a proteína C-reativa, que se liga a uma grande variedade de patógenos, ativa as proteínas do sistema complemento, resultando na deposição de C3b na superfície do microrganismo. Este processo termina por facilitar a fagocitose dos patógenos mediada por fagócitos que expressam receptor para C3b. O pico de produção dessas proteínas de fase aguda geralmente ocorre entre 12 e 24 horas após o início da resposta inflamatória aguda (BILATE 2007). Os estudos sobre células pulpares em inflamação aguda são escassas, e pouco se referem à biologia molecular.

O CCL5 é um membro da família de quimiocinas CC, responsável por iniciar a atividade em eosinófilos, monócitos e células T CD4+ (GAMONAL *et*

al., 2001), e o seu receptor CCR5, é competidor de RANKL. Esta quimiocina aumenta a expressão de IL-12 (48) e IFN- γ (MAKINO et al., 2002) e estimula a migração de células Th1, principalmente células T de memória (WEBER et al., 2001). O CCR5 é um receptor mediador crítico de leucócitos visto que regula a ativação de inúmeras quimiocinas CC inflamatórias como MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (DE ROSSI, ROCHA, ROSSI, 2008). Ele também faz a transdução do sinal pelo aumento do nível de íons cálcio e pode desempenhar um papel importante no controle da linhagem de proliferação ou diferenciação de granulócitos. O CCR5 é expresso em baço, timo e também na linhagem de células mielóides THP-1, linhagem de células pró-mieloblásticas KG-1A e nas células T CD4+ e CD8+ (DE ROSSI, ROCHA, ROSSI, 2008). O emprego de agregado trióxido mineral (MTA) sobre a polpa dentária induz aumento nos níveis de CCL5 10 e 20 dias após o tratamento executado no grupo-controle, mas nos grupos onde se utilizou MTA, os níveis foram bem menores (SILVA, VIEIRA, SOBRINHO, 2008), indicando que o MTA exerce efeito antiinflamatório na polpa afetando os níveis de CCL5. Estudo recente em dentes de camundongos “knockout” submetidos à movimentação ortodôntica foi observado que o CCR5 desempenham papel de supressores na ativação de mecanismos envolvidos na ativação de osteoclastos e reabsorção (ANDRADE et al., 2009).

As doenças crônico-inflamatórias estão intimamente ligadas a processos de reabsorção óssea. Dentre tais patologias podemos citar artrite reumatóide, periodontites, deficiência de estrogênio (osteoporose pós-menopausa), e estão associadas à diminuição da massa óssea local e sistêmica devido à reabsorção óssea progressiva e excessiva mediada por osteoclastos (GAO et al., 2007;

IKEDA *et al.*, 2004; PACIFICI, 2008). Em condições de quebra da homeostase tecidual, os linfócitos T ativados apresentam uma função relevante na regulação da perda óssea, através da produção de RANKL, levando à indução da osteoclastogênese (GAO *et al.*, 2007). Na artrite reumatóide, RANKL e citocinas pró-inflamatórias desempenham papel importante na progressão da doença. Avaliações histológicas revelaram que a composição celular de lesões ósseas inflamatórias em artrite reumatóide consiste inicialmente em células T e B, assim como os macrófagos (SMITH *et al.*, 1992; TORALDO *et al.*, 2002). Os linfócitos T e B são identificados como aceleradores da reabsorção óssea pela produção de citocinas e RANKL (HAN *et al.*, 2006; KOZUKA *et al.*, 2006; ADAMOPOULOS *et al.*, 2006). Os macrófagos podem se diferenciar não só em osteoclastos nos tecidos inflamados (CHU *et al.*, 1992) mas também podem estar presentes para acelerar a reabsorção óssea através da produção de citocinas pró-inflamatórias (TEITELBAUM, ROSS, 2003). A sequência de eventos bioquímicos desencadeados pela *Porphyromonas gingivalis*, um patógeno periodontal, induz a expressão de RANKL e citocinas pró-inflamatórias que estimulam os macrófagos da matriz óssea, desempenhando um importante papel na osteoclastogênese. Além disso, o RANKL tem efeitos sobre a ativação de NF- κ B, c-Fos, fator nuclear de ativação de células T (NFAT), e vários outros fatores de transcrição (SUDA *et al.*, 1999) .

Na Endodontia, os mecanismos responsáveis pela reabsorção, no caso específico, na reabsorção dentária, permanece um mistério, visto que sua etiopatogenia ainda é desconhecida. Alguns autores sugerem como causa um trauma ocorrido previamente (BARKER, LOCKETT, 1977; MANDOR, 1981; AL-NAZHAN, SPANGBERG, 1995), visto que as reabsorções internas ocorrem em

dentos anteriores e acomete em torno de 14 a 40% de crianças a adultos jovens onde a prevalência de traumas dentários é maior (ROBERTSON *et al.*, 2000; ANDREASEN, LAURIDSEN, DAUGAARD-JENSEN, 2009). Alguns autores justificam pela provável reação inflamatória crônica, onde não há sintomatologia dolorosa, sendo diagnosticado por um achado radiográfico de rotina (ANDREASEN, LAURIDSEN, DAUGAARD-JENSEN, 2009). Os odontoblastos são das primeiras células a entrar em contato com produtos bacterianos. Biologicamente isso sugere que as células pulpares têm um papel crucial na expressão de sinais bioquímicos capazes de permitir a montagem de uma resposta protetora. Assim, sinais traduzidos na forma de citocinas seriam capazes de ativar células ligadas à resposta inflamatória e imune no sentido de neutralizar potenciais agentes invasores e permitir o reparo dos tecidos pulpares. Entretanto, os mesmos sinais poderiam desencadear a odontoclastogênese e a reabsorção dentária visto que muitas das citocinas e sinais secundários, rotas de transdução e fatores de transcrição, gerados no ambiente intracelular, são comuns aos dois processos. Embora trabalhos tenham mostrado a ativação de NF- κ B por fatores de virulência bacterianos (STAQUET *et al.*, 2006), não há relatos sobre os efeitos destes componentes diretamente sobre a expressão e modulação de mecanismos que levam à ativação e diferenciação de células pulpares. Não há relatos na literatura, tanto em inflamação aguda sistêmica, quanto inflamação aguda pulpar, das quimiocinas que foram avaliadas neste estudo. Sabe-se que elas desempenham papel importante na inflamação crônica, mas ainda não é conhecido o seu papel na inflamação aguda.

O objetivo dos estudos sobre as quimiocinas analisadas seria verificar o papel delas no início do processo inflamatório agudo, e se essa função seria primordial tanto para o “engatilhamento” da reação inflamatória, quanto para o seu desenvolvimento. Esta descoberta seria de grande relevância clínica, visto que poderia auxiliar no desenvolvimento de uma imunoterapia capaz de bloquear as quimiocinas responsáveis pelo início do processo inflamatório. Na inflamação crônica estas pesquisas já possuem resultados satisfatórios, o que não ocorre na inflamação aguda.

Através das informações citadas, este trabalho objetiva analisar o processo inicial inflamatório, para identificar o papel de algumas quimiocinas, se são responsáveis pelo desencadeamento das rotas inflamatórias na polpa dentária, frente a diferentes tipos de agressão.

1.3 Objetivos

1.3.1- Objetivo geral

O presente estudo tem como objetivo caracterizar a resposta inflamatória inicial de células pulpares ao estímulo com fatores físicos ou de virulência bacterianos a partir da detecção de quimiocinas.

