



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE CLÍNICA INFANTIL



LANA KEI YAMAMOTO DE ALMEIDA

**ANÁLISE MICROSCÓPICA E MOLECULAR LOCAL E SISTÊMICA DE LINFÓCITOS T
REGULATÓRIOS EM LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS EXPERIMENTALMENTE EM
CAMUNDONGOS *WILD-TYPE* E *KNOCKOUT* PARA O RECEPTOR *TLR2* NA
PRESENÇA OU NÃO DO LIGANTE PAM3CYS**



Ribeirão Preto
2023

LANA KEI YAMAMOTO DE ALMEIDA

**ANÁLISE MICROSCÓPICA E MOLECULAR LOCAL E SISTÊMICA DE
LINFÓCITOS T REGULATÓRIOS EM LESÕES PERIAPICAIS INDUZIDAS
EXPERIMENTALMENTE EM CAMUNDONGOS *WILD-TYPE* E *KNOCKOUT*
PARA O RECEPTOR *TLR2* NA PRESENÇA OU NÃO DO LIGANTE PAM3CYS**

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

ORIENTADORA: PROFA. DRA. RAQUEL ASSED BEZERRA SEGATO

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. RICARDO A. BATTAGLINO

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Almeida, Lana Kei Yamamoto

Análise microscópica e molecular local e sistêmica de linfócitos T regulatórios em lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos *wild-type* e *knockout* para o receptor *TLR2* na presença ou não do ligante Pam3cys/ Lana Kei Yamamoto de Almeida; Orientadora, Raquel Assed Bezerra Segato; Co-orientador, Ricardo A. Battaglino. 2023.

66p.: il.; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa: Pós-Graduação em Odontopediatria. Área de Concentração: Odontopediatria.

Versão Corrigida da Tese. A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

1. Lesão Periapical.
2. Imuno-Histoquímica.
3. Osteoclastos.
4. Osteoclastogênese.
5. Pam3cys.
6. Tregs.



A referida tese foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP)
- Laboratório de Histologia do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP
- Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ameida LKY. Análise microscópica e molecular local e sistêmica de linfócitos T regulatórios em lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos *wild-type* e *knockout* para o receptor *TLR2* na presença ou não do ligante Pam3cys.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Prof.Dr. _____

Julgamento _____ Assinatura _____

Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato – Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

LANA KEI YAMAMOTO DE ALMEIDA

Nascimento 30 de setembro de 1989 – Montes Claros/MG

Filiação José Carlos de Almeida
Maria Antonieta Yamamoto de Almeida

2007-2011 Graduação em Odontologia
Faculdades Unidas do Norte de Minas

2012-2014 Especialização em Odontopediatria
Faculdade São Leopoldo Mandic

2016-2018 Mestrado em Ciências Odontológicas
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Araraquara – FOAr/UNESP

2018-Atual Doutorado em Ciências
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

2021-2022 Estágio no Exterior
University of Minnesota, Minneapolis, MN, EUA
Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) financiado pela CAPES

A **Deus**, por sempre iluminar meu caminho, me dando muita força e amor. Muito obrigada por tantas bênçãos e dádivas recebidas.

Aos meus pais, **José Carlos** e **Antonieta**, por serem minha fonte de inspiração, amor e exemplo de responsabilidade. Muito obrigada pelo carinho, dedicação, esforço, apoio e por me oferecerem a melhor educação.

A **Luciana**, minha querida irmã, pela amizade, cumplicidade e bondade. Muito obrigada por sempre me ajudar e incentivar nessa caminhada.

Ao meu sobrinho **Antonio**, pelo carinho e alegria.

Ao **Leo**, meu namorado, pela lealdade, carinho e cuidado. Muito obrigada por me incentivar e pela parceria em todos os momentos.

Aos meus avós, **Kimio, Sono, José e Ana** *"in memoriam"*, pelo exemplo de força, perseverança e por me colocarem sempre em suas orações.

Aos meu **tios e primos**, por toda atenção, carinho e afeto.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À minha orientadora, **Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, pelo incentivo, disposição, paciência e atenção durante esses anos. Sou muito grata pelo privilégio de ser sua orientanda e por todo aprendizado. Muito obrigada pela confiança em mim depositada e pelo acolhimento desde o primeiro dia que cheguei a FORP.

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Ricardo Battaglino**, pela disposição, atenção e por ter me acolhido tão bem em seu laboratório durante meu estágio de doutorado sanduíche. Muito obrigada pelo apoio.

À **Profª Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, por todo ensinamento, pelo apoio e suporte durante a realização do trabalho. Muito obrigada por compartilhar seu conhecimento.

Ao **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho**, pelas suas orientações e ensinamentos durante o doutorado. Muito obrigada por toda atenção.

Ao **Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, pela disponibilidade, incentivo e oportunidade em participar dos projetos paralelos. Muito obrigada por todo ensinamento nesse período.

Ao **Prof. Dr. Jorge Esquiche León**, pela disponibilidade e ensinamentos durante a pós-graduação. Muito obrigada pelo apoio e atenção.

À **Dra. Marília Pacífico Lucisano Politi**, pela sua atenção, carinho e cuidado. Muito obrigada por estar sempre disponível em ajudar e ensinar durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo, nas pessoas do atual Reitor Prof. Dr. **Carlos Gilberto Carlotti Junior** e da Vice-Reitora Profa. Dra. **Maria Arminda do Nascimento Arruda**.

À Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa do atual diretor **Prof. Dr. Paulo Nelson Filho** e do Vice-Diretor **Prof. Dr. Ricardo Gariba Silva**.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e da Vice-Coordenadora, **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela Bolsa de Doutorado (Código de Financiamento 001) e pela Bolsa de Doutorado Sanduíche no exterior (nº 88887.575977/2020-00).

Aos professores do Departamento de Clínica Infantil da FORP-USP, **Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andiara De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Pro. Dr. Murilo Fernando Neuppmann Feres, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, pelos grandes ensinamentos na clínica e na vida acadêmica. Muito obrigada!

À **Dra. Carolina Paes Torres Mantovani**, pelo carinho, atenção e pelas orientações e ensinamentos na clínica. Muito obrigada por estar sempre disponível em ajudar.

Ao **Marco Antônio dos Santos**, especialista de laboratório do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, pelo carinho, amizade, cuidado, descontração e pela imensa ajuda no desenvolvimento do trabalho. Muito obrigada por tudo.

À **Nilza Letícia Magalhães**, técnica de laboratório do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, por toda sua leveza, alegria, boa vontade e disponibilidade em ensinar e ajudar durante os experimentos. Muito obrigada pela sua amizade.

À **Mary Possani Carmessano**, secretária do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, pelo comprometimento, paciência e prontidão em me ajudar durante todo o curso. Muito obrigada por sua atenção e carinho comigo.

À **Arleti Aparecida Caramori**, auxiliar de laboratório do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, pela ajuda nos experimentos, amizade e carinho. Muito obrigada.

À **Filomena Leli Placciti** e ao **Matheus Morelli Zanela**, servidores do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, pelo apoio, atenção e carinho durante todo o curso. Muito obrigada!

Aos **pacientes** atendidos nas clínicas do Departamento de Clínica Infantil da da FORP/USP, pela colaboração.

À **Fátima Aparecida Jacinto Daniel** e **Fátima Aparecida Rizoli**, servidoras do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, pelo auxílio e colaboração.

À **Lisa Danielly Curcino Araujo**, por toda ajuda, carinho, preocupação e pelas experiências partilhadas. Muito obrigada pela sua amizade.

Aos amigos e colegas, **Lisa, Luciano, Carol, Ricardo, Vivian e Clara**, por me ajudarem no desenvolvimento do trabalho, pela amizade e alegria proporcionada. Vocês são muito especiais para mim.

Às minhas amigas **Heloísa, Laura, Lisa, Mariana e Thaís**, que me acompanharam e torceram por mim desde o início do doutorado. Muito obrigada pela amizade, cumplicidade e alegrias. Vocês são demais!

Aos meus **colegas do Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pela convivência e pelos momentos e conhecimentos compartilhados.

Às minhas amigas, **Bárbara, Kaylan, Luiza, Natalia, Renata e Thamyris**, que me acompanham desde o mestrado. Muito obrigada por fazerem meus dias muito mais felizes e que mesmo com a distância estão sempre vibrando e torcendo por cada conquista.

Às amigas de Minas, **Érica, Isabella Marques, Isabella Ramalho, Karina e Thalita Estrela**, pela amizade, carinho e preocupação mesmo com toda a distância.

Aos meus **familiares**, pela dedicação, afeto e torcida. Vocês são muitos especiais para mim.

À **todas as pessoas** que torcem e me incentivam a cada dia. Obrigada de coração.

Almeida, LKY. **Análise microscópica e molecular local e sistêmica de linfócitos T regulatórios em lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos *wild-type* e *knockout* para o receptor *TLR2* na presença ou não do ligante Pam3cys.** Ribeirão Preto, 2023. 66p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2023.

RESUMO

O processo infeccioso e inflamatório que ocorre durante a progressão da lesão periapical estimula a ativação de diferentes células, mediadores e receptores do sistema imune do hospedeiro. No contexto de doenças sistêmicas, é reconhecido que o lipopeptídeo sintético denominado Pam3cys atua como ligante de *TLR2/TLR1* e, além de estimular a expressão de diferentes citocinas inflamatórias, pode modificar o papel dos linfócitos T regulatórios (Tregs). Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a participação dos Tregs na presença ou não do ligante Pam3Cys durante a progressão da lesão periapical induzida em camundongos. Foram utilizados 130 camundongos machos C57BL/6 *wild type* (*WT*) e *knockout* para *TLR2* (*TLR2KO*), alocados em grupos controle (n=5) e experimental (indução da lesão periapical) (n=10/período experimental). Em grupos específicos (*WT*+Pam3cys e *TLR2KO*+Pam3cys), o ligante sintético Pam3cys foi administrado intraperitonealmente, a cada 7 dias, de acordo com o período experimental (14, 21 e 42 dias). Para os demais grupos, foi administrada água livre de endotoxina. Ao final dos períodos experimentais, os animais foram eutanasiados sendo a mandíbula e o baço submetidos ao processamento histotécnico. Os cortes histológicos foram analisados pela coloração com hematoxilina e eosina (análise da reação inflamatória e mensuração da lesão periapical), pela histoenzimologia para atividade da fosfatase ácida resistente ao tartarato – TRAP (avaliação do número de osteoclastos). Além disso, foi realizada a técnica de imunohistoquímica para a identificação da expressão de Tregs (marcador FOXP3 na mandíbula e no baço) e a avaliação da osteoclastogênese, utilizando os marcadores RANK, RANKL e OPG (mandíbula). Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism 8.0.1, por meio do teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, Teste T e Teste Mann-Whitney ($\alpha=5\%$). Foi observado que o infiltrado inflamatório e a reabsorção óssea foram mais intensos no grupo *TLR2KO*, em comparação com o *WT*. Além disso, os animais que receberam o ligante Pam3cys, tanto animais *WT* quanto *TLR2KO*, apresentaram um infiltrado inflamatório leve ou moderado e lesões periapicais menores ($p<0,05$). Os animais *TLR2KO* apresentaram um aumento significativo no número de osteoclastos quando comparado aos animais *TLR2KO*+Pam3cys ($p<0,05$), em todos os períodos de desenvolvimento da lesão periapical. Os animais *WT*+Pam3cys apresentaram menor número de osteoclastos quando comparados aos animais *WT* que não receberam o ligante, aos 21 dias ($p=0,02$). A expressão de Tregs foi mais intensa nos grupos que receberam o ligante Pam3cys, com diferença observada principalmente no grupo *WT*+Pam3cys ($p=0,03$) quando comparado ao grupo *WT*, no período de 42 dias. Já nos animais *TLR2KO*, a administração do ligante não aumentou a proliferação de Tregs. Na análise do baço, os animais *WT* que receberam o ligante também tiveram maior expressão de Tregs, no

período de 14 e 42 dias ($p=0.02$). Já nos animais *TLR2KO*, o aumento da expressão de Tregs só aconteceu aos 21 dias ($p=0.02$) nos animais que receberam o Pam3cys. Com relação ao RANKL, notou-se uma redução da marcação nos grupos *TLR2KO+Pam3cys*, aos 21 e 42 dias ($p=0.03$) e maior razão de ligação entre RANK/RANKL nos animais que não receberam o lipopeptídeo. Com relação ao OPG, os animais que receberam a administração do Pam3cys tiveram maior expressão dessa proteína, com diferença estatística no período de 21 dias ($p=0.01$) para o grupo *WT+Pam3cys* e para os animais *TLR2KO +Pam3cys*, essa diferença ocorreu aos 42 dias ($p=0.02$). A partir das metodologias realizadas e dos resultados, pode-se concluir que nos animais *WT*, a administração do ligante Pam3cys aumentou a proliferação dos Tregs e preveniu a progressão da lesão periapical em camundongos. Por outro lado, na ausência do receptor *TLR2* nos animais *KO*, a expressão de Tregs foi menor com maiores áreas de lesões periapicais. Por fim, a administração sistêmica do ligante Pam3cys nos animais *KO* foi capaz de limitar os efeitos deletérios da ausência do receptor *TLR2* com menores áreas de lesão periapical, menor expressão de Tregs e RANKL, menor número de osteoclastos e maior expressão de OPG.

Palavras-chave: Lesão periapical. Imuno-Histoquímica. Osteoclastos. Osteoclastogênese. Pam3cys. Tregs.

Almeida, LKY. **Microscopic and molecular local and systemic analysis of regulatory T lymphocytes in experimentally induced periapical lesions in wild-type and knockout mice for the TLR2 receptor in the presence or absence of the Pam3cys ligand.** Ribeirão Preto, 2023. 66p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2023.

ABSTRACT

The infectious and inflammatory process that occurs during the progression of the periapical lesion stimulates the activation of different cells, mediators, and receptors of the host's immune system. In the context of systemic diseases, it is recognized that the synthetic lipopeptide Pam3cys acts as a TLR2/TLR1 ligand and, in addition to stimulating the expression of different inflammatory cytokines, it can modify the role of regulatory T lymphocytes (Tregs). Thus, the present study aimed to evaluate the participation of Tregs in the presence or absence of the Pam3Cys ligand during the progression of the periapical lesion induced in mice. The sample consisted of 130 male C57BL/6 wild type (WT) and TLR2 knockout (TLR2KO) mice, allocated in control (n=5) and experimental (periapical lesion induction) (n=10/experimental period) groups. In specific groups (WT+Pam3cys and TLR2KO+Pam3cys), the Pam3cys synthetic ligand was administered intraperitoneally, every 7 days, according to the experimental period (14, 21, and 42 days). For the other groups, endotoxin-free water was administered. At the end of the experimental periods, the animals were euthanized and the mandible and spleen were submitted to histotechnical processing. The histological sections were analyzed by staining with haematoxylin and eosin (analysis of the inflammatory reaction and measurement of the periapical lesion), tartrate-resistant acid phosphatase histochemistry – TRAP (evaluation of the number of osteoclasts). In addition, the immunohistochemistry technique was performed to identify the expression of Tregs (FOXP3 staining in the mandible and spleen) and the evaluation of osteoclastogenesis, using the RANK, RANKL, and OPG markers (mandible). Data were analyzed using the GraphPad Prism 8.0.1 program, using the ANOVA test followed by the Tukey post-test, T-test, and Mann-Whitney test ($\alpha = 5\%$). It was observed that the inflammatory infiltrate and bone resorption was more intense in the TLR2KO group compared to the WT group. In addition, the animals that received the Pam3cys ligand, both WT and TLR2KO animals, showed a mild or moderate inflammatory infiltrate and smaller periapical lesions ($p < 0.05$). TLR2KO animals showed a significant increase in the number of osteoclasts when compared to TLR2KO+Pam3cys animals ($p < 0.05$), in all periods of periapical lesion development. WT+Pam3cys animals had a lower number of osteoclasts when compared to the WT animals that did not receive the ligand, with this difference being statistically significant at 21 days ($p = 0.02$). Tregs expression was more intense in the groups that received the Pam3cys ligand, with a difference observed mainly in the WT+Pam3cys group ($p = 0.03$) when compared to the WT group, in the 42 days. In KO animals, however, administration of the ligand did not increase Tregs proliferation. In the spleen analysis, the WT animals that received the ligand also had a higher expression of Tregs, in the period of 14 and 42 days ($p = 0.02$). In the TLR2KO animals, however, the increase in Tregs expression only occurred at 21

days ($p=0.02$) in the animals that received Pam3cys. Concerning RANKL, there was a reduction in staining in the TLR2KO+Pam3cys groups, at 21 and 42 days ($p=0.03$) and a higher binding ratio between RANK/RANKL in animals that did not receive the ligand. Regarding OPG, the animals that received Pam3cys had a higher expression of this protein, with a statistical difference in the period of 21 days ($p=0.01$). Also, for the WT+Pam3cys group and the TLR2KO+Pam3cys animals, OPG difference occurred at the 42 days ($p=0.02$). Based on the methodologies performed and the obtained results, it can be concluded that in WT animals, the administration of the Pam3cys ligand increased the proliferation of Tregs and prevented the progression of the periapical lesion in mice. On the other hand, in the absence of the TLR2 receptor in KO animals, Tregs expression was lower with larger areas of periapical lesions. Finally, systemic administration of the Pam3cys ligand in KO animals was able to limit the deleterious effects of the absence of the TLR2 receptor with smaller areas of periapical lesion, lower expression of Tregs and RANKL, lower number of osteoclasts and higher expression of OPG.