1.3.2- Objetivos específicos

Avaliar, através de análises histológica e imunológica, as quimiocinas RANKL, CCL5/RANTES E CCR5, frente à agressão física ou química de bactérias G+ e G-.

Caracterizar a detecção ou não destas quimiocinas no processo inflamatório inicial na polpa de ratos.

2. Capítulo I

2. Capítulo I

Artigo

Imunoexpression of RANKL, CCL5/RANTES and CCR5 in acute dental pulp inflammation in rats, induced by tissue exposure, lipoteichoic acid or lipopolysaccharide

Preparado para submissão no Journal of Endodontics – fator de impacto 2,868.

Imunoexpression of RANKL, CCL5/RANTES and CCR5 in acute dental pulp inflammation in rats, induced by tissue exposure, lipoteichoic acid or lipopolysaccharide

Fredrich AL¹, MsC, Scarparo RK¹, PhD, Dondoni L¹, MsC, Figueiredo JAP¹, PhD, Batista Jr EL², PhD.

- 1. Faculty of Dentistry - Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil**
- 2. Faculty of Dentistry - University of Manitoba, Winnipeg, Canada**

Corresponding author

Andréa Longoni Fredrich / Roberta Kochenborger Scarparo
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 6 – Partenon
Porto Alegre RS – Brazil
CEP: 90619-900

alfredrich@hotmail.com/robertascarparo@pucri.br

Acknowledgement: The authors deny any conflicts of interest.

Imunoexpression of RANKL, CCL5/RANTES and CCR5 in acute dental pulp inflammation in rats, induced by tissue exposure, lipoteichoic acid or lipopolysaccharide

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to evaluate the expression of chemokines in dental pulp inflammation induced by saline, lipoteichoic acid (LTA) or lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** Pulp exposure was performed in the left lower first molars of eighteen (18) male Wistar rats. They were divided into three groups in which either sterile saline, LTA or LPS was placed in contact with pulp tissue. After, the cavities were sealed with silver amalgam. Euthanasia was performed after 48 h and the jaws were dissected for histological evaluation of inflammation and immunoexpression of RANKL, CCL5/RANTES and CCR5. The expression of these markers was compared with the observed in the non-exposed dental pulp of the second left lower molars (negative control). **Results:** RANKL was not expressed in untreated teeth, whereas was detected in teeth in which pulp inflammation was induced by tissue exposure followed by saline, LTA or LPS application, being located in inflammatory cells. The marker expression was progressively more intense in saline, LT and LPS groups respectively. CCR5 was not expressed in none of the groups. CCL5/RANTES were expressed either in untreated teeth and in teeth in which pulp inflammation was induced by the pulp exposure followed by saline LTA or LPS application, being located in the peripheral blood vessels, inflammatory cells and odontoblasts. **Conclusions:** RANKL was expressed in dental pulp inflammatory cells after damage induced by the physical trauma of tissue exposure, LTA or LPS. The expression of CCL5/RANTES, and CCR5

does not differ among pulp inflammation from induced by the physical trauma of tissue exposure, LTA or LPS.

Key words: pulp inflammation, lipoteichoic acid (LTA), lipopolysaccharide (LPS), chemokines, RANKL, CCR5, CCL5/RANTES.

INTRODUCTION

The pulp-dentin complex is a vulnerable environment. When dental caries are established, bacteria play a role in dentin degradation and in the elicitation of in pulp immune and inflammatory response (1). Gram-positive bacteria are usual in the oral environment, being found in shallow caries or outer dentinal tubules of deep caries. On the other hand, gram-negative bacteria are detected in deep caries and in endodontic infection, being associated with pulpal and periapical inflammation (2, 3, 4, 5) In this context, bacterial endotoxins from lipoteichoic acid (LTA) (Gram positive bacteria) and lipopolysaccharide (LPS) (Gram negative bacteria) interact with host responses in the development of pulp inflammation through activity modulating pathways that remain partially unknown (1,2).

These endotoxins can gain access to pulp tissue during carious process (2). In this regard it was demonstrated that odontoblasts are activated through TLR2 by Gram-positive bacteria LTA, secreting chemokines and recruiting dendritic cells (1), while high levels of LPS stimulate cells to release proinflammatory cytokines that lead to tissue destruction through TLR4 binding

(7, 8, 9, 10). In this regard the role of other biological routes involved in dental pulp inflammatory response is unclear (6).

CCL5/RANTES is a chemokine ligand that binds to CCR5, increasing T cell adhesion to endothelial cells (2). Thus, it is commonly expressed in inflamed tissues (11-13). The role of CCL5/RANTES in modulating inflammation has been established in orthodontics (14) and periodontics (15), but the activity modulation of pulp inflammation by these chemokines warrants further attention. These data could be important in a pharmacologic perspective for testing antagonisms that could be useful in developing approaches for promoting pulp tissue healing.

RANKL is the receptor activator of nuclear factor- κ B ligand. It decoys osteoprotegerin (OPG) receptor which represents the essential molecular unit that controls osteoclast differentiation and thereby fundamental aspects of bone physiology (16-22). Recent studies suggest that growth factors and neuropeptides associated to inflammation stimulate release of RANKL in dental pulp cells (23). Also, a correlation between RANKL expression in dental pulp cells and primary root resorption was described (24). On the other hand, up to date the immunohistochemical localization of RANKL in dental pulp inflammation induced by endotoxins has not been established.

Thus, the aim of this study is to assess, through immunolocalization, the activity modulation of some chemokines in inflammatory process induced by LTA or LPS.

MATERIALS AND METHODS

Preparation of animals

This study was approved by Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul Institutional Animal Care and Use Committees (Protocol 11/00229). Eighteen (27) 7-weeks-old male Wistar rats were used. They were anesthetized intraperitoneally with ketamine 100mg/kg body weight and xylazine 10mg/kg body weight (Virbac do Brasil, Juruatuba, SP, Brazil) before the experimental procedures. Mouth opening was achieved by using a designed device (25). Pulp exposure was performed in the left lower first molars, by drilling cavities on the central portion of the occlusal surface with a 1011 HL round bur in high speed (KG Sorensen, Cotia, SP, Brazil) to a depth nearly equal to the bur diameter (1 mm). The rats were divided into three groups of six animals each. In Group 1 was applied sterile saline. In Group 2, 1mg/ml of LTA of *Staphylococcus aureus* (SIGMA - L2515- USA) was applied, and in Group 3, 1mg/ml LPS from *Escherichia coli* (SIGMA - L3012-USA). Applications were made using a sterilized cotton pellet placed directly in contact with pulp tissue and teeth were sealed with silver amalgam. The animals were fed ground and water. After 48 hours, the rats were euthanized by inhalation of isoflurane. The jaws were dissected for histological evaluation and immunostaining. The expression of the markers was compared with the observed in the non-exposed dental pulp of the second left lower molars (negative control).

Sample preparation

The samples were fixed with buffered 10% paraformaldehyde for 24h. After, the specimens were decalcified in 15% EDTA pH 7.5 (DEG-Importa OD

Quimic Products, number 101013) for 45 days, changing the solution of each three days, and processed for paraffin embedding. Five μm serial sections were obtained and mounted on slides. After deparaffinization, the samples were submitted to block endogenous peroxidase (H_2O_2) and incubated with normal serum to reduce background. The slides were incubated with primary antibodies by immunohistochemistry, to detect unconjugated CCL5/RANTES (CCL5/RANTES Antibody [NBP1-19769] Novus Biologicals- USA) and CCR5 (CCR5 polyclonal CCR5 Antibody [NBP1-41434] Novus Biologicals- USA) for 12 hours at 4°C . Sections were incubated with secondary antibody conjugated with biotin. The slices were counter-stained with hematoxylin/eosin for histological evaluation.

Histological Analysis and immunoexpression

The slices were examined under light microscopy by blind examiners. Histological and immunohistochemistry outcomes were based in a descriptive analysis of pulp tissue. The intensity of pulp inflammation, the cells types that take part of inflammatory reaction and features regarding vascularity and odontoblast layer organization were observed. The intensity of pulp inflammation was established in scores. Score 0 in no inflammation, score 1 in a little inflammation, score 2 in average inflammation, and score 3 in severe inflammation. The immunoexpression of CCL5/RANTES, and CCR5 positive cells were screened throughout the length of the pulp.

RESULTS

Histological features of LTA and LPS induced inflammation did not differ significantly from the observed after pulp exposure and placement of saline solution, although the intensity of inflammatory reaction was greater. The higid teeth was score 0. The saline group was score 1, the LTA group, score 2, and LPS group, score 3 (Figure 1). In the three tested groups, neutrophils were the predominant inflammatory cell, but limphocytes and macrophages were also detected. Superficial tissue destruction was noted under the area of pulpal exposure. Next to this zone, blood congestion, as well as the disruption of odontoblast layer was observed (Figure 2).

CCR5 was detected in none of the samples (Figure 4), while CCL5/RANTES could be observed in the inflammatory cells after pulp exposure to LTA, LPS or saline solution (Figure 3). This chemokine expression was also detected in fibroblasts, odontoblasts and peripheral blood vessels throughout the root canal, either in the test groups or in the control samples.

RANKL was not expressed in higid teeth, whereas was detected in teeth in which pulp inflammation was induced by tissue exposure followed by saline, LTA or LPS application, being located in inflammatory cells. The marker expression was progressively more intense in saline, LTA and LPS groups respectively. This chemokine expression was not detected in odontoblasts fibroblasts and in peripheral blood vessels throughout the root canal, either in the test groups or in the control samples (Figure 5).

DISCUSSION

The present study verified the immunolabeling pattern of CCL5/RANTES, RANKL and CCR5 in dental pulp inflammation induced by the physical trauma of pulp exposure followed or not by the application of LTA or LPS upon this tissue, comparing it with the baseline expression of these chemokines. The investigation of this biological route in pulp tissue brought some insights on their role in pulp reactions to different aggressions.

In some samples, initial periapical inflammation could be observed in response to pulpal damage. In these specimens, the immunostaining of CCL5/RANTES was also associated to the inflammatory response.

Up to date, CCL5/RANTES and CCR5 has been strongly associated with inflammation (6). In agreement, Marusich *et al.* (26) observed reduced expression of CCR5 ligands CCL3 (MIP-1 α) and CCL5/RANTES in the microvasculature protected and facilitated repair responses. On the other hand, in the present study the tested markers did not differ in the healthy baseline control of pulp tissue if compared to the inflamed pulp, including the samples in which LTA or LPS was applied. Even when no procedure was conducted, CCL5/RANTES was found to be expressed in the vessels peripheral cells, odontoblasts and fibroblasts, on the contrary of a previous study finding (27). A possible explanation to this difference may be the animal model employed. In this regard, other authors (28) pointed out differences in chemokine expression among various murine models. In the current investigation, rat molars were used to evaluate chemokine expression, considering their similarities with the human molar teeth (25). Otherwise, the study from Silva *et al.* (27) evaluated mice incisors, which present continuous root growth with tissues self-renewing

potential, which could have influenced in the expression of the marker. In agreement, previous studies on tumoral diseases suggested that increased age could be an important aspect when considering CCL5/RANTES up-regulation (29,30).

The current knowledge suggests that the expression of CCR5 in peripheral blood mononuclear cells might alter their adhesion to the microvasculature and their participation in inflammatory processes (31), which has been demonstrated in several inflammatory and immunological diseases (15). Nevertheless, in the results showed herein, CCR5 was not expressed in blood vessels and inflammatory cells. A possible explanation to this could be the observation of a short period of time after pulp tissue aggression, which resulted in an acute response, mainly related to neutrophils. In accordance, CCR5 chemokine receptor was described to be associated with immature dendritic cells (DCs), activated T cells, and its interaction of antigen-presenting cells (APCs) (32,33), comprising later stages of inflammatory response.

It is also possible that CCL5/RANTES binds to other receptors for playing a role in the initial pulp inflammation. In this regard, Marusich *et al.* (26) suggested other chemokine receptors, such as CCR1 and CCR3, could bind CCL5/RANTES. As a matter of fact, this ligand was expressed in inflammatory cells, odontoblasts and peripheral blood vessels, although CCR5 receptor was not found in the evaluated experimental period.

In this study, RANKL was expressed only when an inflammatory response was induced, being more intensely detected next to the area of pulpal damage, and when the endotoxins were placed upon pulp tissue. This is in accordance with clinical difficulties in obtaining healing after pulp capping of

carious exposed teeth, suggesting that the procedure should present a better prognosis in recent traumatic pulp exposure, when microorganism and their byproducts do not interact with the host responses (34).

LPS promoted the most intense immunolabeling, confirming previous descriptions of its greater aggressive potential. According to Ginsburg (2002)(35), LTA is much less potent than LPS in inducing proinflammatory cytokine production.

In disagreement with a previous study (36), RANKL was not detected in odontoblasts. This difference can be explained by the fact that RANKL-immunoreactivity was observed during deciduous root resorption, suggesting that the marker plays a role in this process. On the other hand, in acute pulp inflammation, as demonstrated herein, the expression of RANKL was limited to inflammatory cells, being more intensely detected as the intensity of inflammation increased.

Considering the experimental period observed herein (48 h after procedures) in the three test groups, neutrophils were the predominant inflammatory cell, but lymphocytes and macrophages were also detected. In agreement, the expression of RANKL has been described in initial inflammation of myocardium being related with TNF- α , IL-1 α , and IL-1 β up-regulation (37). Longer experimental periods could be observed in further studies, aiming at evaluate if RANKL plays a role when chronic inflammatory cells are dominant.

CONCLUSION

The immunoexpression of CCL5/RANTES and CCR5 does not differ among high dental pulp and inflamed pulp induced by the physical trauma of tissue exposure, LTA or LPS. CCR5 was expressed in none of the samples, suggesting other receptors that may interact with CCL5/RANTES.

RANKL was expressed in dental pulp inflammatory cells after damage induced by the physical trauma of tissue exposure, LTA or LPS.