Keywords: Periapical lesion. Immunohistochemistry. Osteoclasts. Osteoclastogenesis. Pam3cys. Tregs.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
3.1 Animais e Grupos Experimentais.....	26
3.2 Indução da Lesão Periapical Experimental.....	27
3.3 Tratamento com o lipopeptídeo sintético Pam3Cys (Pam3CSK4)	28
3.4 Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica	29
3.5 Análise Descritiva das Características do Canal Radicular e Regiões Apical e Periapical	30
3.6 Análise Morfométrica das Lesões Periapicais	30
3.7 Histoenzimologia para Atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP).....	31
3.8 Imuno-Histoquímica	31
3.9 Análise Estatística	33
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Análise Descritiva das Características do Canal Radicular e Regiões Apical e Periapical	35
4.2 Análise Morfométrica da Área das Lesões Periapicais	36
4.3 Análise de Histoenzimologia para atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP).....	38
4.4 Análise Imuno-Histoquímica	40
5. DISCUSSÃO	47
6. CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	53
ANEXO.....	65

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A lesão periapical é caracterizada por uma complexa resposta inflamatória à infecção por micro-organismos no sistema de canais radiculares, provenientes das lesões de cárie, traumatismos ou desgastes dentários, resultando na reabsorção do suporte ósseo e dos tecidos periapicais (Sjögren et al., 1997; Stashenko et al., 1998; Caplan et al., 2006; Alvarez et al., 2019; Karamifar et al., 2020; Gund et al., 2022).

Essa invasão bacteriana suscita, primeiramente, reações inflamatórias inespecíficas e, posteriormente, reações específicas, que envolvem variados tipos celulares, citocinas, anticorpos e mediadores inflamatórios, que participam na tentativa de proteger os tecidos periapicais (Takeda e Akira, 2005; Desai et al., 2011; Alvarez et al., 2019).

Os principais micro-organismos presentes na lesão periapical são as bactérias gram-negativas, que apresentam em sua parede celular os lipopolissacarídeos (LPS) ou endotoxinas (Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2018; Paula-Silva et al., 2020) que são liberadas durante a desintegração desses micro-organismos e apresentam um importante fator de virulência, associado à potente capacidade de estimular a atividade das células imunes (Galanos et al., 1993; Graunaite et al., 2012 Shen et al., 2020).

A ativação do sistema imune do hospedeiro faz com que os micro-organismos patogênicos, que possuem padrões moleculares associados aos patógenos (*PAMPs*), como os LPS, sejam reconhecidos por meio de uma variedade de receptores de reconhecimento do patógeno, tais como os receptores *Toll-like (TLRs)* (Aderem e Ulevitch, 2000; Takeda e Akira, 2015; Müller et al., 2017; Galler et al., 2021). Esses *TLRs*, atuam principalmente no processo de fagocitose de patógenos, ativação das cascatas de coagulação, indução de apoptose e sinalização de citocinas inflamatórias, que são responsáveis pela organização de uma cadeia inata mais eficiente (Van Maren et al., 2008; Desai et al., 2011; Chen et al., 2018; Galler et al., 2021). A ausência de um sistema de receptores eficaz, favorece ao hospedeiro a propagação da infecção microbiana e subsequente danos irreparáveis aos tecidos (Aderem e Ulevitch, 2000; Heil et al., 2004; Chen et al., 2018).

Os mais variados tipos de *TLRs* já foram identificados tanto em humanos, quanto em animais, e foi verificado que a maioria dos tecidos expressa pelo menos um tipo de *TLR*. Entretanto, dentre a variedade de receptores existentes, apenas alguns foram identificados com uma melhor habilidade em mediar respostas celulares aos produtos bacterianos (Kassem et al., 2015; Chen et al., 2018; Fernández et al., 2019; Mazgaen et al., 2020). O *TLR2* se destaca por ser capaz de identificar alguns padrões moleculares associados aos micro-organismos, como os ácidos lipoteicóicos, as lipoproteínas bacterianas e o zimosan das leveduras. Além desses componentes, o *TLR2* tem a capacidade de reconhecer também, uma lipoproteína sintética, denominada Pam3cys (Takeuchi et al., 2002; Matsushima et al., 2007; Chen et al., 2018; Khokhani et al., 2021).

O Pam3cys (Pam3CSK4) é um lipopetídeo sintético que atua como ligante de *TLR2/TLR1* e estimula macrófagos a liberar citocinas, como o fator de necrose tumoral (*TNF- α*), interleucina-1 β e interleucina 6 (Steinhagen et al., 2011; Bhaskaran et al., 2015; Nakao et al., 2020; Khokhani et al., 2021), além disso, funciona como um estimulador do fator de transcrição pró-inflamatório NF κ - β (Ozinsky et al., 2000). Estudos demonstraram uma importante atuação desse ligante sintético na imunomodulação óssea (Khokhani et al., 2021) e na modificação das respostas imunes em células T regulatórias do sistema adaptativo (Sutmuller et al., 2006; Chen et al., 2009; Nyirenda 2015; Nakao et al., 2020). Os TLRs são geralmente expressos pelas células imunes inatas, entretanto, componentes celulares da imunidade adaptativa, como os linfócitos T, também sinalizam receptores *toll-like* (Bhaskaran et al., 2015).

As vias de receptores *toll-like* funcionam com um elo entre a imunidade inata e a adaptativa, visto que, além das variadas funções conhecidas anteriormente, esses receptores são responsáveis também por induzir a maturação das células dendríticas, que são fundamentais para gerar respostas imunes adaptativas (Ausubel, 2005; Chen et al., 2018; Fernández et al., 2019).

Com a progressão e cronificação da lesão periapical, verifica-se a infiltração dos elementos celulares da imunidade adaptativa, incluindo variados subconjuntos de linfócitos B e T (AlShwaimi et al., 2009; Saravia et al., 2019).

Especificamente, os linfócitos T são um grupo de células do sistema imune essenciais para a regulação imunológica, eliminação de patógenos e indução de

inflamação tecidual, por meio da produção e secreção de citocinas inflamatórias (Saravia et al., 2019; Wang et al., 2022). A ativação dessas células faz com que se diferenciem em células T *helper* (Th0) e seus diferentes subgrupos (Sharpe, 2009; Moser et al., 2010; Cota et al., 2015). Algumas dessas citocinas inflamatórias desempenham papéis importantes na regulação imunológica e no desenvolvimento da infecção. Como exemplo, as células Th1 e Th17 estão associadas à capacidade de estimular a reabsorção óssea e promover a inflamação. Em contrapartida, as citocinas Th2 apresentam a capacidade de limitar ou reduzir os danos teciduais (Saravia et al., 2019; Wang et al., 2022). Além disso, outros subconjuntos também poderão se diferenciar, como as células T regulatórias, que possuem efeitos supressores na osteólise inflamatória e estimulam a homeostase imune (Vignali, et al., 2008; Almeida et al., 2016; Wang et al., 2022).

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) são caracterizados por uma subpopulação de linfócitos T que expressam principalmente células CD4⁺, CD25⁺ e fator de transcrição Foxp3 (Hori et al., 2003; Sakaguchi et al., 2010; Takeuchi e Nishikawa, 2016; Shao et al., 2021). O marcador celular mais específico dessas células é o Foxp3, o qual é essencial para a maturação e funcionalidade dos Tregs (Fontenot et al., 2005; Yi et al., 2006; Zhuo et al., 2015; Li et al., 2018). Esses linfócitos originam-se do timo ou de regiões periféricas (Shitara et al., 2018) e são recrutados para a manutenção da auto-tolerância, na limitação de um processo inflamatório exacerbado e na prevenção de doenças autoimunes (Vignali, et al., 2008).

Nesse sentido, diversos estudos têm avaliado o efeito da imunoterapia com a utilização dos Tregs no tratamento de diferentes doenças como câncer (Amiset et al., 2012; Shitara e Nishikawa, 2018; Najafi e Mirshafiey, 2019; Gao et al., 2022; Tie et al., 2022), doenças autoimunes (Byng-Maddick e Ehrenstein, 2015; Komatsu e Takayanagi, 2015; Eggenhuizen et al., 2020), diabetes (Bayry e Gautier, 2016; Bettini et al., 2021), doenças ósseas (Talaat et al., 2015; Yu et al., 2018), doenças renais (Chandran et al., 2017; Hu et al., 2021), hipertensão (Chiasson et al., 2017; Xiao et al., 2021), inflamação intestinal (Yang et al., 2016; Touch et al., 2022), doenças cardiovasculares (Bonney et al., 2015; Tabares-Guevara et al., 2021) e rinites alérgicas (Liu et al., 2019; Zeng et al., 2019; Lin et al., 2021). Assim, os Tregs se tornaram um

foco de intensa investigação, como principal alvo para novas aplicações clínicas (Miyara, et al., 2009; Singer et al., 2014; Xiao et al., 2021; Huppert et al., 2022).

Na Odontologia, a participação dos Tregs nos processos imunes inflamatórios da cavidade bucal foi avaliada por diferentes estudos que observaram o papel fundamental dessas células na inibição desses processos, tanto na doença periodontal (Glowacki et al., 2013; Alvarez et al., 2018; Han et al., 2018; Liu et al., 2018; Parachuru et al., 2018; Cavalla et al., 2021; Zou et al., 2022), como na lesão periapical (Colić et al., 2009; Peixoto et al., 2012; Wei et al., 2013; Araujo-Pires et al., 2014; Yang et al., 2014; Francisconi et al., 2016; Silva et al., 2017; Francisconi et al., 2018; Cavalla et al., 2021). Vale ressaltar que, revisões sistemáticas da literatura destacaram o potencial supressor dos Tregs durante a resposta imune-inflamatória e sua atuação no restabelecimento da homeostase óssea alveolar (Cafferata et al., 2018). Entretanto, alguns estudos evidenciaram que a presença do ligante sintético de TLR2, como o Pam3cys, reduziu a função dos Tregs (Nyirenda 2015) e provocou a interrupção transitória da atividade supressora desses linfócitos (Sutmuller et al., 2006). Por outro lado, outros trabalhos demonstraram que esses ligantes sintéticos induziram a proliferação de Tregs, sem interromper suas funções regulatórias (Chen et al., 2009; Nakao et al., 2020). Portanto, ainda é desconhecido o papel desses ligantes sintéticos de TLR2 e seu efeito em células Tregs durante o desenvolvimento da lesão periapical.

Paralelamente, embora múltiplas vias possam explicar a progressão da lesão periapical, sabe-se que a ativação dos osteoclastos, em conjunto com outras células, como as Th2 e Tregs, estão implicadas na determinação da estabilidade ou desenvolvimento dessa lesão. Para que o processo de constante remodelação óssea ocorra, destaca-se o mecanismo de ação do sistema RANK/RANKL/OPG, que atua principalmente na regulação do metabolismo ósseo e na diferenciação dos osteoclastos. (Kawashima et al., 2007; Menezes et al., 2008; Wright et al., 2009; Garlet et al., 2010; da Silva et al., 2012; Alvarez et al., 2019; Paula-Silva et al., 2020; Cavalla et al., 2021) De um modo geral, para que o processo ocorra, a proteína RANK, que é um receptor transmembrana, reconhece o ligante RANKL, e por meio dessa ligação, a estimulação e a diferenciação de osteoclastos é ativada, induzindo assim, a reabsorção óssea. Em contrapartida, a OPG (osteoprotegerina), age como um receptor competitivo, que se liga ao RANKL e inibe a sua ligação ao RANK, impedindo assim, a

formação de osteoclastos e regulando o processo de reabsorção óssea (Yasuda et al., 1998; Udagawa et al., 2021).

A expressão de RANKL na lesão periapical e a sua relação com a progressão dessas lesões, já foi demonstrada por diversos estudos do nosso grupo de pesquisa (da Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; de Oliveira et al., 2017; Barreiros et al., 2018; Paula-Silva et al., 2020). Além disso, o RANKL pode desempenhar um papel relevante na imunorregulação, uma vez que a inibição desse ligante, está associada à limitação da perda óssea periapical e a uma estimulação contínua da resposta inflamatória no hospedeiro, por meio da interferência na atividade dos Tregs (Francisconi et al., 2018). Assim, a relação entre RANKL/OPG atua com um importante fator na progressão ou estabilidade da lesão periapical, visto que, uma alta razão de RANKL resultou em uma maior atividade osteolítica da lesão (Cavalla et al., 2021). Entretanto, ainda não está claro se a ação dos ligantes sintéticos de TLR2 podem acarretar também modificações no equilíbrio do sistema RANK/RANKL/OPG e consequente alterações na diferenciação dos osteoclastos.

Tendo em vista que a participação de diferentes tipos celulares, receptores e ligantes têm ação direta no desenvolvimento da lesão periapical, torna-se importante avaliar e reconhecer a atuação destes, uma vez que, a estabilidade ou progressão da lesão periapical pode depender do equilíbrio entre esses mecanismos do sistema imune.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o papel de linfócitos T regulatórios (Tregs) na presença ou não do ligante sintético Pam3Cys em lesões periapicais induzidas experimentalmente em dentes de camundongos *wild type* (WT) e *knockout* para o receptor *toll-like 2* (*TLR2KO*).

2.2 Objetivos Específicos

1. Analisar microscopicamente o desenvolvimento das lesões periapicais induzidas em camundongos *TLR2KO* e *WT* na presença ou não do ligante Pam3Cys por meio da análise descritiva do canal radicular e das regiões apical e periapical;
2. Avaliar microscopicamente o desenvolvimento das lesões periapicais induzidas em camundongos *TLR2KO* e *WT* na presença ou não do ligante Pam3Cys por meio da histomorfometria da área (em μm^2) das lesões periapicais em cortes corados com hematoxilina e eosina;
3. Identificar a expressão de linfócitos T regulatórios por meio da avaliação da presença/ausência do marcador FOXP3 na mandíbula e no baço durante o desenvolvimento das lesões periapicais em camundongos *TLR2KO* e *WT* na presença ou não do ligante Pam3Cys, por meio da análise imuno-histoquímica;
4. Avaliar o processo de reabsorção óssea periapical utilizando os marcadores de osteoclastogênese RANK, RANKL e OPG durante o desenvolvimento das lesões periapicais em camundongos *TLR2KO* e *WT* na presença ou não do ligante Pam3Cys, por meio da análise imuno-histoquímica;
5. Determinar o número de osteoclastos em camundongos *TLR2KO* e *WT* na presença ou não do ligante Pam3Cys durante o desenvolvimento das lesões periapicais, por meio da histoenzimologia para Atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais e Grupos Experimentais

Inicialmente, este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso em Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (2018.1.778.58.2) (ANEXO A).