REFERENCES

1. Durand SH, Flacher V, Romeas A, *et al.* Lipoteichoic acid increases TLR, functional chemokine expression while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol* 2006;176:2880–87.
2. Veerayutthwilai O, Byers MR, Pham TT, *et al.* Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:5–13.
3. Love RM, Jenkinson HF. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13:171–83.
4. Vianna ME, Hartz H-P, Conrads G, *et al.* Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:1–8.
5. Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod* 2008;34:268–72.
6. Farges JC, Keller JF, Carrouel F, *et al.* Odontoblasts in the Dental Pulp Immune Response. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 2009;312B:425–36.
7. Unemori EN, Ehsani N, Wang M, *et al.* Interleukin-1 and transforming growth factor- α : synergistic stimulation of metalloproteinases, PGE₂, and proliferation in human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1994;210:166–71.
8. Lin SK, Wang CC, Huang S, *et al.* Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1 α and tumor necrosis factor α through a prostaglandin-dependent pathway. *J Endod* 2001;2:185–9.
9. Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR Signaling in the Gut in Health and Disease. *J Immunol* 2005;174:4453-60.
10. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005;17:1–14.
11. Bonecchi R, Bianchi G, Bordignon PP, *et al.* Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (TH1s) and TH2s. *J Exp Med* 1998;187:129–34.

12. Ansel KM, McHeyzer-Williams LJ, Ngo VN, *et al.* In vivo activated CD4 T cells upregulate CXC chemokine receptor 5 and reprogram their response to lymphoid chemokines. *J Exp Med* 1999;190: 1123–34.
13. Sallusto F, Kremmer E, Palermo B. Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *Eur J Immunol* 1999;29:2037–45.
14. Andrade I Jr, Taddei SR, Garlet GP, *et al.* CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 2009;88:1037-41.
15. Gamonal J, Acevedo A, Bascones A, *et al.* Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodontal Res* 2001;36:194-203.
16. Lacey DL, Timms E, Tan HL, *et al.* Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 1998;93:165–176.
17. Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, *et al.* (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature* 1997;390:175–179.
18. Wong BR, Rho J, Arron J, *et al.* TRANCE is a novel ligand of the tumor necrosis factor receptor family that activates c-Jun N-terminal kinase in T cells. *J Biol Chem* 1997;272:25190–25194.
19. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597–3602.
20. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, *et al.* Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro. *Endocrinol* 1998;139:1329–1337.
21. Tsuda E, Goto M, Mochizuki S, *et al.* Isolation of a novel cytokine from human fibroblasts that specifically inhibits osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;234:137–142.
22. Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, *et al.* Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89:309–319.

23. Kojima T, Yamaguchi M, Kasai K. Substance P stimulates release of RANKL via COX-2 expression in human dental pulp cells. *Inflamm Res* 2006;55:78–84.
24. Rani CSS, MacDougall M. Dental cells express factors that regulate bone resorption. *Mol Cell Biol Res Com* 2000;3:145–152.
25. Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, *et al.* Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod* 2011;37:1069-73.
26. Marusich E, Louboutin JP, Chekmasova AA, Strayer DS. Lymphocyte adhesion to CCR5 ligands is reduced by anti-CCR5 gene delivery. *J Neur Sci* 2011;308:25–7.
27. Silva MJB, Vieira LQ, Sobrinho APR. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105:e70-e76.
28. Roffê E, Oliveira F, Souza ALS, *et al.* Role of CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes Infect* 2010;12:669–76.
29. Lui JC, Weiping Chen W, Barnes KM, Baron J. Changes in gene expression associated with aging commonly originate during juvenile growth. *Mech Ageing Dev* 2010;131:641–49.
30. Eyman D, Damodarasamy M, Plymate SR, Reed MJ. CCL5/RANTES secreted by senescent aged fibroblasts induces proliferation of prostate epithelial cells and expression of genes that modulate angiogenesis. *J Cell Physiol* 2009;220:376–81.
31. Quandt J, Dorovini-Zis K. The beta chemokines CCL4 and CCL5/RANTES enhance adhesion of specific CD4+ T cell subsets to human brainendothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:350-62.
32. Molon B, Gri G, Bettella M, *et al.* T cell costimulation by chemokine receptors. *Nat Immunol* 2005;6:465-71.
33. Son YM, Song KD, Park SM, *et al.* Lipoteichoic Acid Suppresses Effector T Cells Induced by *Staphylococcus aureus*-Pulsed Dendritic Cells. *J Microbiol Biotechnol* 2013;23:1023–30.

34. Aguilar P, Linsuwanont P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod* 2011;37:581-87.
35. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis.* 2002;2:171-9.
36. Lossdörfer S, Götz W, Jäger A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int* 2002;71:45-52.
37. Ock S, Ahn J, Lee SH *et al.* Receptor activator of nuclear factor-kB ligand is a novel inducer of myocardial inflammation. *Card Res* 2012;94:105–14.

Figure 1

Odontoblasts:				
ODONTOBLASTS	HIGID	SALINE	LTA (G +)	LPS (-)
CCR5	-	-	-	-
RANKL	-	-	-	3
CCL5/RANTES	1	1	1	1

Inflammatory cells:				
INFLAMM.	HIGID	SALINE	LTA (G+)	LPS (-)
CCR5	-	-	-	-
RANKL	-	1	2	3
CCL5/RANTES	1	1	1	1

Endothelium				
ENDOTHELIUM	HIGID	SALINE	LTA (+)	LPS (-)
CCR5	-	-	-	-
RANKL	-	-	-	-
CCL5/RANTES	1	1	1	1

Figure 2

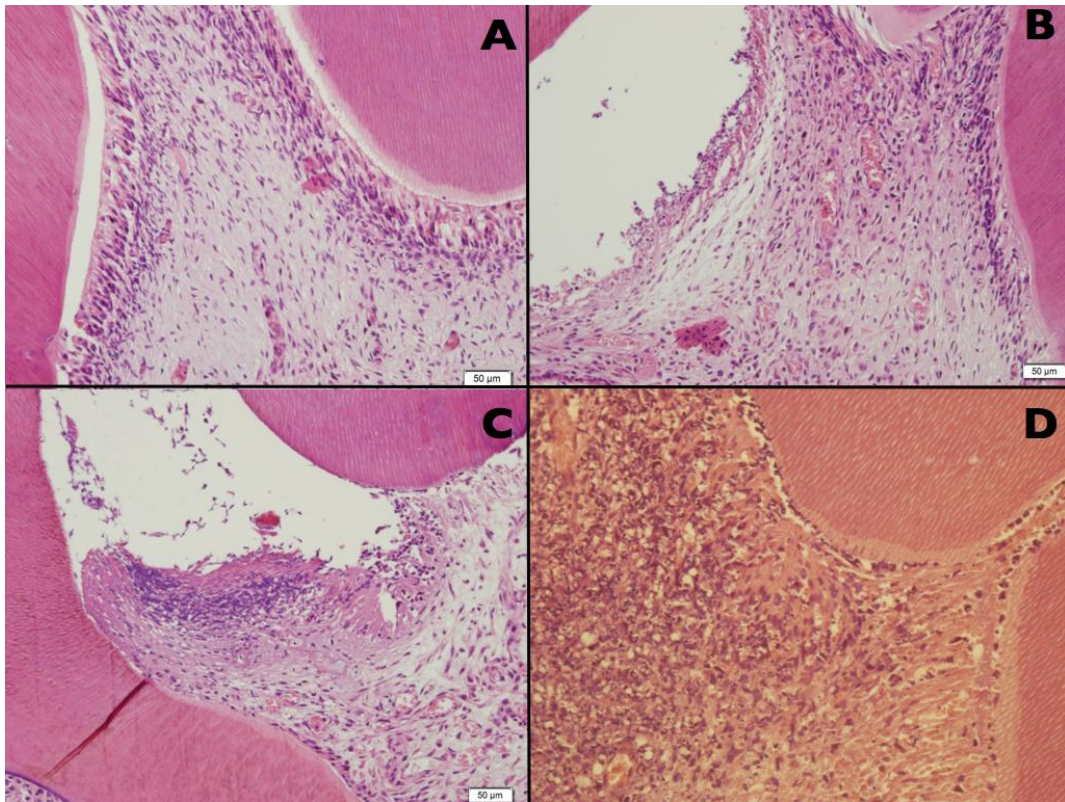


Figure 3

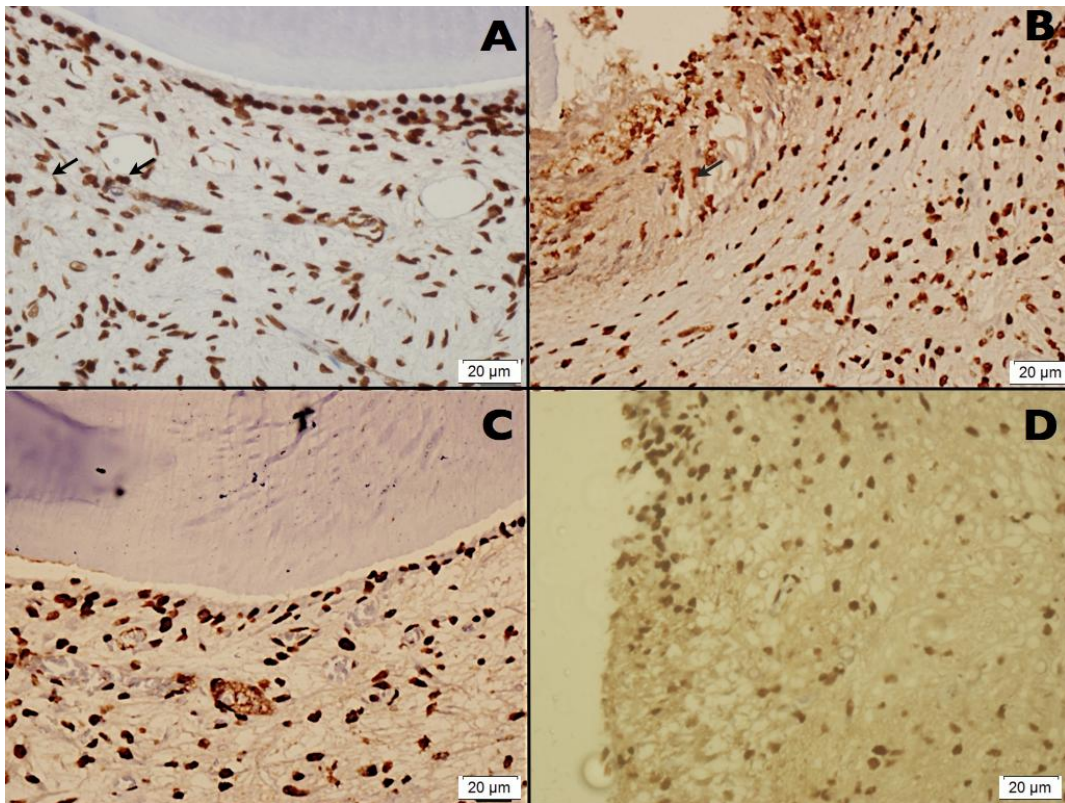


Figure 4

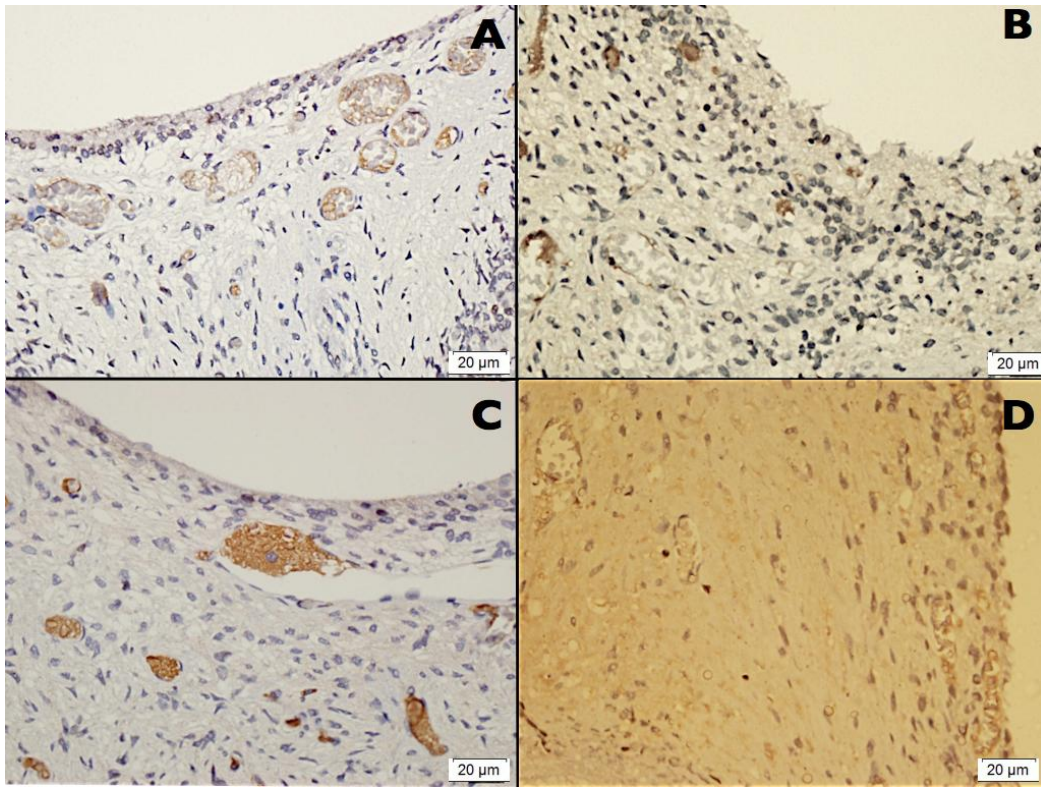


Figure 5

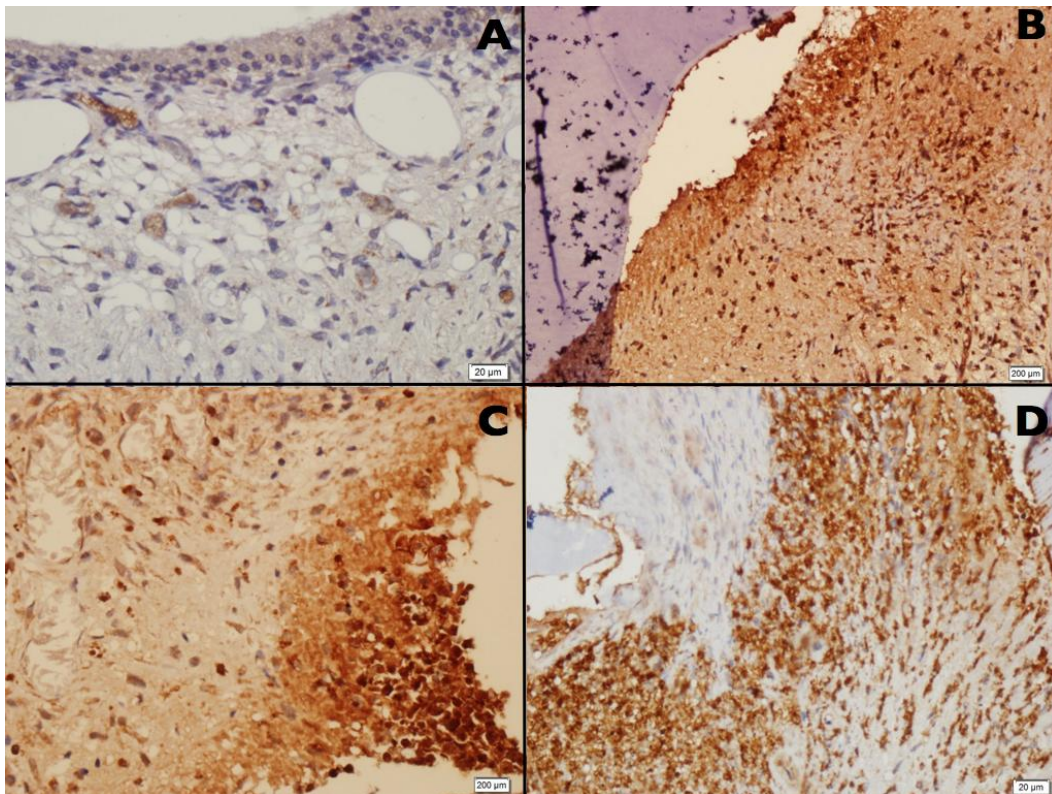


Figure legends:

Figure 1: Tables of results in scores according intensity of inflammatory response.

Figure 2: Histological aspects: Higid teeth (A). Small inflammation near the exposure area with saline solution (B). Inflammation increase in LTA when compared to saline (C). Intense inflammation with the presence of many neutrophils in LPS (abscess).(D).

Figure 3: Expression of CCL5/RANTES in higid teeth (A), and in pulp inflammation induced by mechanical exposure (B), LTA (C) and LPS (D). Arrows show cells of blood vessel expressing CCL5/RANTES (A). Inflammatory cells at the site of contact with the pellet saline (B). Immunoexpression of odontoblasts and others pulp cells (C). Inflammatory cells and pulp cells in LPS exposure (D).

Figure 4: Expression of CCR5 in higid teeth (A), and in pulp inflammation induced by mechanical exposure (B), LTA (C) and LPS (D). CCR5 was not expressed in either group.

Figure 5: Expression of RANKL in higid teeth: no cell expressing the chemokine (A). RANKL was expressed in inflammatory cells after induced by mechanical exposure (B), LTA (C) and LPS (D).

4. Discussão geral

4. Discussão geral

O presente estudo avaliou a imunoexpressão de quimiocinas na inflamação inicial em polpa de ratos frente à contaminação bacteriana ou a um agente físico, o trauma. Existem muitos estudos envolvendo quimiocinas em inflamação crônica, com reabsorção óssea a nível periapical, seja por contaminação bacteriana (GAMONAL *et al.*, 2001; GARLET *et al.*, 2006; MACIEL *et al.*, 2012; DE BRITO *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013) ou por agente físico: trauma ou movimento ortodôntico (ANDRADE *et al.* 2009). O potencial de resposta e modulação de processos inflamatórios agudos e por células de origem odontoblástica têm sido escassamente abordados apesar de recentes evidências apontarem para a grande capacidade moduladora destas que são a primeira população celular a ser envolvida em processos infecciosos da polpa dentária (LOVE & JENKINSON 2002, VEERAYUTTHWILAI *et al.*, 2007, FARGES *et al.*, 2009).

O tipo de contaminação bacteriana pode influenciar no tipo celular de reconhecimento, na progressão da inflamação, bem como na manifestação da dor. VEERAYUTTHWILAI *et al.*, (2007) verificaram um reconhecimento padrão por TLR2 para bactérias G+, e TLR4 para G- em odontoblastos. Com a intenção de comparar da intensidade da reação inflamatória, este estudo analisou o efeito das bactérias G+ e G- sobre a polpa após 48h, concordando com GINSBURG (2002) e VEERAYUTTHWILAI *et al.*, (2007) que também verificou uma inflamação mais intensa na contaminação por bactérias G-.