Todos os procedimentos realizados nos animais foram conduzidos de acordo com o guia ARRIVE para estudos em animais (Kilkenny et al., 2010; Percie du Sert et al., 2020) e guia PRIASE 2021 para estudos em Endodontia (Nagendrababu et al., 2021). Os cuidados com o bem-estar dos animais seguiram as normas e princípios éticos adotados pela CEUA/FORP-USP e as Resoluções Normativas do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal (CONCEA), regulamentadas pela Constituição Federal Brasileira na Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

Foram utilizados 130 camundongos machos C57BL/6 do tipo selvagem (*wild type* - *WT*) e *TLR2 knockout* (*TLR2KO*), com 6 a 8 semanas de idade, mantidos no biotério da FORP/USP, com ração padrão e livre acesso à água. Os animais foram alocados em grupos controle (molares hígidos) (n=5/cada grupo) e experimental (indução da lesão periapical), subdivididos em 3 períodos experimentais (14, 21 e 42 dias) (n=10/cada grupo). Em grupos específicos, utilizou-se a injeção intraperitoneal do ligante sintético Pam3cys (Pam3CSK4) ou água livre de endotoxina (Quadro 1). O tamanho da amostra foi baseado em estudos anteriores do grupo de pesquisa (da Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Oliveira et al., 2015; De Rossi et al., 2016 Barreiros et al., 2018).

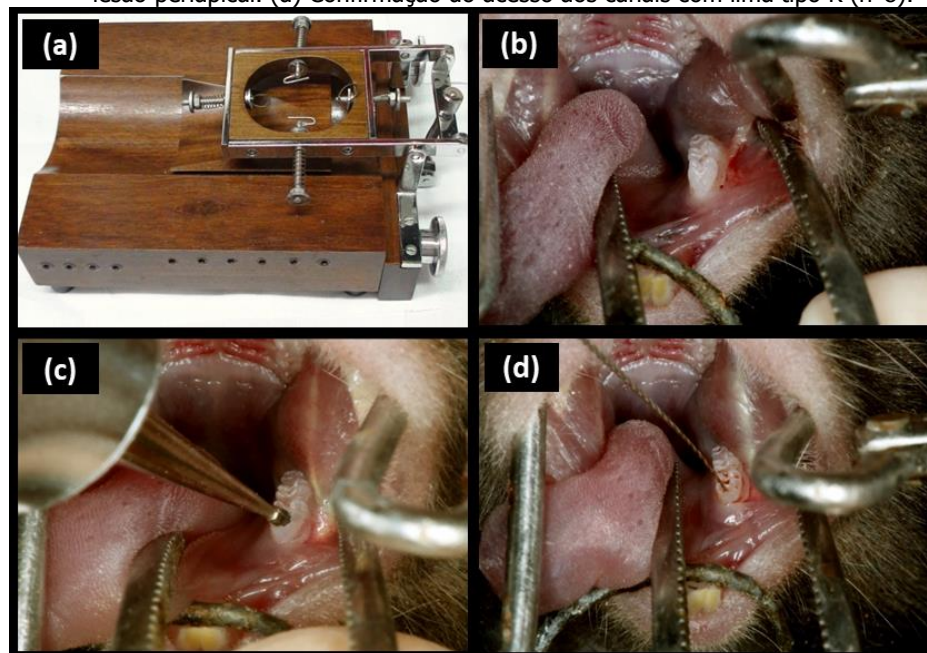
Quadro 1. Distribuição dos animais, de acordo com seus respectivos grupos experimentais.

Grupos	Animais	Solução Administrada	Número de Animais
Grupo 1 (Controle)	<i>WT</i>	-	5
Grupo 2 (Controle)	<i>TLR2KO</i>	-	5
Grupo 3	<i>WT</i>	Água livre de endotoxina	30
Grupo 4	<i>WT</i>	Pam3Cys+ água livre de endotoxina	30
Grupo 5	<i>TLR2KO</i>	Água livre de endotoxina	30
Grupo 6	<i>TLR2KO</i>	Pam3Cys+ água livre de endotoxina	30

3.2 Indução da Lesão Periapical Experimental

A indução da lesão periapical foi realizada nos Grupos 3, 4, 5 e 6, conforme descrito anteriormente (Kawashima et al., 1999; Sasaki et al., 2004; De Rossi et al., 2007; da Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Oliveira et al., 2015; Barreiros et al., 2018). Todos os camundongos dos grupos experimentais foram anestesiados por injeções intramusculares de cloridrato de ketamina a 10% (150 mg/kg de peso corporal; Syntec, Barueri, São Paulo, Brasil) e xilazina 2% (7,5 mg/kg de peso corporal; Syntec, Barueri, São Paulo, Brasil). Em seguida, os animais foram posicionados em mesa cirúrgica com dispositivo de retração mandibular para possibilitar a imobilização e abertura bucal, permitindo o acesso aos primeiros molares inferiores (esquerdo e direito). O acesso oclusal das coroas dentárias foi realizado com auxílio de uma broca esférica em baixa rotação (nº ¼ - KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP, Brasil) acoplada a um motor de baixa rotação e contra-ângulo (Kavo Dental., Moema, SP, Brasil). Posteriormente, o acesso aos canais radiculares foi verificado com auxílio de uma lima endodôntica tipo K #8 (Maillefer S/A, Suíça) e a entrada dos canais radiculares ficaram expostas ao meio bucal durante todo o período experimental, permitindo a formação da lesão periapical (Figura 1).

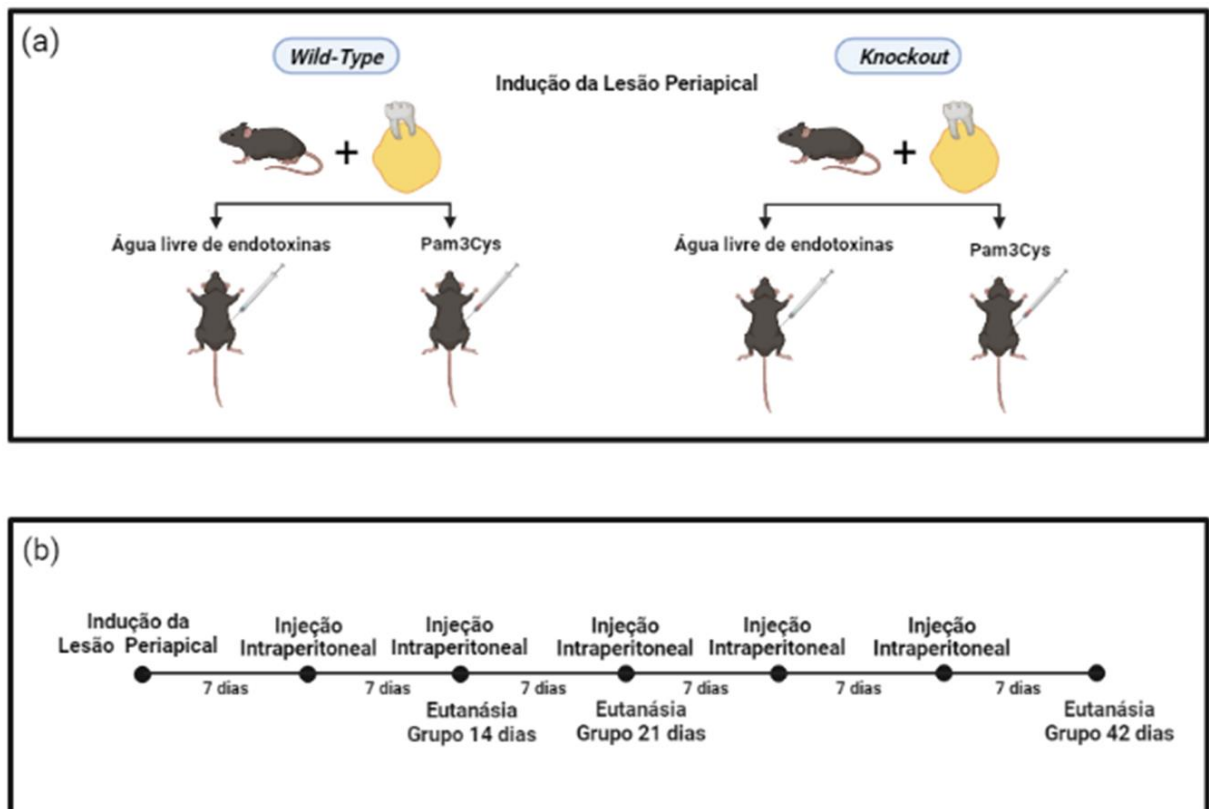
Figura 1. (a) Mesa cirúrgica utilizada para a realização de procedimentos odontológicos em dentes de camundongos. (b) Visualização do molar inferior. (c) Indução da lesão periapical. (d) Confirmação do acesso aos canais com lima tipo K (nº8).



3.3 Administração do lipopeptídeo sintético Pam3Cys (Pam3CSK4)

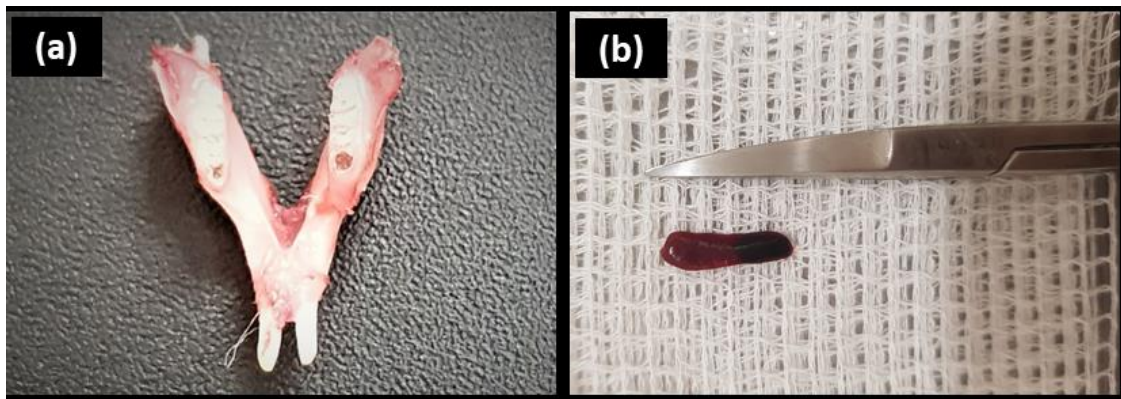
Sete dias após a indução da lesão periapical, uma lipoproteína sintética, agonista -TLR2/TLR1 (Pam3CSK4 InvivoGen, San Diego, EUA), foi administrada em grupos experimentais específicos (grupos 4 e 6). O ligante Pam3CSK4 (1mg/lioofilizado) foi dissolvido em água livre de endotoxinas (1ml), e injetado intraperitonealmente (100µl/animal) a cada 7 dias, de acordo com o período experimental (14, 21 e 42 dias). Para os demais grupos experimentais (Grupos 3 e 5), foi administrada água livre de endotoxinas, injetada intraperitonealmente (100µl/animal) a cada 7 dias. Sendo assim, os animais do grupo de 14 dias receberam uma única dose de solução (Pam3cys ou água livre de endotoxinas), os animais do grupo de 21 dias receberam duas doses de solução e os animais do grupo de 42 dias receberam cinco doses de solução (Shakya et al., 2011; Amiset et al., 2012; Shakya et al., 2012) (Figura 2).

Figura 2. (a) Representação esquemática da injeção das soluções. (b) Linha do tempo representando o período de injeção das soluções e eutanásia dos animais.



Após os períodos experimentais de 14, 21 e 42 dias (n=10/período), os animais foram anestesiados (Ketamina 150mg/Kg de peso corporal / Xilazina 7,5mg/Kg de peso corporal) eutanasiados em câmara de gás carbônico (CO₂), sendo as mandíbulas e baços dissecados com tesoura cirúrgica esterilizada, para posterior processamento e avaliação das amostras (Figura 3).

Figura 3. (a) Mandíbula dissecada. (b) Baço dissecado.



3.4 Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica

As mandíbulas removidas foram fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por, aproximadamente, 4 horas em água corrente. Para a desmineralização das peças foi utilizada uma solução à base de EDTA a 4,13% (pH 7-7,4). As peças foram mantidas nesta solução, à temperatura ambiente, trocada semanalmente, até sua completa desmineralização, que ocorreu aproximadamente, após 30 dias. O grau de desmineralização das estruturas mineralizadas foi testado por meio da penetração de uma agulha nos tecidos, para verificação da sua consistência. Após a desmineralização, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70% e 95% por 30 minutos cada; 2 trocas de 100% por 20 minutos cada e 2 trocas de álcool 100% por 40 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 banhos de 20 minutos e 1 de 40 minutos) e incluídas em parafina. Os blocos contendo os dentes foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) no sentido méso-distal. Cortes semi-seriados de 5µm, com

intervalos de 15µm, foram obtidos em toda a extensão da lesão periapical, exceto na região do forame apical, onde todos os cortes foram coletados sem intervalos.

Para o processamento do baço, após a imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente, as etapas realizadas foram semelhantes ao processamento da mandíbula, com exceção da etapa de desmineralização. A etapa do processamento histotécnico de rotina foi realizada logo após as 24 horas em formol.

Para as avaliações microscópicas, foi utilizado o microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha). As análises foram realizadas nas raízes distais dos primeiros molares inferiores, em cortes mostrando simultaneamente os terços coronário, médio e apical do canal radicular, o forame apical e o osso alveolar. Todas as análises foram realizadas por um único avaliador experiente, sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado.

3.5 Análise Descritiva das Características do Canal Radicular e Regiões Apical e Periapical

Inicialmente, os cortes mandibulares representativos do lado direito de cada grupo experimental foram corados com hematoxilina e eosina (HE) e submetidos à análise em microscopia óptica convencional.

A análise descritiva do canal radicular e das regiões apical e periapical foi realizada nos cortes representativos de cada período e de cada grupo experimental. Foi avaliado as condições do tecido pulpar e conteúdo dos canais radiculares (presença ou ausência de restos necróticos); cemento apical: características das lacunas e o seu conteúdo; ligamento periodontal: extensão (normal ou aumentado), característica do infiltrado celular inflamatório, presença de edema e de fibras colágenas; osso alveolar: ausência/presença de reabsorção e de osteoblastos.

3.6 Análise Morfométrica das Lesões Periapicais

A análise morfométrica foi realizada para avaliar a extensão da área das lesões periapicais, em microscopia de fluorescência, conforme descrito por De Rossi et al. (2007). Para a avaliação, foi utilizado os espécimes mandibulares do lado direito corados em HE com o auxílio do microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 10x,

operando no modo fluorescente – filtro Alexa Fluor 488 (AF488, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) – com as seguintes características: excitação de G365, refletores FT395 e emissão LP420. A área das lesões periapicais foram delineadas e medidas em micrômetros quadrados (μm^2) com auxílio do software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) para uso com este microscópio. Para o delineamento da lesão periapical, todas as estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar) foram excluídas, e foram incluídas apenas as áreas de reabsorção e infiltrado inflamatório.