Assim como as citocinas, as quimiocinas também estão envolvidas na diferenciação de linfócitos Th1 e Th2. Células Th2 expressam CCR3 e CCR4 que não são expressos em células Th1, enquanto que as células Th1

expressam CCR1, CCR3 e CCR5, receptores que as células Th2 não expressam (BILATE 2007). Estudos verificaram a presença de CCR5 em polpa (FARGES *et al.*, 2009) ou em tecido periodontal inflamado (GAMONAL *et al.*, 2001), discordando com este trabalho, que não verificou a presença deste receptor nas células pulpares, possivelmente pelo fato de ser uma fase inflamatória inicial, ou seja, num período de 48h. Pode-se dizer que houve discordância em parte, já que FARGES *et al.* (2009) refere que determinados ligantes podem se ligar alternadamente em receptores específicos, como por exemplo: CCL3, CCL5/RANTES e CCL16 podem se ligar a CCR1; CCL3, CCL4, CCL5/RANTES e CCL8 se ligam a CCR5; e CXCL9, CXCL10 e CXCL11 podem se ligar a CXCR3.

Resultado oposto foi obtido pela expressão de CCL5/RANTES, que foi identificado em fibroblastos, odontoblastos e inclusive em células endoteliais em toda a extensão pulpar, tanto nos grupos teste quanto em controle.

VEERAYUTTHWILAI *et al.* (2007) demonstraram, pela primeira vez, a presença de receptores frente a microorganismos *in situ*, tais como CCR6, TLR2 e TLR4. Além disso, verificaram que houve diferença na resposta a quanto ao tipo de bactéria.G+ e G-.

O trauma pode ser considerado um aspecto relevante para a inflamação (AL-NAZHAN, SPANGBERG, 1995). O presente estudo verificou que houve expressão de RANKL nas células inflamatórias, tanto no dente abordado, simulando o trauma, quanto na contaminação bacteriana, sendo a mais intensa em polpa infectada com endotoxina G-. AGUILAR *et al.* (2011) confirma esta afirmação justificando a incapacidade de reverter o processo inflamatório após a polpa ter sido acometida pela cárie.

Nos dentes hígidos não houve imunoexpressão de RANKL. Em estudos analisando inflamação crônica, periodontal e periapical, com reabsorção óssea, demonstram que RANKL está sempre expresso nas células e é responsável pela diferenciação osteoclástica (NAKAGAWA *et al.*, 1998; HSU *et al.*, 1999; UKAI *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2013). Outro relato importante foi o fato de RANKL não ser expresso pelos odontoblastos, pelo menos neste período do estudo, estando em desacordo com pesquisa, que analisou dentes decíduos em processo de esfoliação (reabsorção dentária)(LOSSDÖRFER 2002). RANKL foi identificado apenas nas células inflamatórias, principalmente neutrófilos, mas também esteve presente em macrófagos e linfócitos, estando de acordo com estudo que analisou o aspecto inflamatório inicial do miocárdio de camundongos (OCK *et al.*, 2012) . Estudos futuros seriam necessários, com um período maior de acompanhamento da resposta inflamatória, para poder descrever RANKL frente a uma inflamação crônica, com análise de aspecto reabsortivo.