3.7 Histoenzimologia para Atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP)

A atividade da TRAP foi utilizada para a marcação de osteoclastos presentes na lesão periapical (da Silva et al., 2012). Os cortes do lado direito da mandíbula foram desparafinados (2 banhos de xilol de 5 minutos cada) e hidratados (álcool 100% por duas vezes de cinco minutos cada; álcoois 95%, 70% e 50% por dois minutos cada e água destilada pelo mesmo período). A seguir, as lâminas foram colocadas em solução de álcool/acetona a 50% durante um minuto e os cortes serão secos à temperatura ambiente. Em seguida, uma solução contendo 10mL de tampão de ácido acético, 0,1 mL de dimetilformamida, 5mg de Fast-red e 1mg de ácido fosfórico naftol AS-BI (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) foi pipetada sobre os cortes, que permaneceram protegidos da luz, em estufa a 37°C, pelo tempo suficiente para se observar a marcação (aproximadamente 2 horas). Após a incubação, foi realizada a contra-coloração com hematoxilina por 30 segundos. A seguir, as lâminas foram montadas e avaliadas em microscópio Axio Imager sob luz convencional para contagem do número de células TRAP-positivas. A análise quantitativa do número de osteoclastos positivos para a enzima TRAP, foi realizada considerando o número total de osteoclastos presentes nas lacunas de reabsorção em contato direto com o osso alveolar ao redor da lesão periapical.

3.8 Imuno-Histoquímica

Foi realizada a técnica de imuno-histoquímica para a identificação da expressão de linfócitos T regulatórios, utilizando o marcador FOXP3 (área do osso

alveolar adjacente ao 1º molar inferior direito e baço) e a avaliação da osteoclastogênese, utilizando os marcadores RANK, RANKL e OPG (área do osso alveolar adjacente ao 1º molar inferior direito).

Os cortes histológicos foram desparafinados e hidratados. A recuperação antigênica foi realizada por imersão das lâminas em tampão citrato (pH = 6,0) e aquecimento em forno de microondas na potência máxima (12 segundos para cada ciclo e intervalo de 2 minutos) até atingir a temperatura de 83°C. Após o retorno à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas quatro vezes em água destilada e uma vez com o *wash buffer* (EnVision Flex-*wash buffer*, Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) por 5 minutos. A peroxidase endógena foi bloqueada por imersão das lâminas em uma solução de peróxido de hidrogênio (EnVision Flex-*Peroxidase blocking reagent*, Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos) por 10 minutos sob a proteção da luz, seguido de enxágue em *wash buffer*, como descrito anteriormente. O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução de BSA a 3% (albumina de soro bovino)/PBS por 1 hora, seguido de enxágue em *wash buffer*. Depois, as lâminas foram incubadas *overnight* em refrigerador com os anticorpos primários diluídos com o diluente próprio (EnVision-*antibody diluent*, Agilent, Santa Clara, CA, Estados Unidos): FOXP3 (sc-53876, *monoclonal mouse antibody*, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Califórnia, EUA); RANK (sc-374360, *monoclonal mouse antibody*, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Califórnia, EUA); RANKL (sc-377079, *monoclonal mouse antibody*, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Califórnia, EUA); OPG (sc-390518, *monoclonal mouse antibody*, Santa Cruz Biotechnology, Inc, Califórnia, EUA). Após retorno da temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas, como descrito anteriormente e incubadas com anticorpo secundário (EnVision-HRP, Santa Clara, CA, Estados Unidos), durante 20 minutos à temperatura ambiente. Após nova lavagem, foi adicionado o *substrate working solution-DAB* (EnVision-DAB+Chromogen, Santa Clara, CA, Estados Unidos), por 5 minutos. As lâminas foram lavadas novamente com água destilada e contracoradas com hematoxilina de Harris por 30 segundos. Em seguida, após novo enxágue em água destilada, as lâminas foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol e montadas com Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha) e lamínulas.

Os resultados foram expressos de maneira semi-quantitativa, levando em consideração a intensidade da marcação por meio de scores (0- marcação ausente, 1- marcação leve, 2- marcação moderada, 3- marcação intensa), com auxílio do microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 20x, (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha).

3.9 Análise Estatística

Para as variáveis semi-quantitativas, os valores foram expressos como média e desvio padrão. Para a comparação das médias entre os grupos foi utilizado o teste ANOVA, seguido pelo pós-teste de Tukey. Para comparação de grupos dois a dois, avaliando o mesmo período experimental, após o teste de normalidade, foram utilizados o Teste T não pareado ou o Teste Mann-Whitney. Todas as análises e representações gráficas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software Inc, San Diego CA, USA), adotando o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Análise Descritiva das Características do Canal Radicular e Regiões Apical e Periapical

Na análise descritiva do grupo controle (dente hígado), realizada em animais *wild-type* e *knockout* para *TLR2*, foi possível observar o terço apical radicular preservado, delimitado perifericamente por tecido conjuntivo fibrocelular. O tecido dentinário e o cimento também apresentaram características de normalidade. Não foram observados sinais de reabsorção óssea ou processo inflamatório (Figura 4).

Já nos grupos experimentais *WT*, após a indução da lesão periapical, inicialmente, foi possível observar a presença de células inflamatórias mononucleares e osso alveolar com focos de reabsorção. Aos 21 dias, o terço apical radicular apresentou morfologia alterada, delimitando internamente com células inflamatórias crônicas e reabsorção óssea moderada. Com a progressão da lesão periapical, aos 42 dias de desenvolvimento, já foi possível observar o terço apical com proeminente reabsorção e morfologia alterada. Além disso, foi observado evidente aumento do espaço do periodonto apical e infiltrado inflamatório moderado, com focos de células crônicas e osso alveolar intensamente reabsorvido (Figura 4).

Já nos grupos experimentais *WT+Pam3cys*, nos períodos iniciais de desenvolvimento da lesão periapical, foi possível observar a presença da necrose do tecido pulpar, porém, o infiltrado inflamatório na região periapical foi praticamente inexistente, com algumas estruturas periodontais ainda preservadas. Já no período de 42 dias, notou-se, a presença de um infiltrado inflamatório suave, com moderado espessamento do ligamento periodontal e osso alveolar com focos de reabsorção e neoformação (Figura 4).

Ao avaliar o desenvolvimento da lesão periapical nos grupos experimentais *knockout* para *TLR2*, aos 14 dias, foi possível verificar a presença do infiltrado inflamatório moderado, espaço do ligamento periodontal alargado e áreas de reabsorção óssea. Aos 21 dias, observou-se, um alargamento do espaço do ligamento periodontal, exibindo infiltrado inflamatório moderado. Com a progressão da lesão periapical, principalmente aos 42 dias, ficou evidente o aumento do espaço do periodonto apical, intensa dissociação fibrilar e terço apical com proeminente

reabsorção e morfologia alterada. Além disso, o osso alveolar apresentou grandes áreas de reabsorção (Figura 4).

Nos grupos experimentais *TLR2KO*+Pam3cys, o desenvolvimento da lesão periapical ocorreu de forma lenta e não progressiva. No período de 14 dias, notou-se a presença de um infiltrado inflamatório leve e reabsorção óssea suave. Com a progressão dos períodos experimentais, aos 21 dias, foi observado um infiltrado inflamatório misto (suave para moderado), ligamento periodontal alterado e focos de reabsorção óssea. Já no período final de 42 dias, o infiltrado inflamatório foi moderado, terço apical com áreas focais de reabsorção. Além disso, foi possível observar o aumento do espaço do periodonto apical e osso alveolar reabsorvido (Figura 4).

4.2 Análise Morfométrica da Área das Lesões Periapicais

A análise dos dados mostrou uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre os dois grupos experimentais com relação ao tamanho da lesão periapical, que foi maior nos animais *TLR2KO*. Além disso, os animais que receberam o ligante Pam3cys, tanto o grupo dos animais *WT*, quanto os animais *TLR2KO*, apresentaram lesões periapicais menores, sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). No que diz respeito à comparação entre os grupos *WT* e *WT*+Pam3cys, foi possível observar uma significância estatística aos 42 dias ($p = 0,002$), com redução da lesão periapical no grupo *WT*+Pam3cys. Ao comparar os grupos *TLR2KO* e *TLR2KO*+Pam3cys, notou-se uma redução da área da lesão nos grupos que receberam o ligante, com diferença estatisticamente significativa em todos os períodos experimentais ($p < 0,05$) (Figuras 4 e 5/Quadro 2).

Quadro 2. Média da Mensuração da Lesão Periapical.

Média da Mensuração da Lesão Periapical				
Período Experimental	<i>WT</i>	<i>WT</i> +Pam3cys	<i>TLR2KO</i>	<i>TLR2KO</i> +Pam3cys
14 dias	70.170 μm^2	63.723 μm^2	172.518 μm^2	51.389 μm^2
21 dias	84.378 μm^2	76.261 μm^2	150.601 μm^2	37.472 μm^2
42 dias	221.785 μm^2	63.418 μm^2	442.190 μm^2	80.271 μm^2

Figura 4. Fotomicrografias representativas após coloração de Hematoxilina e Eosina e análise de fluorescência em dentes de camundongos do grupo controle e grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical (todas as figuras, aumento de 10x).

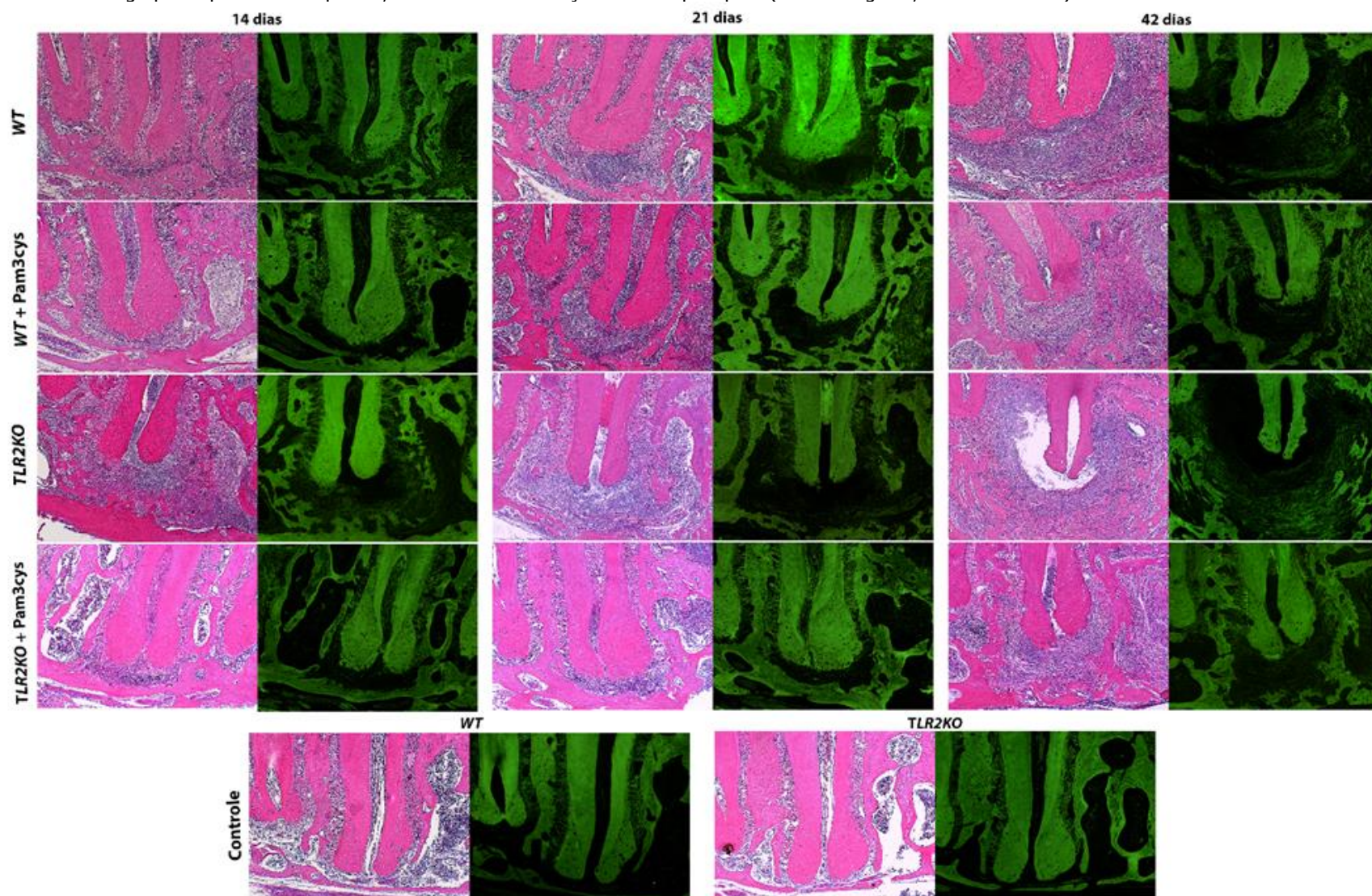
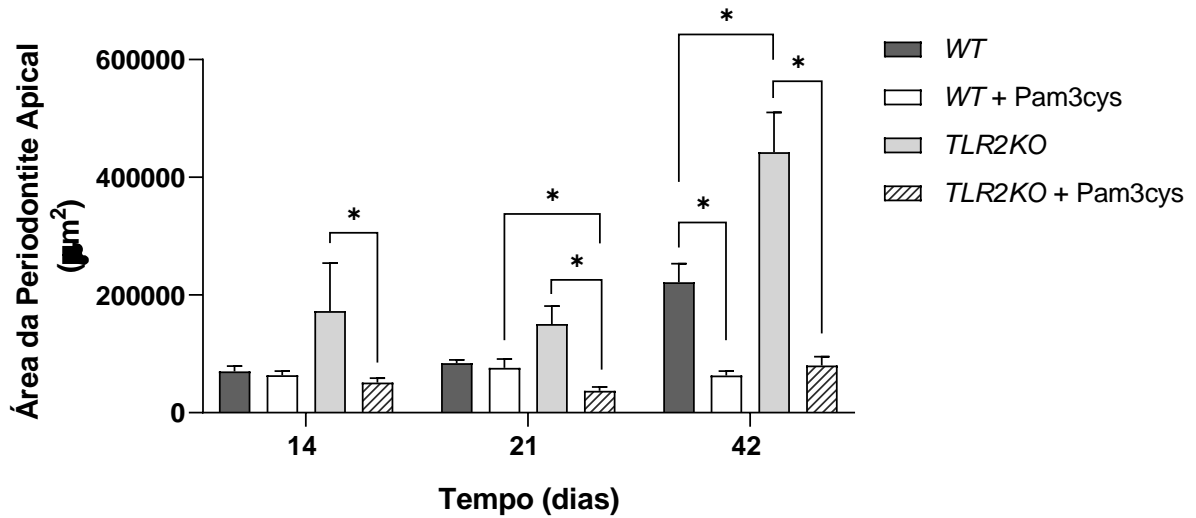