Além disso, outro fator importante a ser investigado seria(m) qual(is) receptor(es) se liga(m) à CCL5/RANTES. A presença deste ligante em todas as amostras, ao passo que não há nenhuma expressão de CCR5, pode-se sugerir que CCL5/RANTES se liga a outro receptor. Uma alternativa seria a investigação de CCR1 e CCR3, de acordo com estudos já publicados (MARUSICH *et al.*, 2011; BILATE 2007, FARGES *et al.*, 2009). Estudos adicionais são necessários, com outros receptores, já que existe a expressão de CCL5/RANTES e não houve a de CCR5.

5. Conclusões

Conclusões

A imunoexpressão de CCL5/RANTES e CCR5 não diferem entre a polpa hígida ou inflamada, tanto por agressão física quanto toxinas bacterianas. Em compensação, RANKL é expresso somente nas células inflamatórias quando há tais agressões.

RANKL serve como sinalizador de eventos iniciais inflamatórios.

6. Referências Bibliográficas

3. Referências Bibliográficas

ADAMOPOULOS, I.E.; SABOKBAR, A.; WORDSWORTH, B.P.; CARR, A.; FERGUSON, D.J.; ATHANASOU, N.A. Synovial fluid macrophages are capable of osteoclast formation and resorption. *J Pathol*, v.208, p.35–43, 2006.

AGUILAR, P.; LINSUWANONT, P. Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: a systematic review. *J Endod*, v.37, n.5, 2011.

AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, v.124, p.783–801, 2006.

ALLEN, S.J.; CROWN, S.E.; HANDEL, T.M. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annu Rev Immunol*, v.25, p.787–820, 2007.

AL-NAZHAN, S.A.; SPANGBERG, L.W. Light and SEM observation of internal root resorption of a traumatized permanent central incisor. *Int Endod J*, v.28, n.3, p.133- 136, 1995.

ANDRADE, I.J.R.; TADDEI, S.R.; GARLET, G.P.; GARLET, T.P.; TEIXEIRA, A.L.; SILVA, T.A.; TEIXEIRA, M.M. CCR5 down-regulates osteoclast function in orthodontic tooth movement. *J Dent Res*, v.88, n.11, p.1037-1041, 2009.

ANDREASEN, J.O.; LAURIDSEN, E.; DAUGAARD-JENSEN, J. Dental Traumatology: an orphan in pediatric dentistry? *Pediatr Dent*, v.31, n.2, p.153-156, 2009.

BARKER, B.C.; LOCKETT, B.C. Histology of external and internal resorption. *Aust Dent J*, v. 22, n.5, p.360-370, 1977.

BILATE, A.M.B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de Reumatologia Clínica*, v.8, n.2, p.47–51, 2007.

CHU, C.Q.; FIELD, M.; ALLARD, S.; ABNEY, E.; FELDMANN, M.; MAINI, R.N. Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. *Br J Rheumatol*, v.31, n.10, p.653–661, 1992.

DE BRITO, L.C.N.; TELES, F.R.F.; TELES, R.P.; TOTOLA, A.H., VIEIRA, L.Q.; SOBRINHO, A.P.R. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod*, v.38, n.4, p.481-485, 2012.

DE ROSSI, A.; ROCHA, L.B.; ROSSI, M.A. Interferon-gamma, Interleukin-10, Intercellular Adhesion Molecule-1 and Chemokine Receptor 5, but not Interleukin-4, Attenuate the Development of Periapical Lesions. *J Endod* v.34, n.1, p.31-8, 2008.

DURAND, S.H.; FLACHER, V.; ROMEAS, A.; CARROUEL, F.; COLOMB, E.; VINCENT, C.; MAGLOIRE, H.; COUBLE, M-L.; BLEICHER, F.; STAQUET, M-J.; LEBECQUE, S.; FARGES, J-C. Lipoteichoic acid increases TLR, functional chemokine expression while reducing dentin formation in vitro differentiated human odontoblasts. *J Immunol*, v.176, p.2880–2887, 2006.

FARGES, J.C.; KELLER, J.F.; CARROUEL, F.; DURAND, S.H.; ROMEAS, A.; BLEICHER, F.; LEBECQUE, S.; STAQUET, M.J. Odontoblasts in the dental pulp immune response. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)*, v.312B, p.425–436, 2009.

GAMONAL, J.; ACEVEDO, A.; BASCONES, A.; JORGE, O.; SILVA, A. Characterization of cellular infiltrate, detection of chemokine receptor CCR5 and interleukin-8 and RANTES chemokines in adult periodontitis. *J Periodont Res*, v.36, p.194-203, 2001.

GAO, Y.; GRASSI, F.; RYAN, M.R.; TERAUCHI, M.; PAGE, K.; YANG, X.; WEITZMANN, M.N.; PACIFICI, R. INF- γ stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest*, v.117, n.1, p.122- 132, 2007.

GARLET, G.P.; CARDOSO, C.R.B.; CAMPANELLI, A.P.; FERREIRA, B.R.; AVILA-CAMPOS, M.J.; CUNHA F.Q.; SILVA, J.S. The dual role of p55 tumour necrosis factor- α receptor in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*-induced experimental periodontitis: host protection and tissue destruction. *Clin Exp Immunol*, v.147, p.128–138, 2006.

GINSBURG, I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *Lancet Infect Dis*, p.171-179, 2002.

GOLDBERG, M.; FARGES, J.C.; LACERDA-PINHEIRO, S.; SIX, N.; JEGAT, N.; DECUP, F.; SEPTIER, D.; CARROUEL, F.; DURAND, S.; CHAUSSAIN-MILLER, C.; DENBESTEN, P.; VEIS, A.; POLIARD, A. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacol Res*, v.58, p.137–147, 2008.

HAN, X., KAWAI, T.; EASTCOTT, J.W.; TAUBMAN, M.A. Bacterial responsive B-lymphocytes induce periodontal bone resorption. *J Immunol*, v.176, p.625–631, 2006.

HAHN, C.L.; LIEWEHR, F.R. Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod*, v.33, n.3, p.213–219, 2007a.

HAHN, C.L.; LIEWEHR, F.R. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod*, v.33, n.6, p.643–651, 2007b.

HEYERAAS, K.J.; BERGGREEN, E. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.10, n.3, p.328–336, 1999.

HSU, H.; LACEY, D.L.; DUNSTAN, C.R.; SOLOVYEV, I.; COLOMBERO, A.; TIMMS, E.; TAN, H-L.; ELLIOTT, G.; KELLEY, M.J.; SAROSI I.; WANG, L.; XIA, X-Z.; ELLIOTT, R.; CHIU, L.; BLACK, T.; SCULLY, S.; CAPPARELLI, C.; MORONY, S.; GRANT SHIMAMOTO, G.; BASS, M.B.; BOYLE, W.J. Tumor necrosis factor receptor family member RANK mediates osteoclast differentiation and activation induced by osteoprotegerin ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.96, p.3540–3545, 1999.

IKEDA, F.; NISHIMURA, R.; MATSUBARA, T.; TANAKA, S.; INOUE, J-I.; REDDY, S.V.; HATA, K.; KENJI YAMASHITA, K.; HIRAGA, T.; WATANABE, T.; KUKITA, T.; YOSHIOKA K.; RAO, A.; YONEDA, T. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation. *J Clin Invest*, v.114, n.4, p.475- 484, 2004.

JONTELL, M.; GUNRAJ, M.N.; BERGENHOLTZ, G. Immunocompetent cells in the normal dental pulp. *J Dent Res*, v.66,n.6, p.1149–1153, 1987.

JONTELL, M.; BERGENHOLTZ, G.; SCHEYNIUS, A.; AMBROSE, W. Dendritic cells and macrophages expressing class II antigens in the normal rat incisor pulp. *J Dent Res*, v.67, n.10, p.1263–1266, 1988.

JONTELL, M.; OKIJI, T.; DAHLGREN, U.; BERGENHOLTZ, G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.9, p.179–200, 1998.

KOZUKA, Y.; OZAKI, Y.; UKAI, T.; KANEKO, T.; HARA, Y. B cells play an important role in lipopolysaccharide-induced bone resorption. *Calcif Tissue Int*, v.78, p.125–132, 2006.

LOSSDÖRFER, S.; GÖTZ, W.; JÄGER, A. Immunohistochemical localization of receptor activator of nuclear factor kappaB (RANK) and its ligand (RANKL) in human deciduous teeth. *Calcif Tissue Int*, v.71, p.45-52, 2002.

LOVE, R.M.; JENKINSON, H.F. Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med*, v.13, n.2, p.171–183, 2002.

MACIEL, K.F.; NEVES DE BRITO, L.C.; TAVARES, W.L.F.; MOREIRA, G.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, L.Q.; RIBEIRO SOBRINHO, A.P. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J*, v.45, p.354–362, 2012.

MANDOR, R.B. A tooth with internal resorption treated with a hydrophylic plastic material: a case report. *J Endod*, v.7, n.9, p.430-432, 1981.

MARUSICH, E.; LOUBOUTIN, J.P.; CHEKMASOVA, A.A.; STRAYER, D.S. Lymphocyte adhesion to CCR5 ligands is reduced by anti-CCR5 gene delivery. *J Neur Sci*, v.308, p.25–7, 2011.

MAKINO, Y.; COOK, D.N.; SMITHIES, O.; HWANG, O.Y.; NEILSON, E.G.; TURKA, L.A.; *et al.* Impaired T cell function in RANTES-deficient mice. *Clin Immunol* v.102, p.302-9, 2002.

NAKAGAWA, N.; KINOSAKI, M.; YAMAGUCHI, K.; SHIMA, N.; YASUDA, H.; YANO, K.; MORINAGA, T.; HIGASHIO, K. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Communic*, v.253, n.2, p.395–400, 1998.

NISHIKAWA, S.; SASAKI, F. Apoptosis of dental pulp cells and their elimination by macrophages and MHC class II-expressing dendritic cells. *J Histochem Cytochem*, v.47, n.3, p.303–311, 1999.

OCK, S.; AHN, J.; LEE, S.H.; PARK, H.; JANG WON SON, J.W.; OH, J.G.; YANG, D.K.; LEE, W.S.; KIM, H-S.; RHO, J.; OH, G.T.; ABEL, E.D.; PARK, W.J.; MIN, J-K.; KIM, J. Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand is a novel inducer of myocardial inflammation. *Card Res*, v.94, p.105–14, 2012.

PACIFICI, R. Estrogen deficiency, T cells and bone loss. *Cell Immunol*, v.252, n.1-2, p.68-80, 2008.

ROBERTSON, A.; ANDREASEN, F.M.; ANDREASEN, J.O.; NORÉN, J.G. Long-term prognosis of crown-fractured permanent incisors. The effect of stage of root development and associated luxation injury. *Int J Paediatr Dent*, v.10, n.3, p.191-199; 2000.

ROSENKILDE, M.M.; SCHWARTZ, T.W. The chemokine system—a major regulator of angiogenesis in health and disease. *A P Mis*, v.112, p.481–495, 2004.

SILVA, M.J.B.; VIEIRA, L.Q.; SOBRINHO, A.P. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* v.105, p.70-76, 2008.

SMITH, M.D.; O'DONNELL, J.; HIGHTON, J.; PALMER, D.G.; ROZENBILDS, M.; ROBERTS-THOMSON, P.J. Immunohistochemical analysis of synovial membranes from inflammatory and non-inflammatory arthritides: scarcity of CD5 positive B cells and IL2 receptor bearing T cells. *Pathol*, v.24, p.19–26, 1992.

STAQUET, K.; KWOK, D.; RYCYZYN, M.A.; PETLEY, T.; LACY, E.R.; POWERS, G.; GILES-KOMAR, J. A rapid method for generating and characterizing anti-variable region monoclonal antibodies. *Hum Antibodies*, v.15, n.4, p.155-6, 2006.

SUDA, T.; TAKAHASHI, N.; UDAGAWA, N.; JIMI, E.; GILLESPIE, M.T.; MARTIN, T.J. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev*, v.20, n.3, p.345–357, 1999.

TEITELBAUM, S.L.; ROSS, F.P. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*, v.4, p.638-649, 2003.

TORALDO, G.; ROGGIA, C.; QIAN, W.P.; PACIFICI, R.; WEITZMANN, M.N. IL-7 induces bone loss in vivo by induction of receptor activator of nuclear factor kB ligand and tumor necrosis factor α from T cells. *PNAS*, v.100, n.1, p.125–130, 2003.

TRONSTAD, L. Root resorption--etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol*, v.4, n.6, p.241-52, 1988.

UKAI, T.; YUMOTO, H.; GIBSON III, F.C.; GENCO, C.A. Macrophage-elicited osteoclastogenesis in response to bacterial stimulation requires toll-like receptor 2-dependent tumor necrosis factor- α production. *Infect Immun*, v.76, n.2, p.812-819, 2008.

VEERAYUTTHWILAI, O.; BYERS, M.R.; PHAM, T.T.; DARVEAU, R.P.; DALE, B.A. Differential regulation of immune responses by odontoblasts. *Oral Microbiol Immunol*, v.22, p.5–13, 2007.

VIOLA, A.; LUSTER, A.D. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, v.48, p.171–197, 2008.

WADACHI, R.; HARGREAVES, K.M. Trigeminal nociceptors express TLR-4 and CD14: a mechanism for pain due to infection. *J Dent Res*, v.85, n.1, p.49–53, 2006.

WEBER, C.; WEBER, K.S.; KLIER, C.; GU, S.; WANK, R.; HORUK, R.; *et al.* Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+)T cells. *Blood* v.97, p.1144-46, 2001.

ZHAO, L.; CHEN, J.; CHENG, L.; WANG, X.; DU, J.; WANG, F.; PENG, Z. Effects of *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid on receptor activator of nuclear factor-kB ligand and osteoprotegerin expression in periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J*, 2013, Apr 23. doi: 10.1111/iej.12127. [Epub ahead of print]

7. Anexo 1

7. Anexo 1

Tabela de abreviações

RANKL – ligante do receptor ativador do NF- κ B

NF- κ B - factor nuclear kappa B

CCL5/RANTES – ligante da quimiocina CC5

CCR5 – receptor da quimiocina CC5

LTA - ácido lipoteicóico

LPS – lipopolissacarídeo

G+ - Gram-positivo

G- - Gram-negativo

DC – célula dendrítica

NK – *natural killer*

TLR – receptores *Toll-like*

PRR – receptor padrão de reconhecimento

PAMP – receptor de padrão Toll-like associado a patógeno

IL – interleucina

TNF- α – fator de necrose tumoral alfa

c-Fos – gene de ativação imediata c-Fos

NFAT - fator nuclear de ativação de células T

MIP-1 α - proteína inflamatória de macrófagos-1 α

Th – *T-helper*