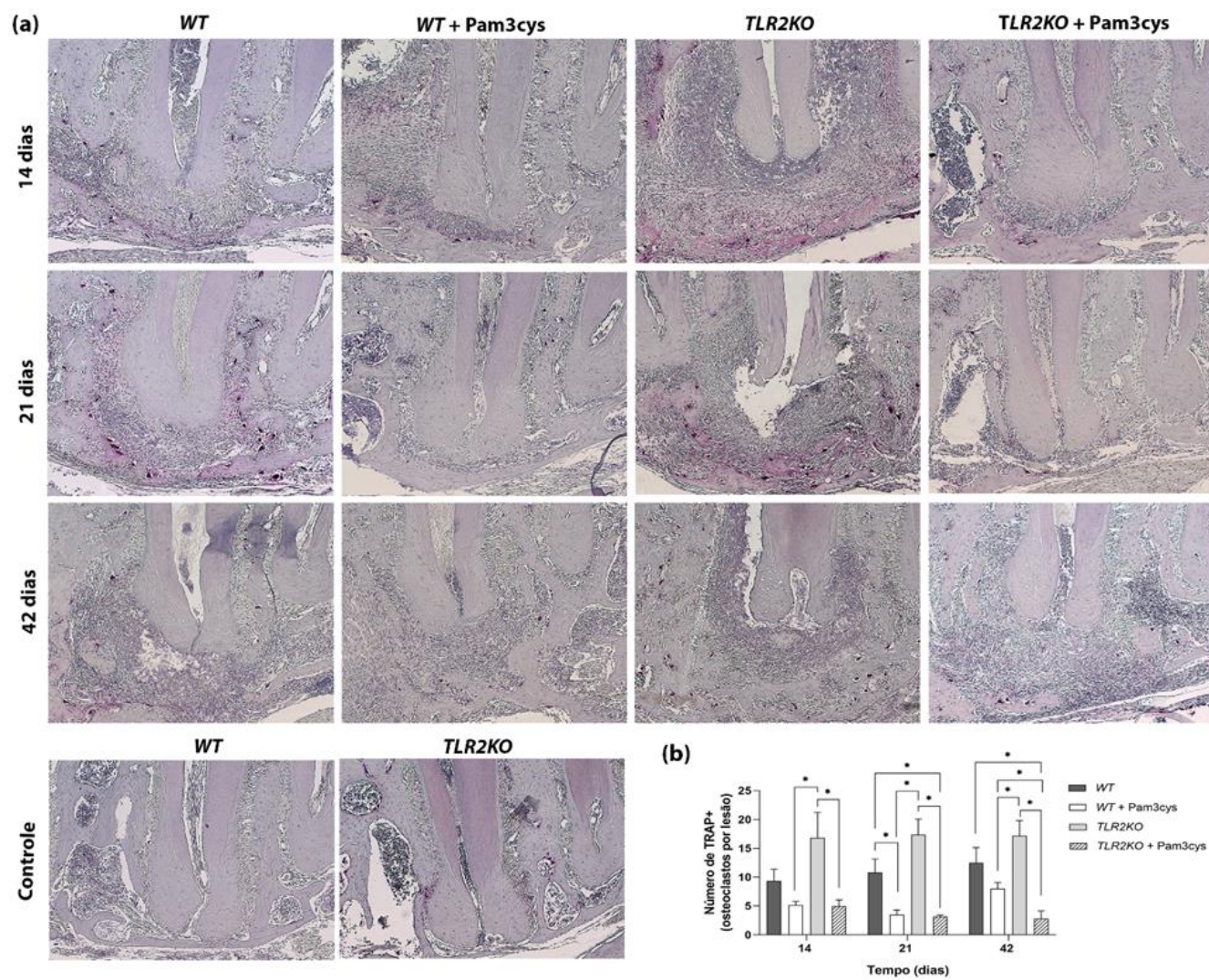
Figura 5. Representação gráfica da medida da área da lesão periapical em μm^2 nos diferentes grupos aos 14, 21 e 42 dias. (*) Representa uma diferença estatisticamente significativa.



4.3 Análise de Histoenzimologia para atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP)

Comparando os diferentes períodos experimentais e considerando os grupos com lesão periapical induzida, foi possível observar um aumento significativo no número de osteoclastos no grupo de animais *TLR2KO* quando comparado aos animais *TLR2KO+Pam3cys* ($p < 0,05$), em todos os períodos de desenvolvimento da lesão periapical. Além disso, foi possível observar que, o grupo de animais *WT+Pam3cys*, apresentaram menor número de osteoclastos quando comparados aos que não receberam o ligante, sendo essa diferença estatisticamente significativa aos 21 dias ($p = 0,02$) (Figura 6).

Figura 6. (a) Fotomicrografias representativas da Histoenzimologia para Atividade da Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) em dentes de camundongos do grupo controle e grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical (todas as figuras, aumento de 20x); Células coradas em roxo significa marcação positiva para TRAP. (b) Representação gráfica do número de osteoclastos (TRAP+) por lesão periapical. (*) Representa uma diferença estatisticamente significativa.

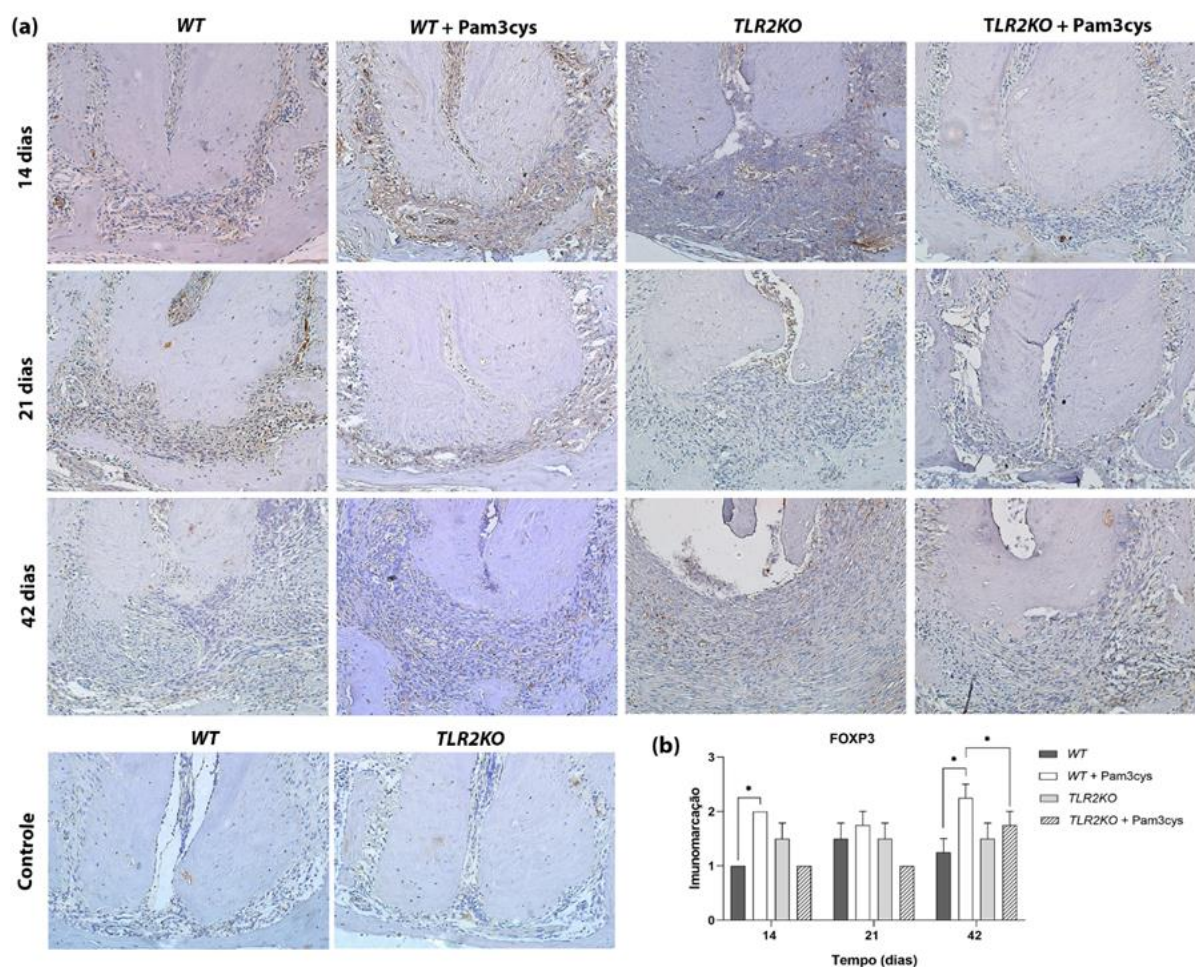


4.4 Análise Imuno-Histoquímica

FOXP3

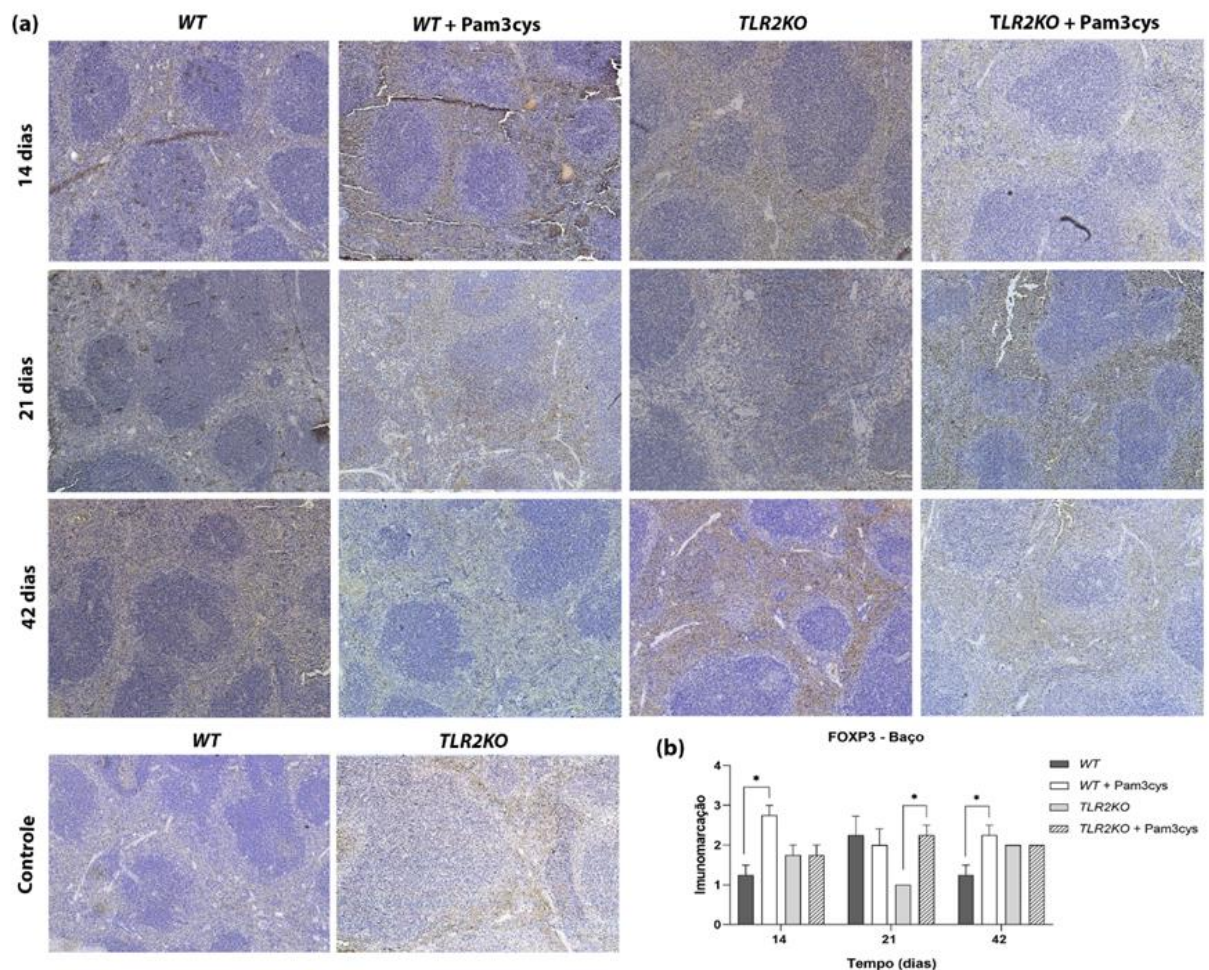
Considerando os grupos com lesão periapical induzida, os animais do grupo *WT*+Pam3cys, apresentaram um aumento na expressão de FOXP3, quando comparado ao grupo *WT*, sendo essa diferença estatisticamente significativa nos períodos de 14 e 42 dias ($p=0.03$). Já no grupo *TLR2KO*+Pam3cys, houve uma tendência na redução da marcação para o FOXP3, porém sem significância estatística em 14 e 21 dias, sendo essa diferença observada apenas no período de 42 dias ($p=0.02$), quando comparado aos animais *WT*+Pam3cys (Figura 7).

Figura 7. (a) Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo FOXP3 em dentes de camundongos do grupo controle e grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical (todas as figuras, aumento de 20x). (b) Representação gráfica dos resultados após imunomarcção com anticorpo FOXP3 em dentes de camundongos dos grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical. (*) Representa uma diferença estatisticamente significativa.



Para a avaliação da expressão geral dos Tregs, foi realizada a análise também no baço dos camundongos. Assim, os animais *WT* que receberam o ligante Pam3cys apresentaram maior expressão de FOXP3, sendo essa diferença estatisticamente significativa no período de 14 dias e 42 dias ($p=0.02$). Já com relação aos animais *KO* para TLR2, foi possível observar um aumento da marcação de FOXP3 aos 21 dias ($p=0.02$) nos animais *TLR2KO* que receberam o ligante sintético (Figura 8).

Figura 8. (a) Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo FOXP3 em baço de camundongos do grupo controle e grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical (todas as figuras, aumento de 10x). (b) Representação gráfica dos resultados após imunomarcção com anticorpo FOXP3 em baço de camundongos dos grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical. (*) Representa uma diferença estatisticamente significativa.



RANK/RANKL/OPG

A imunomarcção para RANK foi observada em todos os grupos experimentais, porém sem diferença estatística (Figura 9). Nos grupos experimentais nos quais o ligante Pam3cys foi administrado, notou-se uma tendência na redução da marcação para o RANKL, sendo essa diferença estatisticamente significativa entre os animais *TLR2KO* e *TLR2KO+Pam3cys*, aos 21 e 42 dias ($p=0.03$) (Figura 10). Com relação ao OPG, foi observado que os animais *WT* que receberam a administração do Pam3cys tiveram maior expressão dessa proteína em relação ao grupo sem o ligante, com diferença estatística no período de 21 dias ($p=0.01$). Além disso, nos animais *TLR2KO*, a expressão de OPG também foi maior nos grupos que receberam o lipopeptídeo sintético, com diferença estatística aos 42 dias ($p=0.02$) (Figura 11).

Figura 9. (a) Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo RANK em dentes de camundongos do grupo controle e grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical (todas as figuras, aumento de 20x). (b) Representação gráfica dos resultados após imunomarcção com anticorpo RANK em dentes de camundongos dos grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical.

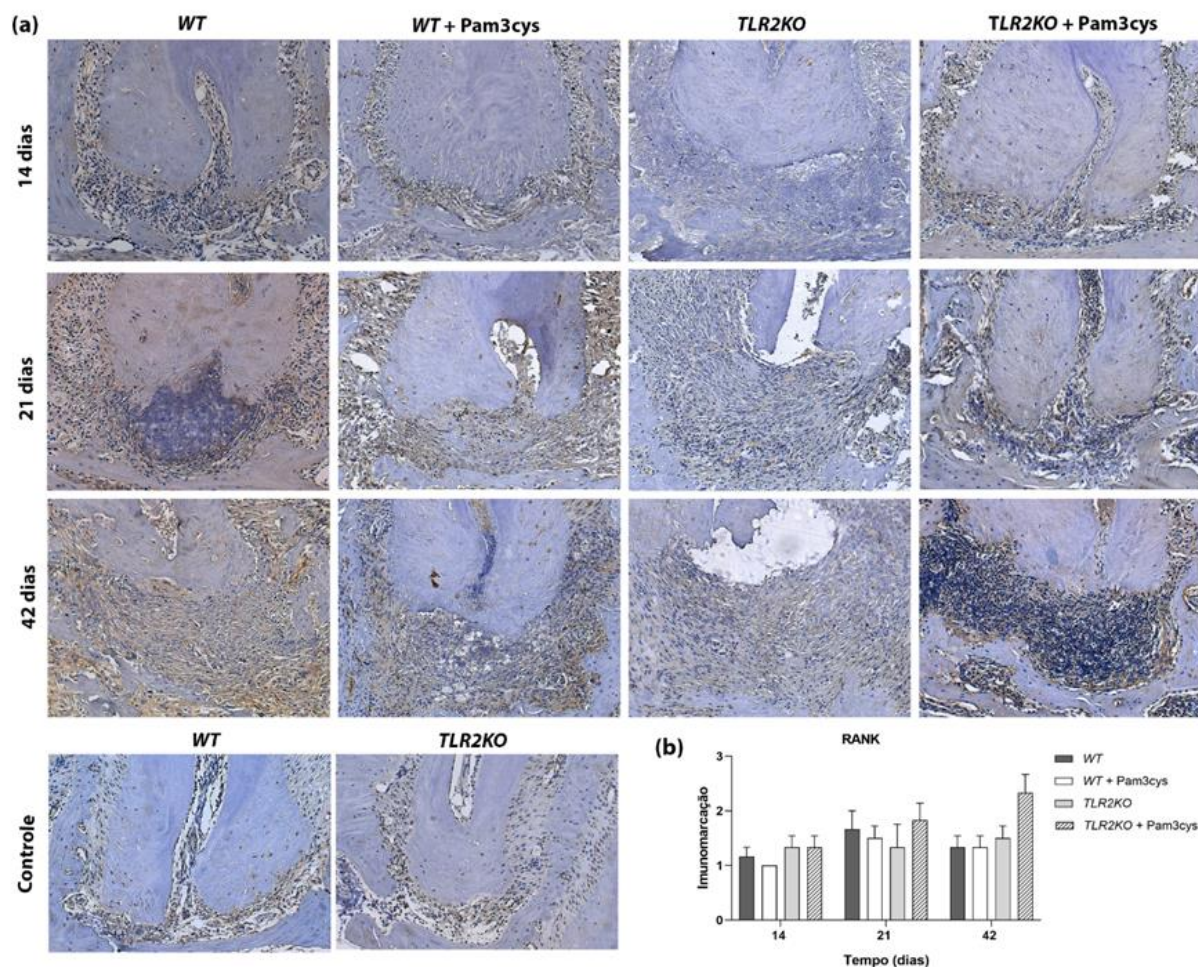


Figura 10. (a) Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo RANKL em dentes de camundongos do grupo controle e grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical (aumento de 20x). (b) Representação gráfica dos resultados após imunomarcção com anticorpo RANKL em dentes de camundongos dos grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical. (*) Representa uma diferença estatisticamente significativa.

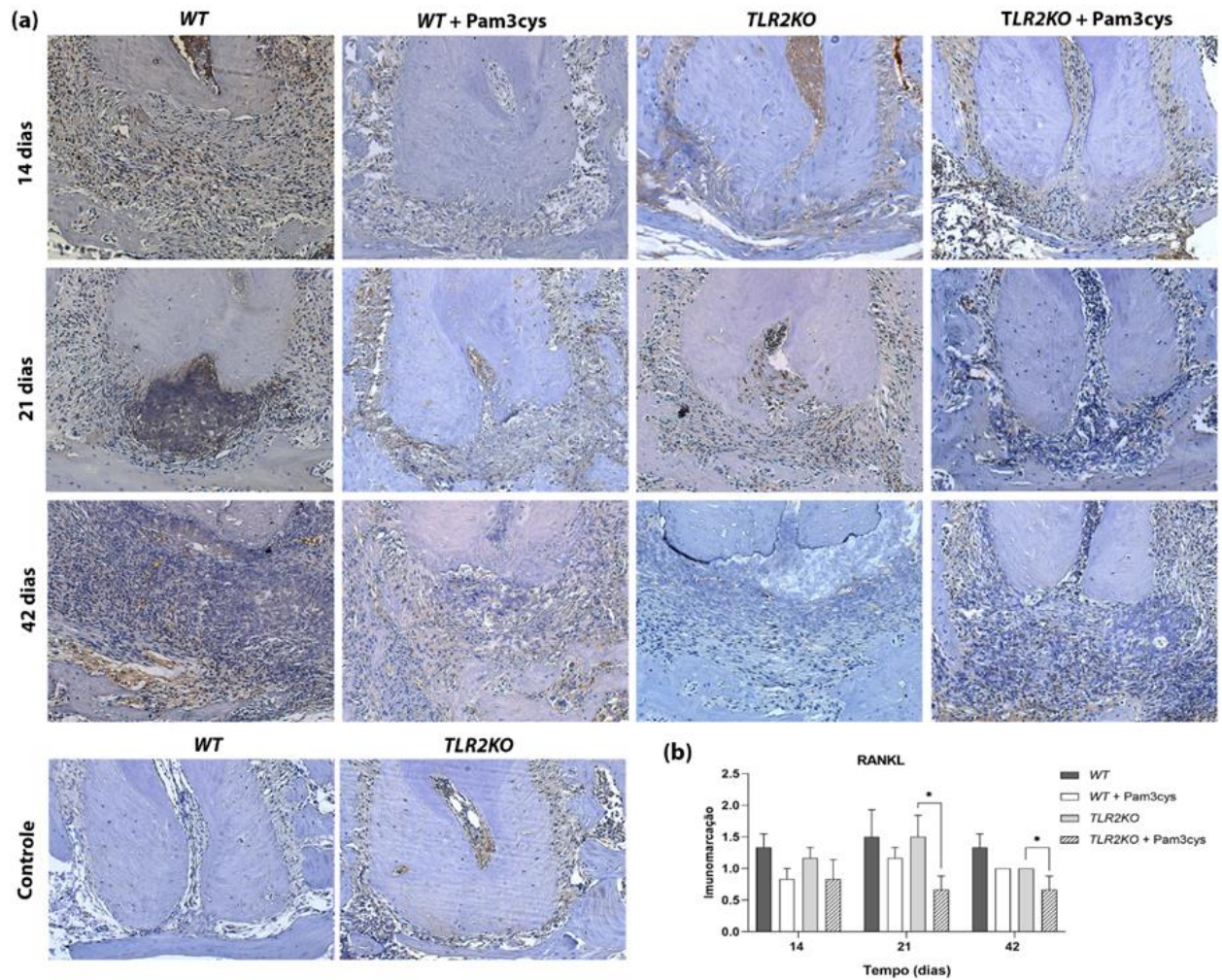
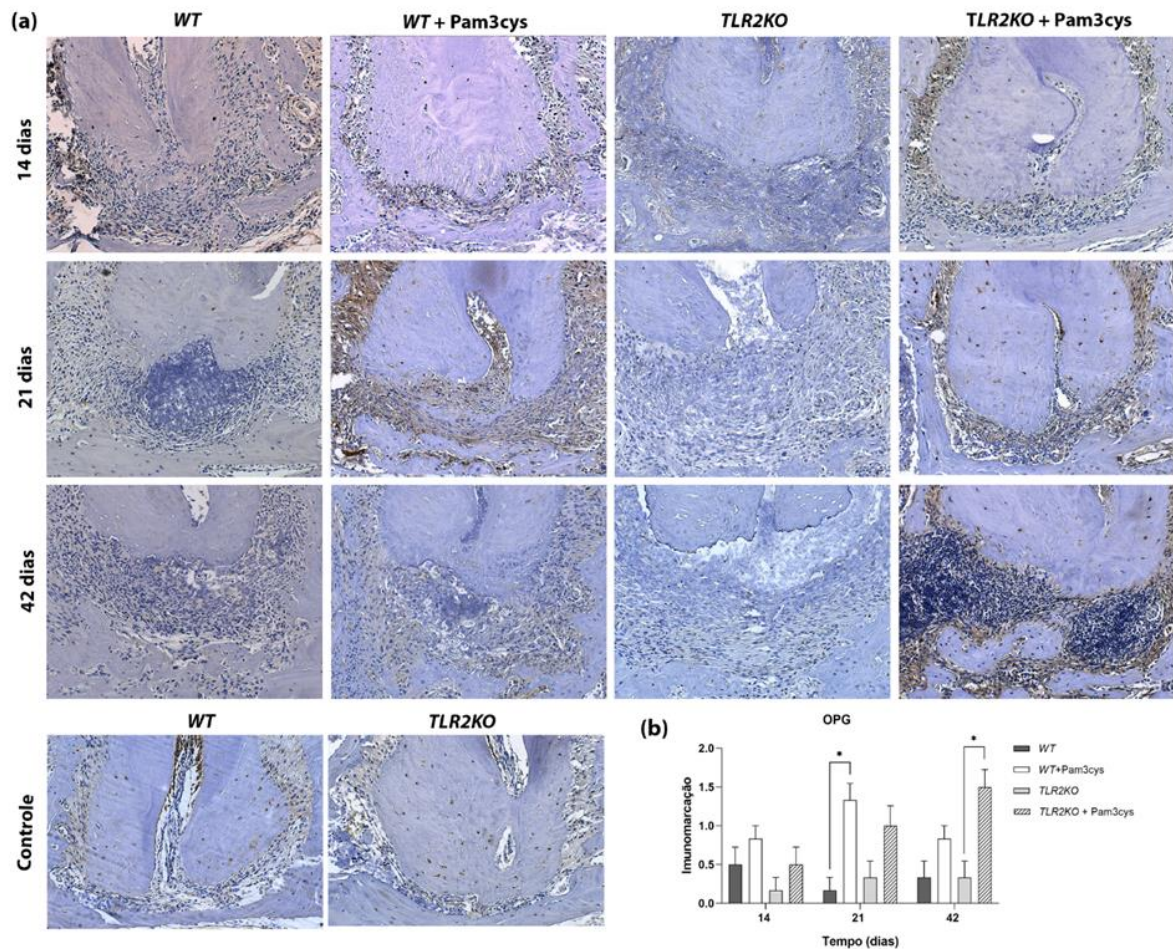
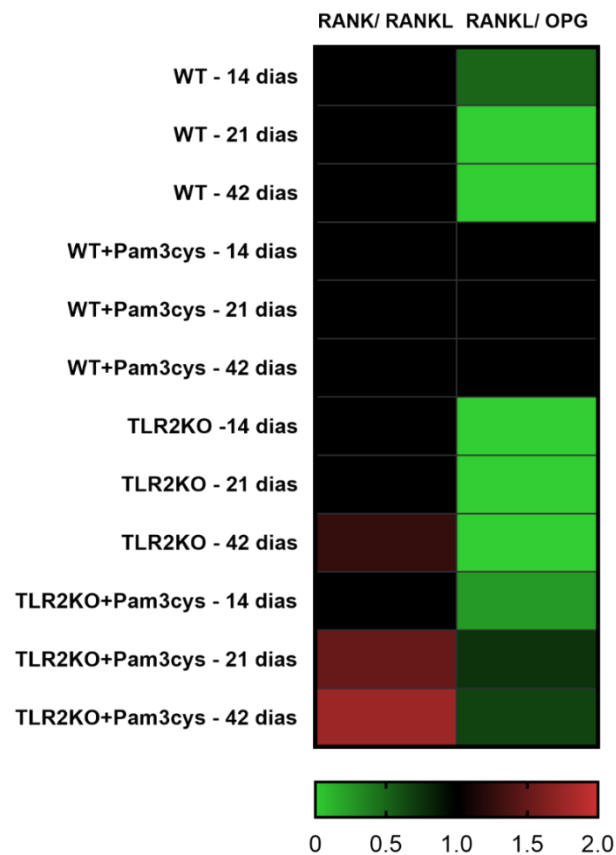


Figura 11. (a) Fotomicrografias representativas após imunomarcacão com anticorpo OPG em dentes de camundongos do grupo controle e grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical (aumento de 20x). (b) Representação gráfica dos resultados após imunomarcacão com anticorpo OPG em dentes de camundongos dos grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical. (*) Representa uma diferença estatisticamente significativa.



Ao avaliarmos a razão de ligação entre os receptores e ligante desse sistema (RANK/RANKL/OPG), mesmo sem diferença estatística, foi possível observar que tanto o grupo *WT*, quanto os animais *TLR2KO*, apresentaram maior razão de ligação entre RANK/RANKL do que RANKL/OPG. Já os animais que receberam o ligante sintético (*WT+Pam3cys* e *TLR2KO+Pam3cys*), apesar de se notar a presença de marcação entre RANK/RANKL, a expressão de ligação entre RANKL/OPG foi maior, equilibrando o processo de reabsorção óssea (Figura 12).

Figura 12. Mapa de calor da razão de marcação entre os anticorpos RANK/RANKL e RANKL/OPG, em dentes de camundongos dos grupos experimentais após 14, 21 e 42 dias de indução da lesão periapical.



De maneira geral, os resultados obtidos foram:

- nos animais *WT*, observou-se reação inflamatória crônica, elevado número de osteoclastos, imunomarcção leve para Tregs, presença constante de RANKL e aumento progressivo da área das lesões periapicais;
- nos animais *WT+Pam3Cys*, a presença do ligante inibiu a progressão das lesões periapicais induzidas em camundongos (menores áreas, infiltrado inflamatório menos intenso e menor número de osteoclastos), aumentando o número de Tregs e a expressão de OPG;
- nos animais *KO*, na ausência dos receptores *TLR2*, observou-se intenso infiltrado inflamatório, lesões periapicais maiores, elevado número de osteoclastos ao longo de todos os períodos avaliados, imunomarcção leve para Tregs e menor expressão de OPG;

- nos animais *KO*+Pam3Cys, na ausência dos receptores *TLR2* e presença do ligante, observou-se infiltrado inflamatório moderado, menores áreas de lesões periapicais e de expressão de Tregs, número reduzido de osteoclastos, além de menor expressão de RANKL e maior expressão de OPG em comparação aos animais *KO*.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) se destacam por serem o único tipo de células com papel supressor do sistema imunológico, tanto em processos fisiológicos, como nas doenças (Zhuo et al., 2015; Shao et al., 2021). No presente trabalho, a administração do lipopeptídeo sintético Pam3cys aumentou a proliferação de Tregs durante o desenvolvimento da lesão periapical em camundongos *wild-type*. Corroborando com os nossos achados, diferentes estudos em modelos experimentais de leishmaniose visceral (Shakya et al., 2011), alzheimer (Pourbadie et al., 2018) e psoríase (Nakao et al., 2020), demonstraram o papel protetor do Pam3cys. Além disso, outros trabalhos descreveram efeitos positivos na proliferação, função e viabilidade de diferentes tipos celulares do sistema imune, após o tratamento com esse lipopeptídeo (Chen et al., 2009; Bhaskaran et al., 2015; Khokhani et al., 2021).

Embora alguns estudos evidenciem que o fenótipo supressivo dos Tregs seja temporariamente paralisado (Sutmuller, 2006) e suas funções reduzidas na presença do ligante Pam3cys (Nyirenda et al., 2015), nossos resultados, de forma oposta, mostraram que os animais *wild-type* que receberam esse lipopeptídeo, apresentaram maior sinalização dos Tregs, associado a uma redução da lesão periapical, principalmente aos 42 dias do período experimental. Portanto, esses linfócitos não perderam suas capacidades imuno-regulatórias. Nesse sentido, a perda transitória da expressão de Tregs na presença do Pam3cys relatada em alguns estudos, pode ser devido ao uso somente de células CD4+CD25+ na cultura celular, ao invés das células CD4+CD25+FOXP3+, o que pode ter afetado a proliferação de FOXP3 (Bhaskaran et al., 2015), visto que, o fator de transcrição FOXP3, é o principal marcador intracelular dos Tregs e possui um papel fundamental no desenvolvimento das células CD4+CD25+ (Zhuo et al., 2015; Shao et al., 2021). Além disso, a anulação do efeito dos Tregs pode ser devido à atuação de outras citocinas, como a IL-2, que mediada pelo lipopeptídeo sintético podem influenciar na atividade das células T efetoras tornando-as refratárias à supressão de Tregs (Liu et al., 2006), mas não devido ao efeito direto dos ligantes sintéticos nos Tregs.

Semelhante aos nossos achados, em um trabalho realizado por Nakao et al., 2020, utilizando um modelo de psoríase induzida em camundongos *WT* e *TLR2KO*, foi possível observar que a estimulação com o ligante Pam3cys também provocou uma maior proliferação das células Tregs e redução da inflamação cutânea. No entanto, a

ausência do receptor *toll like 2* nos animais, diminuiu a expressão das células T regulatórias e provocou uma exacerbação da doença. Portanto, os autores demonstraram que o *TLR2* desempenha um papel fundamental na fisiopatologia da psoríase e a sinalização desses receptores em Tregs pode induzir respostas inflamatórias e anti-inflamatórias. De fato, como já demonstrado em estudos anteriores (Netea et al., 2004; Liu et al., 2006), a ausência dos receptores *TLR2* nos animais provoca uma redução na sinalização de Tregs. Apesar do Pam3cys ter a capacidade de estimular a proliferação de Tregs (Chen et al., 2009; Nakao et al., 2020), de um modo geral, os resultados do presente estudo, evidenciaram que mesmo após a administração do ligante, a imunomarcagem para Tregs não foi muito expressiva nos animais com ausência do receptor *TLR2*, quando comparado ao grupo de animais *wild-type* em que foi administrado esse lipopeptídeo.

Os receptores *toll like*, tais como os *TLR2*, atuam como sensores primordiais para os sistemas imunes inato e adaptativo (Chen et al., 2018; Nakao et al., 2020). Dessa forma, em concordância com estudos prévios (da Silva et al., 2012; Rider et al., 2016), nossos resultados demonstraram mais uma vez, a importância desse receptor durante o desenvolvimento da lesão periapical, considerando que, a ausência do *TLR2* em camundongos, provocou um desenvolvimento de lesões periapicais extensas quando comparado aos animais *wild-type*. Portanto, a exacerbação da lesão periapical pode ser justificada pela superexpressão de outros receptores, como o *TLR4*, e pela ativação de diferentes vias de sinalização (Rider et al., 2016).

Vale ressaltar ainda que, as mais variadas vias de sinalização, podem ser ativadas também por meio da utilização de ligantes com fins terapêuticos, como o Pam3cys. Atualmente, esses ligantes sintéticos, estão cada vez mais atraindo a prática clínica devido a sua capacidade de modular a resposta imune em uma direção específica (Khokhani et al., 2021). Embora tenha sido descoberto que esses ligantes podem afetar a imunomodulação óssea, o resultado depende muito do alvo celular (Kobayashi et al., 2000; Suzuki et al., 2004) e do tipo de ligante terapêutico utilizado, considerando que, os ligantes de superfície celular, tais como o Pam3cys, podem atuar na inibição da formação dos osteoclastos (Khokhani et al., 2021). Portanto, até o nosso conhecimento, essa é a primeira investigação que demonstrou que, a administração do ligante sintético Pam3cys, modulou negativamente a progressão da lesão periapical e promoveu uma redução na quantidade de osteoclastos, tanto nos

animais *wild-type*, como nos animais com ausência do receptor *TLR2*, ao longo dos períodos experimentais. No entanto, considerando que o processo de remodelação óssea é dependente do equilíbrio entre variadas células, como os osteoblastos e osteoclastos, além de outras vias de sinalização do sistema imune e mediadores inflamatórios, é importante entender melhor o papel do lipopeptídeo Pam3cys sobre cada etapa do processo de imunomodulação óssea, além de estabelecer adequadamente os intervalos e doses de aplicação que promovam um resultado mais eficaz, o que pode ser explorado melhor em estudos futuros.

A ativação dos osteoclastos está associada a uma maior progressão da lesão periapical, visto que, essas células são direcionadas para promover a destruição óssea. Sabe-se que variadas citocinas participam desse processo, assim, a estabilidade ou desenvolvimento dessa lesão, vai depender do tipo celular e das diferentes vias de ativação (Kawashima et al., 2007; Garlet et al., 2010; da Silva et al., 2012; Cavalla et al., 2021; Udagawa et al., 2021). Destacamos no presente estudo que, o RANKL, uma das principais citocinas responsáveis pela osteoclastogênese (Yasuda et al., 1998; Udagawa et al., 2021), foi mais expressa nos animais *TLR2KO*. Além disso, esses animais apresentaram maior razão de marcação entre RANK/RANKL associado a um desenvolvimento exacerbado da lesão periapical. Vale ressaltar que a ligação entre RANK/RANKL é responsável por desencadear o processo de reabsorção óssea (Cavalla et al., 2021). No entanto, os animais que receberam o ligante Pam3cys, tiveram uma tendência na redução da marcação para o RANKL. Levando em consideração o importante papel da osteoprotegerina como agente regulador da formação de osteoclastos (Udagawa et al., 2021), no presente estudo, demonstramos uma expressão elevada da OPG nos animais que receberam o ligante sintético Pam3cys, sendo assim, a presença desse receptor, reduziu a ligação entre RANK/RANKL. Portanto, o conjunto dos nossos resultados mostraram que a administração do lipopeptídeo Pam3cys contribuiu para a inibição do processo de reabsorção óssea durante o desenvolvimento da lesão periapical.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Nos animais *WT*, a administração do ligante Pam3cys aumentou a proliferação dos Tregs e preveniu a progressão da lesão periapical em camundongos. Por outro lado, na ausência do receptor *TLR2* nos animais *KO*, a expressão de Tregs foi menor com maiores áreas de lesões periapicais. Por fim, a administração sistêmica do ligante Pam3cys nos animais *KO* foi capaz de limitar os efeitos deletérios da ausência do receptor *TLR2* com menores áreas de lesão periapical, menor expressão de Tregs e RANKL, menor número de osteoclastos e maior expressão de OPG.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature*. 2000; 406(6797):782-7.
2. Almeida L, Lochner M, Berod L, Sparwasser T. Metabolic pathways in T cell activation and lineage differentiation. *Semin Immunol*. 2016; 28(5):514-24.
3. AlShwaimi E, Purcell P, Kawai T, Sasaki H, Oukka M, Campos-Neto A, Stashenko P. Regulatory T cells in Mouse Periapical Lesions. *J Endod*. 2009; 35(9):1229-1233.
4. Alvarez C, Monasterio G, Cavalla F, Córdova LA, Hernández M, Heymann D, Garlet GP, Sorsa T, Pärnänen P, Lee HM, Golub LM, Vernal R, Kantarci A. Osteoimmunology of Oral and Maxillofacial Diseases: Translational Applications Based on Biological Mechanisms. *Front Immunol*. 2019; 18(10):1664.
5. Alvarez C, Rojas C, Rojas L, Cafferata EA, Monasterio G, Vernal R. Regulatory T Lymphocytes in Periodontitis: A Translational View. *Mediators Inflamm*. 2018; 2018:7806912.
6. Amiset L, Fend L, Gatard-Scheikl T, Rittner K, Duong V, Rooke R et al. TLR2 ligation protects effector T cells from regulatory T-cell mediated suppression and repolarizes T helper responses following MVA-based cancer immunotherapy. *Oncoimmunology*. 2012; 1(8): 1271-80.
7. Araujo-Pires AC, Vieira AE, Francisconi CF, Biguetti CC, Glowacki et al. A, IL4/CCL22/CCR4 axis controls regulatory T cell migration that suppresses inflammatory bone loss in murine experimental periodontitis *J Bone Miner Res*. 2014; 30(3):412-22.
8. Ausubel FM. Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nat Immunol*. 2005; 6(10):973-9.
9. Barreiros D, Pucinelli CM, Oliveira KMH, Paula-Silva FWG, Nelson Filho P, Silva LABD, Küchler EC, Silva RABD. Immunohistochemical and mRNA expression of RANK, RANKL, OPG, TLR2 and MyD88 during apical periodontitis progression in mice. *J Appl Oral Sci*. 2018; 26:e20170512.
10. Bayry, J and Jean-Francois Gautier, J-F. Bridging Innate and Adaptive Immunity. *Cell Metabolism*. 2016; 23, 231-33.
11. Bettini M, Bettini ML. Function, Failure, and the Future Potential of Tregs in Type 1 Diabetes. *Diabetes*. 2021; 70(6):1211-19.
12. Bezerra da Silva RA, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J*. 2014; 47(7):675-86.

13. Bhaskaran N, Cohen S, Zhang Y, Weinberg A, Pandiyan P. TLR-2 Signaling Promotes IL-17A Production in CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory Cells during Oropharyngeal Candidiasis. *Pathogens*. 2015; 4(1):90-110.
14. Bonney KM, Taylor JM, Thorp EB, Epting CL, Engman DM. Depletion of regulatory T cells decreases cardiac parasitosis and inflammation in experimental Chagas disease. *Parasitol Res*. 2015; 114(3):1167-78.
15. Byng-Maddick R, Ehrenstein MR. The impact of biological therapy on regulatory T cells in rheumatoid arthritis. *Rheumatology*. 2015; 54(5):768-75.
16. Cafferata EA, Jerez A, Vernal R, Monasterio G, Pandis N, Faggion CM Jr. The therapeutic potential of regulatory T lymphocytes in periodontitis: A systematic review. *J Periodontal Res*. 2019; 54(3):207-17.
17. Caplan DJ, Chasen JB, Krall EA, Cai J, Kang S, Garcia RI, Offenbacher S, Beck JD. Lesions of Endodontic Origin and Risk of Coronary Heart Disease. *J Dent Res*. 2006; 85:996-1000.
18. Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res*. 2021; 100(1):29-36.
19. Chandran S, Tang Q, Sarwal M, Laszik ZG, Putnam AL, et al. Polyclonal Regulatory T Cell Therapy for Control of Inflammation in Kidney Transplants. *Am J Transplant*. 2017; 17(11):2945-54.
20. Chen E, Bakr MM, Firth N, Love RM. Inflammatory cell expression of Toll-like receptor-2 (TLR2) within refractory periapical granuloma. *F1000Res*. 2018; 20(7):1819.
21. Chen Q, Davidson TS, Huter EN, Shevach EM. Engagement of TLR2 does not reverse the suppressor function of mouse regulatory T cells, but promotes their survival. *J Immunol*. 2009; 183(7):4458-66.
22. Chiasson VL, Pakanati AR, Hernandez M, Young KJ, Bounds KR, Mitchell BM. Regulatory T-Cell Augmentation or Interleukin-17 Inhibition Prevents Calcineurin Inhibitor-Induced Hypertension in Mice. *Hypertension*. 2017; 70(1):183-91.
23. Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Majstorović I, Vasilijić S, Rudolf R, Brkić Z, Milosavljević P. Regulatory T-cells in periapical lesions. *J Dent Res*. 2009; 88:997-1002.
24. Cota AM, Midwinter MJ. The immune system. *Physiology*. 2015; 13(6): 273-75.
25. da Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LA. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. *J Endod*. 2012; 38(6):803-13.

26. de Oliveira KMH, Garlet GP, De Rossi A, Barreiros D, Queiroz AM, da Silva LAB, Nelson-Filho P, da Silva RAB. Effects of Rosiglitazone on the Outcome of Experimental Periapical Lesions in Mice. *J Endod.* 2017; 43(12):2061-69.
27. De Rossi A, De Rossi M, Rocha LB, da Silva LAB, Rossi MA. Morphometric analysis of experimentally induced periapical lesions: radiographic vs histopathological findings. *Dentomaxillofac Radiol.* 2007; 36(4):211-7.
28. De Rossi A, Fukada SY, De Rossi M, da Silva RA, Queiroz AM, Nelson-Filho P, da Silva LA. Cementocytes Express Receptor Activator of the Nuclear Factor Kappa-B Ligand in Response to Endodontic Infection in Mice. *J Endod.* 2016; 42(8):1251-7.
29. Desai SV, Love RM, Rich AM, Seymour GJ. Antigen recognition and presentation in periapical tissues: a role for TLR expressing cells? *Int Endod J.* 2011; 44:87–99.
30. Desai SV, Love RM, Rich AM, Seymour GJ. Antigen recognition and presentation in periapical tissues: a role for TLR expressing cells? *Int Endod J.* 2011; 44:87–99.
31. Eggenhuizen PJ, Ng BH, Ooi JD. Treg Enhancing Therapies to Treat Autoimmune Diseases. *Int J Mol Sci.* 2020; 21(19):7015.
32. Fernández A, Cárdenas AM, Astorga J, Veloso P, Alvarado A, Merino P, Pino D, Reyes-Court D, Hernández M. Expression of Toll-like receptors 2 and 4 and its association with matrix metalloproteinases in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2019; 23(12):4205-4212.
33. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity.* 2005; 22(3):329-41.
34. Francisconi CF, Vieira AE, Azevedo MCS, Tabanez AP, Fonseca AC et al. RANKL triggers Treg Mediated Immunoregulation in inflammatory osteolysis. *J Dent Res* 2018; 97(8):917-27.
35. Francisconi CF, Vieira AE, Azevedo MCS, Tabanez AP, Fonseca AC, Trombone APF, Letra A, Silva RM, Sfeir CS, Little SR, Garlet GP. RANKL Triggers Treg-Mediated Immunoregulation in Inflammatory Osteolysis. *J Dent Res.* 2018; 97(8):917-927.
36. Francisconi CF, Vieira AE, Bigueti CC, Glowacki AJ, Trombone AP et al. Characterization of the protective role of regulatory cells in experimental periapical lesion development and their chemoattraction manipulation as a therapeutic tool. *J Endod.* 2016; 42(1):120-6.
37. Galanos C, Freudenberg MA. Bacterial endotoxins: biological properties and mechanisms of action. *Mediators Inflamm.* 1993;2(7):S11-6.

38. Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci.* 2021; 22(3):1480.
39. Gao Y, You M, Fu J, Tian M, Zhong X, Du C, Hong Z, Zhu Z, Liu J, Markowitz GJ, Wang FS, Yang P. Intratumoral stem-like CCR4+ regulatory T cells orchestrate the immunosuppressive microenvironment in HCC associated with hepatitis B. *J Hepatol.* 2022; 76(1):148-159.
40. Garlet TP, Fukada SY, Saconato IF, Avila-Campos MJ, da Silva TA, Garlet GP, Cunha F de Q. CCR2 deficiency results in increased osteolysis in experimental periapical lesions in mice. *J Endod.* 2010; 36(2):244-50.
41. Glowacki AJ, Yoshizawa S, Jhunjunwala S, Vieira AE, Garlet GP, Sfeir C, Little SR. Prevention of inflammation mediated bone loss in murine and canine periodontal disease via recruitment of regulatory lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 2013; 110(46):18525-30.
42. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res.* 2012;1(4):e1.
43. Gund MP, Wrbas KT, Hannig M, Rupf S. Apical periodontitis after intense bruxism. *BMC Oral Health.* 2022; 22(1):91.
44. Han YK, Jin Y, Miao YB, Shi T, Lin XP. CD8+ Foxp3+ T Cells Affect Alveolar Bone Homeostasis via Modulating Tregs/Th17 During Induced Periodontitis: an Adoptive Transfer Experiment. *Inflammation.* 2018; 41(5):1791-1803.
45. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Sci.* 2004; 5(303):1526-9.
46. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 14(299):1057-61.
47. Hu M, Rogers NM, Li J, Zhang GY, Wang YM, Shaw K, O'Connell PJ, Alexander SI. Antigen Specific Regulatory T Cells in Kidney Transplantation and Other Tolerance Settings. *Front Immunol.* 2021;12:717594.
48. Huppert LA, Green MD, Kim L, Chow C, Leyfman Y, Daud AI, Lee JC. Tissue-specific Tregs in cancer metastasis: opportunities for precision immunotherapy. *Cell Mol Immunol.* 2022; 19(1):33-45.
49. Karamifar K, Tondari A, Saghiri MA. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur Endod J.* 2020; 5(2):54-67.

50. Kassem A, Henning P, Lundberg P, Souza PP, Lindholm C, Lerner UH. Porphyromonas gingivalis Stimulates Bone Resorption by Enhancing RANKL (Receptor Activator of NF- κ B Ligand) through Activation of Toll-like Receptor 2 in Osteoblasts. *J Biol Chem*. 2015; 290(33):20147-58.
51. Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol* 1999; 44: 55–66.
52. 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 Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 103(5):707-11.
53. Khokhani P, Rahmani NR, Kok A, Öner FC, Alblas J, Weinans H, Kruyt MC, Croes M. Use of Therapeutic Pathogen Recognition Receptor Ligands for Osteo-Immunomodulation. *Materials (Basel)*. 2021; 14(5):1119.
54. Kilkeny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010; 8(6):e1000412.
55. 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 TJ, Suda T. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med*. 2000; 191(2):275-86.
56. Komatsu N, Takayanagi H. Regulatory T cells in Arthritis. *Prog Mol Biol Transl Sci*. 2015; 136:207-15.
57. Li J, Tan J, Martino MM, Lui KO. Regulatory T-Cells: Potential Regulator of Tissue Repair and Regeneration. *Front Immunol*. 2018; 9:585.
58. Lin L, Dai F, Wei J, Chen Z. CD8⁺ Tregs ameliorate inflammatory reactions in a murine model of allergic rhinitis. *Allergy Asthma Clin Immunol*. 2021; 17(1):74.
59. Liu H, Komai-Koma M, Xu D, Liew FY. Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(18):7048-53.
60. Liu W, Ouyang H, Zeng Q, Luo R, Lu G. Decreased Treg-derived miR-181a and miR-155 correlated with reduced number and function of Treg cells in allergic rhinitis children. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2019; 276(4):1089-94.
61. Liu Z, Chen X, Zhang Z, Zhang X, Saunders L, Zhou Y, Ma PX. Nanofibrous Spongy Microspheres To Distinctly Release miRNA and Growth Factors To Enrich Regulatory T Cells and Rescue Periodontal Bone Loss. *ACS Nano*. 2018; 12(10):9785-99.

62. Matsushima N, Tanaka T, Enkhbayar P, Mikami T, Taga M, Yamada K, Kuroki Y. Comparative sequence analysis of leucine-rich repeats (LRRs) within vertebrate toll-like receptors. *BMC Genomics*. 2007; 21(8): 124.
63. Mazgaeen L, Gurung P. Recent Advances in Lipopolysaccharide Recognition Systems. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(2):379.
64. Menezes R, Garlet TP, Trombone AP, et al. The potential role of suppressors of cytokine signaling in the attenuation of inflammatory reaction and alveolar bone loss associated with apical periodontitis. *J Endod*. 2008; 34:1480-4.
65. Miyara M, Yoshioka Y, Kitoh A, Shima T, Wing K, Niwa A, Parizot C, Taflin C, Heike T, Valeyre D, Mathian A, Nakahata T, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M, Amoura Z, Gorochov G, Sakaguchi S. Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4+ T cells expressing the FoxP3 transcription factor. *Immunity*. 2009; 30(6):899-911.
66. Moser M, Leo O. Key concepts in immunology. *Vaccine*. 2010; 31(28): 1-13.
67. Müller E, Christopoulos PF, Halder S, Lunde A, Beraki K, Speth M, Øynebråten I, Corthay A.A. Toll-like receptor ligands and interferon- synergize for induction of antitumor M1 macrophages. *Front. Immunol*. 2017; 26(8):1383.
68. Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JAP, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Camilleri J, Silva RM, Dummer PMH. PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *Int Endod J*. 2021; 54(6):848-57.
69. Najafi S, Mirshafiey A. The role of T helper 17 and regulatory T cells in tumor microenvironment. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 2019; 41(1):16-24.
70. Nakao M, Sugaya M, Fujita H, Miyagaki T, Morimura S, Shibata S, Asano Y, Sato S. TLR2 Deficiency Exacerbates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation through Decrease in Regulatory T Cells and Impaired IL-10 Production. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(22):8560.
71. Nakao M, Sugaya M, Fujita H, Miyagaki T, Morimura S, Shibata S, Asano Y, Sato S. TLR2 Deficiency Exacerbates Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation through Decrease in Regulatory T Cells and Impaired IL-10 Production. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(22):8560.
72. Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LA, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002; 28(10):694-6.
73. Nelson-Filho P, Ruvieré DB, de Queiroz AM, de Paula-Silva FWG, Silva RABD, Lucisano MP, da Silva LAB. Comparative Molecular Analysis of Gram-Negative Bacteria in Primary Teeth with Irreversible Pulpitis or Periapical Pathology. *Pediatr Dent*. 2018; 40(4):259-264.

74. Netea MG, Suttmuller R, Hermann C, Van der Graaf CA, Van der Meer JW, van Krieken JH, Hartung T, Adema G, Kullberg BJ. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol.* 2004; 172(6):3712-8.
75. Nyirenda MH, Morandi E, Vinkemeier U, Constantin-Teodosiu D, Drinkwater S, Mee M, King L, Podda G, Zhang GX, Ghaemmaghami A, Constantinescu CS, Bar-Or A, Gran B. TLR2 stimulation regulates the balance between regulatory T cell and Th17 function: a novel mechanism of reduced regulatory T cell function in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2015; 194(12):5761-74.
76. Nyirenda MH, Morandi E, Vinkemeier U, Constantin-Teodosiu D, Drinkwater S, Mee M et al. TLR2 stimulation regulates the balance between regulatory T cell and Th17 function: a novel mechanism of reduced regulatory T cell function in multiple sclerosis. *J Immunol.* 2015; 194(12): 5761-74.
77. Oliveira KMH, da Silva RAB, de Rossi A, Fukada SY, Feres M, Nelson-Filho P, da Silva LAB. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. *Int Endod J.* 2015;48(1):46-59.
78. Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A. The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000; 97(25):13766-71.
79. Parachuru VPB, Coates DE, Milne TJ, Rich AM, Seymour GJ. FoxP3+ regulatory T cells, interleukin 17 and mast cells in chronic inflammatory periodontal disease. *J Periodontal Res.* 2018; 53(4):622-35.
80. Paula-Silva FWG, Arnez MFM, Petean IBF, Almeida-Junior LA, da Silva RAB, da Silva LAB, Faccioli LH. Effects of 5-lipoxygenase gene disruption on inflammation, osteoclastogenesis and bone resorption in polymicrobial apical periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2020;112:104670.
81. Peixoto RF, Pereira Jdos S, Nonaka CF, Silveira EJ, Miguel MC. Immunohistochemical analysis of FoxP3+ cells in periapical granulomas and radicular cysts. *Arch Oral Biol.* 2012; 57(9):1159-64.
82. Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):e3000410.
83. Pourbadie HG, Sayyah M, Khoshkholgh-Sima B, Choopani S, Nategh M, Motamedi F, Shokrgozar MA. Early minor stimulation of microglial TLR2 and TLR4 receptors attenuates Alzheimer's disease-related cognitive deficit in rats: behavioral, molecular, and electrophysiological evidence. *Neurobiol Aging.* 2018; 70:203-216.

84. Rider D, Furusho H, Xu S, Trachtenberg AJ, Kuo WP, Hirai K, Susa M, Bahammam L, Stashenko P, Fujimura A, Sasaki H. Elevated CD14 (Cluster of Differentiation 14) and Toll-Like Receptor (TLR) 4 Signaling Deteriorate Periapical Inflammation in TLR2 Deficient Mice. *Anat Rec (Hoboken)*. 2016; 299(9):1281-92.
85. Sakaguchi S, Miyara M, Costantino CM, Hafler DA. FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010; 10(7):490-500.
86. Saravia J, Chapman NM, Chi H. Helper T cell differentiation. *Cell Mol Immunol*. 2019; 16(7):634-643.
87. Sasaki H, Balto K, Kawashima N, Eastcott J, Hoshino K, Akira S, Stashenko P. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004;11(1):106-10.
88. Shakya N, Sane SA, Shankar S, Gupta S. Effect of Pam3Cys induced protection on the therapeutic efficacy of miltefosine against experimental visceral leishmaniasis. *Peptides*. 2011; 32(10):2131-3.
89. Shakya N, Sane SA, Vishwakarma P, Gupta S. Enhancement in therapeutic efficacy of miltefosine in combination with synthetic bacterial lipopeptide, Pam3Cys against experimental Visceral Leishmaniasis. *Exp Parasitol*. 2012;131(3):377-82.
90. Shao Q, Gu J, Zhou J, Wang Q, Li X, Deng Z, Lu L. Tissue Tregs and Maintenance of Tissue Homeostasis. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9:717903.
91. Sharpe AH. Mechanisms of costimulation. *Immunol*. 2009; 229(1):5–11.
92. Shen Z, Silva RM. MicroRNAs: emerging players in apical periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2021; 14(29):e20201058.
93. Shitara K, Nishikawa H. Regulatory T cells: a potential target in cancer immunotherapy. *Ann NY Acad Sci*. 2018; 417(1):104-15.
94. Silva LA, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *J Endod*. 2002; 28:94-8.
95. Silva LABD, Sá MAR, Melo RA, Pereira JDS, Silveira ÉJDD, Miguel MCDC. Analysis of CD57+ natural killer cells and CD8+ T lymphocytes in periapical granulomas and radicular cysts. *Braz Oral Res*. 2017;18(31):1-9.
96. Singer BD, King LS, D'Alessio FR. Regulatory T cells as immunotherapy. *Frontiers in immunology*. 2014; 5(46): 1-10.
97. Sjögren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*. 1997; 30:297-306.

98. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical Inflammatory Responses and Their Modulation. *Critical Reviews in Oral Bio & Med.* 1998; 9:498-521.
99. Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine.* 2011; 12(29): 3341-55.
100. Suttmuller RP, den Brok MH, Kramer M, Bennink EJ, Toonen LW, Kullberg BJ, Joosten LA, Akira S, Netea MG, Adema GJ. Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2006; 116(2):485-94.
101. Suzuki Y, Wakita D, Chamoto K, Narita Y, Tsuji T, Takeshima T, Gyobu H, Kawarada Y, Kondo S, Akira S, Katoh H, Ikeda H, Nishimura T. Liposome-encapsulated CpG oligodeoxynucleotides as a potent adjuvant for inducing type 1 innate immunity. *Cancer Res.* 2004; 64(23):8754-60.
102. Tabares-Guevara JH, Villa-Pulgarin JA, Hernandez JC. Atherosclerosis: immunopathogenesis and strategies for immunotherapy. *Immunotherapy.* 202; 13(14):1231-44.
103. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 2005; 17:1-14.
104. Takeda K, Akira S. Toll-like receptors. *Curr Protoc Immunol.* 2015;109: 1-10.
105. Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, Hoshino K, Takeda K, Dong Z, Modlin RL, Akira S. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol.* 2002; 169(1):10-4.
106. Takeuchi Y, Nishikawa H; Roles of regulatory T cells in cancer immunity, *International Immunology* 2016; 28(8): 401-409.
107. Talaat RM, Sidek A, Mosalem A, Kholief A. Effect of bisphosphonates treatment on cytokine imbalance between TH17 and Treg in osteoporosis. *Inflammopharmacology.* 2015; 23(2-3):119-25.
108. Tie Y, Tang F, Wei YQ, Wei XW. Immunosuppressive cells in cancer: mechanisms and potential therapeutic targets. *J Hematol Oncol.* 2022; 15(1):61.
109. Touch S, Godefroy E, Rolhion N, Danne C, Oeuvray C, Straube M, Galbert C, Brot L, Alonso Salgueiro I, Chadi S, Ledent T, Chatel JM, Langella P, Jotereau F, Altare F, Sokol H. Human CD4+CD8 α + Tregs induced by *Faecalibacterium prausnitzii* protect against intestinal inflammation. *JCI Insight.* 2022; 7(12):e154722.
110. Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E. Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab.* 2021; 39(1):19-26.
111. Van Maren WWC, Jacobs JFM, de Vries IJM, Nierkens S, Adema GJ. Toll-like receptor signalling on Tregs: to suppress or not to suppress? *Immunol.* 2008; 124:445-452.

112. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8:523-32.
113. Wang L, Yang F, Qiu Y, Ye L, Song D, Huang D. The Potential Roles of T Cells in Periapical Lesions. *J Endod.* 2022; 48(1):70-79.
114. Wei S, Kawashima N, Suzuki N, Xu J, Takahashi S, Zhou M, Koizumi Y, Suda H. Kinetics of Th17-related cytokine expression in experimentally induced rat periapical lesions. *Aust Endod J.* 2013; 39(3):164-70.
115. Wright HL, McCarthy HS, Middleton J, Marshall MJ. RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Curr Rev Musculoskelet Med.* 2009; 2(1):56-64.
116. Xiao Q, Li X, Li Y, Wu Z, Xu C, Chen Z, He W. Biological drug and drug delivery-mediated immunotherapy. *Acta Pharm Sin B.* 2021; 11(4):941-60.
117. Yang BH, Hagemann S, Mamareli P, Lauer U, Hoffmann U, et al. Foxp3(+) T cells expressing ROR γ t represent a stable regulatory T-cell effector lineage with enhanced suppressive capacity during intestinal inflammation. *Mucosal Immunol.* 2016; 9(2):444-57.
118. Yang S, Zhu L, Xiao L, Shen Y, Wang L et al. Imbalance of interleukin-17+ T-cell and Foxp3+ regulatory T-cell dynamics in rat periapical lesions. *J Endod.* 2014; 40(1):56-62.
119. 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. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95(7):3597-602.
120. Yi H, Zhen Y, Jiang L, Zheng J, Zhao Y. The phenotypic characterization of naturally occurring regulatory CD4+CD25+ T cells. *Cell Mol Immunol.* 2006; 3(3):189-95.
121. Yu M, D'Amelio P, Tyagi AM, Vaccaro C, Li JY, et al. Regulatory T cells are expanded by Teriparatide treatment in humans and mediate intermittentPTH-induced bone anabolism in mice. *EMBO Rep.* 2018; 19(1):156-71.
122. Zeng Q, Liu W, Luo R, Lu G. MicroRNA-181a and microRNA-155 are involved in the regulation of the differentiation and function of regulatory T cells in allergic rhinitis children. *Pediatr Allergy Immunol.* 2019; 30(4):434-442.
123. Zhuo C, Xu Y, Ying M, Li Q, Huang L, Li D, Cai S, Li B. FOXP3+ Tregs: heterogeneous phenotypes and conflicting impacts on survival outcomes in patients with colorectal cancer. *Immunol Res.* 2015; 61(3):338-47.

124. Zou J, Zeng Z, Xie W, Zeng Z. Immunotherapy with regulatory T and B cells in periodontitis. *Int Immunopharmacol.* 2022; 109:108797.

ANEXO

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “**Análise Microscópica e Molecular do Papel dos Linfócitos T Regulatórios em Lesões Periapicais Induzidas experimentalmente em Camundongos Wild-Type e Knockout**”, Protocolo nº 2018.1.778.58.2, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto (CEUA/FORP) em 12/12/2018.

Vigência do Projeto	01/01/2019 a 07/02/2022	
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico / c57BL-6	Camundongo <i>Knockout</i> / TLR2/KO
Nº de animais	60	60
Peso/Idade	20g / 6-8 semanas	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central – PUSP-RP / Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP	

Ribeirão Preto, 12 de dezembro de 2018.

Prof. Dr. Michel Reis Messora

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais