



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



**LUCIANO APARECIDO DE ALMEIDA JUNIOR**

**A SINALIZAÇÃO TNF-ALFA-TNFR1 REGULA DIFERENCIALMENTE  
A PERDA ÓSSEA PERIAPICAL E A NEOFORMAÇÃO DENTINÁRIA  
EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO**



**Ribeirão Preto**

**2023**

**LUCIANO APARECIDO DE ALMEIDA JUNIOR**

**A SINALIZAÇÃO TNF-ALFA-TNFR1 REGULA DIFERENCIALMENTE  
A PERDA ÓSSEA PERIAPICAL E A NEOFORMAÇÃO DENTINÁRIA  
EM MODELO EXPERIMENTAL MURINO**

VERSÃO CORRIGIDA

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

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

ORIENTADOR: PROF. DR. FRANCISCO WANDERLEY GARCIA DE PAULA E SILVA

**Ribeirão Preto**

**2023**

## **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-Júnior, Luciano Aparecido

A sinalização tnf-alfa-tnfr1 regula diferencialmente a perda óssea periapical e a neoformação dentinária em modelo experimental murino / Luciano Aparecido de Almeida Junior; Orientador, Francisco Wanderley Garcia De Paula e Silva. 2023.

93p.: 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. Fator de necrose tumoral. 2. TNFR1. 3. Periodontite Periapical. 4. Inflamação. 4. Proteção Pulpar Direta.



A referida tese foi desenvolvida nos seguintes laboratórios:

- Laboratório de Biologia Molecular e Cultura de Células, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
- Laboratório de Histologia, do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
- Laboratório de Microtomografia Computadorizada de Endodontia “Prof. Dr. Manoel Damião de Sousa Neto”, do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.
- Biotério I da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - FORP/USP

## FOLHA DE APROVAÇÃO

---

Almeida-Junior LA. **A sinalização tnf-alfa-tnfr1 regula diferencialmente a perda óssea periapical e a neoformação dentinária em modelo experimental murino.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor 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 \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva – Orientador e Presidente da Banca Examinadora

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **DADOS CURRICULARES**

---

### **LUCIANO APARECIDO DE ALMEIDA JUNIOR**

- Nascimento** 25 de março de 1995 – Alfenas/MG
- Filiação** Luciano Aparecido de Almeida  
Eliane Esteves
- 2013-2016** Graduação em Odontologia  
Universidade José do Rosário Vellano - Unifenas
- 2017-2020** Especialização em Ortodontia  
Faculdade Unidas do Norte de Minas - FUNORTE
- 2017-2019** Mestrado em Ciências Odontológicas  
Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL
- 2019-2022** Docente do curso de extensão: “Estudos experimentais em diferenciação de células formadoras do dente e tecidos de suporte”  
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

## DEDICATÓRIA

---

A Deus, Nossa Senhora Aparecida, Santa Apolônia, São Bento e Santa Edwiges que estão presentes em minhas orações. Que nesta trajetória me abençoaram e continuam me abençoando sempre. A fé me permitiu chegar até este momento. Na alegria e tristeza, as orações que me fazem sentir a presença do divino em minha vida.

Aos meus pais, **Eliane Esteves e Luciano Aparecido de Almeida**, pelo apoio incondicional das minhas escolhas, carinho, amor, companheirismo. A união entre a família é o mais sagrado aqui na Terra. Fico muito feliz por vocês serem meu porto seguro, minha razão pela qual estou conseguindo alcançar meus objetivos. Mesmo em outra cidade, continuamos unidos. Muito obrigado por tudo que fizeram e continuam fazendo por mim.

Aos meus avôs **Vicente de Paula Esteves (in memoriam) e Manoel Messias de Almeida (in memoriam)**, e minhas avós **Maria Zélia Tercetti Esteves e Maria José César de Almeida** por todas as orações, torcida e dedicação na criação do seu neto.

Às **crianças e pacientes**, por me fazer acreditar na pureza do ser humano e me despertar a cada dia mais a busca por conhecimento na área da Odontopediatria.

**Dedico esta conquista a todos vocês!**

**Muito obrigado!**

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

---

Agradeço ao Prof. Dr. **Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**, por ter me acolhido como seu orientado e me ensinado tantas coisas na vida profissional e pessoal. Não tenho palavras para descrever a gratidão que tenho. Obrigado professor, pela sua atenção, dedicação, paciência, amor pela profissão e seus ensinamentos.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. **Raquel Assed Bezerra Segato**, coordenadora do programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da FORP-USP, que me recepcionou de maneira afetuosa nesta instituição.

Ao Prof. Dr. **Paulo Nelson Filho**, diretor da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pelos ensinamentos e ajuda nos momentos que necessitei.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. **Marília Pacífico Lucisano**, por sempre estar à disposição a me ajudar, pela atenção, carinho e respeito. Muito obrigado professora.

À Prof.<sup>a</sup> Dra. **Léa Assed Bezerra da Silva**, pelos ensinamentos proporcionados durante meu Doutorado.

À minha madrinha **Valéria Aparecida Fernandes**, que sempre preocupou com meu bem-estar, e me coloca em suas orações. Além de sua Mãe, **Silvinha**, e suas irmãs **Aline** e **Natália** que torcem por mim todos os dias e acreditam em meu potencial.

Aos meus afilhados **Samuel** e **Henrique**, por estarem comigo sempre, com a recepção de um abraço caloroso todas as vezes que me encontram. O padrinho ama vocês.

Aos **meus amigos e familiares**, que sempre me escutaram, estavam do meu lado e me confortaram em muito das vezes. Criei grandes amigos durante todo este período.



## **AGRADECIMENTOS**

---

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 **Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Raquel Assed Bezerra Segato** e aos secretários **Mary Carmessano, Filomena Placciti, Matheus Zanela**.

Aos técnicos e amigos de laboratório, **Marco Antônio, Nilza e Arlete**, por todos os momentos, trabalhos em que realizamos juntos, as risadas, e por ouvirem minhas lamentações. Muito obrigado, este trabalho não aconteceria sem vocês.

Aos **professores da disciplina de Odontopediatria** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Às minhas amigas **Lana, Lisa, Giuliana, Juliana, Fernanda, Carol, Larissa e Julia**, pelo companheirismo, apoio, risadas, apoio que vivenciamos. Muito obrigado meninas.

Aos **funcionários do Departamento de Clínica Infantil** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto.

Ao **Instituto Marcelo Pedreira**, que compreensivelmente, permitiu que conseguisse conciliar o Doutorado e a especialização em Ortopedia Funcional dos Maxilares.

À Prof.<sup>a</sup>. Dra. **Maria Bernadete Sasso Stuani**, pela disponibilidade do microscópio para que este trabalho pudesse ser concluído.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida. Processo nº2019/02432-1.

O presente trabalho foi realizado com apoio da **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001**.

À **todas as pessoas** que de alguma maneira abrilhantaram durante este período com seu apoio, orações e atenção.

Muito obrigado a todos vocês, tudo isso só foi possível pelo apoio de cada um citado aqui.

Almeida-Junior, LA. **A sinalização tnf-alfa-tnfr1 regula diferencialmente a perda óssea periapical e a neoformação dentinária em modelo experimental murino.** Ribeirão Preto, 2023. 93p. [Tese de Doutorado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo; 2023.

## RESUMO

O fator de necrose tumoral-alfa é uma citocina pró-inflamatória relacionada a destruição óssea de algumas doenças inflamatórias. Quando se liga aos seus receptores TNFR1 e TNFR2, possui funções distintas de inflamação e apoptose celular ou controle da inflamação e hemostasia, respectivamente. Dessa maneira, o objetivo geral deste estudo foi investigar o papel do TNF- $\alpha$  na inflamação, no desenvolvimento da lesão periapical e no reparo pulpar utilizando como modelo experimental camundongos geneticamente deficientes do receptor-1 do mediador (TNFRSF1- *Knockout*) comparativamente a animais selvagens (C57BL6 – *Wild-Type*). Para o estudo da lesão periapical foram utilizados cem camundongos, 50 animais *Knockout* e 50 animais *Wild-type*. Após anestesia o tecido pulpar foi exposto ao ambiente bucal para contaminação microbiana por 7, 14, 28 e 42 dias. No reparo pulpar, quarenta camundongos foram utilizados, 20 animais *knockout* e 20 animais *Wild-Type*. Após a anestesia foi realizado uma exposição pulpar e posteriormente a proteção pulpar direta com MTA e acompanhado por 7 e 70 dias. Após a eutanásia dos animais, os blocos contendo dente e osso foram utilizados para avaliação microtomográfica, histopatológica, histomorfométrica, histomicrobiológica, número de osteoclastos, RT-PCR e imunohistoquímica. A lesão periapical foi caracterizada pelo amplo espaçamento do ligamento periodontal e recrutamento de células inflamatórias. A ausência do TNFR1 conteve a formação da lesão periapical no período de 42 dias ( $p < 0,05$ ). O número de neutrófilos foi menor aos 14, 28 e 42 dias nos animais *Knockout* ( $p < 0,05$ ). A ablação do TNFR1 resultou na menor formação de osteoclastos aos 14 e 42 dias ( $p < 0,05$ ), menor expressão de *Rankl* ( $p < 0,0001$ ) e a expressão de *Opg* foi reduzida aos 28 dias ( $p < 0,0001$ ). A razão *Rankl/Opg* foi favorável a reabsorção aos 7 e 42 dias nos *Wild-Type* ( $p < 0,0001$ ). Na falta do TNFR1 a expressão de RNAm para *Tnf- $\alpha$*  se mostrou menor aos 7 e 28 dias ( $p < 0,0001$ ), em consonância, a expressão de *Mmp9*, *Ctsk* e *Ptsg2* foi menor aos 7 ( $p < 0,0001$ ). A neoformação de tecido mineralizado foi limitada nos animais *knockout* aos 70 dias ( $p < 0,0001$ ). Os animais *Knockout* desenvolveram necrose pulpar e lesão periapical aos 70 dias ( $p < 0,0001$ ), além de, maior recrutamento de neutrófilos ( $p = 0,0003$ ). A falta do TNFR1 ocasionou menor marcação para o TNF- $\alpha$  aos 7 e 70 dias ( $p < 0,05$ ), conseqüentemente, menor síntese dos marcadores de mineralização DSP ( $p = 0,0003$ ) e OPN ( $p = 0,0289$ ). A ausência da ligação do TNF- $\alpha$ /TNFR1 conteve o desenvolvimento da lesão periapical e diminuiu a expressão de genes relacionados ao catabolismo ósseo desde os períodos iniciais da lesão periapical. No reparo pulpar, a falta do TNFR1 limitou a formação de tecido mineralizado, se mostrou com um maior processo inflamatório do tecido pulpar que gerou necrose pulpar e desenvolvimento da lesão periapical.

**Palavras-chave:** Fator de necrose tumoral, TNFR1, Periodontite Periapical, Inflamação, Proteção Pulpar Direta.

Almeida-Junior, LA. **Tnf-alpha-tnfr1 signaling differentially regulates periapical bone loss and neoformation dentin in a murine experimental model.** Ribeirão Preto, 2023. 93p. [Doctoral Thesis]. Ribeirão Preto: Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo; 2023.

## ABSTRACT

Tumor necrosis factor-alpha is a pro-inflammatory cytokine related to bone destruction of some inflammatory diseases. When it binds to its TNFR1 and TNFR2 receptors, it has distinct functions of cell inflammation and apoptosis or inflammation control and hemostasis, respectively. Thus, the general objective of this study was to investigate the role of TNF- $\alpha$  in inflammation, in the development of periapical lesion and in pulpal repair using mice genetically deficient in mediator receptor-1 (TNFRSF1- Knockout) as an experimental model compared to wild animals. (C57BL6 – Wild-Type). For the study of the periapical lesion, one hundred mice, 50 Knockout animals and 50 Wild-type animals were used. After anesthesia, the pulp tissue was exposed to the oral environment for microbial contamination for 7, 14, 28 and 42 days. For pulp repair, forty mice were used, 20 knockout animals and 20 wild-type animals. After anesthesia, pulp exposure was performed and later direct pulp protection with MTA was performed and followed up for 7 and 70 days. After the euthanasia of the animals, the blocks containing tooth and bone were used for microtomographic, histopathological, histomorphometric, histomicrobiological evaluation, number of osteoclasts, RT-PCR and immunohistochemistry. The periapical lesion was characterized by wide spacing of the periodontal ligament and recruitment of inflammatory cells. The absence of TNFR1 contained periapical lesion formation within 42 days ( $p < 0.05$ ). The number of neutrophils was lower at 14, 28 and 42 days in Knockout animals ( $p < 0.05$ ). TNFR1 ablation resulted in lower osteoclast formation at 14 and 42 days ( $p < 0.05$ ), lower Rankl expression ( $p < 0.0001$ ) and Opg expression was reduced at 28 days ( $p < 0.0001$ ). The RANKL/OPG ratio was favorable to reabsorption at 7 and 42 days in Wild-Type ( $p < 0.0001$ ). In the absence of TNFR1, the expression of mRNA for Tnf- $\alpha$  was lower at 7 and 28 days ( $p < 0.0001$ ), accordingly, the expression of Mmp9, CtsK and Ptsg2 was lower at 7 ( $p < 0.0001$ ). The neoformation of mineralized tissue was limited in knockout animals at 70 days ( $p < 0.0001$ ). Knockout animals developed pulpal necrosis and periapical lesion at 70 days ( $p < 0.0001$ ), in addition to greater recruitment of neutrophils ( $p = 0.0003$ ). The lack of TNFR1 led to lower marking for TNF- $\alpha$  at 7 and 70 days ( $p < 0.05$ ), consequently, lower synthesis of mineralization markers DSP ( $p = 0.0003$ ) and OPN ( $p = 0.0289$ ). The absence of TNF- $\alpha$ /TNFR1 binding contained the development of the periapical lesion and decreased the expression of genes related to bone catabolism from the early stages of the periapical lesion. In the pulp repair, the lack of TNFR1 limited the formation of mineralized tissue, it was shown with a greater inflammatory process of the pulp tissue that generated pulp necrosis and development of the periapical lesion.

**Keywords:** Tumor Necrosis Factors, TNFR1, Periapical Periodontitis, Inflammation, Dental Pulp Capping

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
<b>2. CAPÍTULO 1.....</b>	<b>20</b>
<b>A Ausência do TNFR1 Impede a Resposta Inflamatória Inicial e o Desenvolvimento da Lesão Periapical In Vivo .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1 Proposição.....</b>	<b>23</b>
2.1.1 Objetivo Geral .....	23
2.1.2 Objetivos Específicos.....	23
<b>2.2 Material e Métodos.....</b>	<b>24</b>
2.2.1 Animais.....	24
2.2.2 Indução da Lesão Periapical.....	25
2.2.3 Processamento histotécnico das amostras.....	26
2.2.3.1 Avaliação Histopatológica e Histomorfométrica da Lesão Periapical.....	27
2.2.3.2 Recrutamento de Neutrófilos Polimorfonucleares na Região Periapical .....	28
2.2.3.3 Determinação da Presença de Osteoclastos por Meio de Histoenzimologia para Atividade da Enzima Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) .....	28
2.2.3.4 Análise Histomicrobiológica .....	28
2.2.3.5 Imunohistoquímica.....	29
2.2.4 Microtomografia Computadorizada .....	30
2.2.5 Avaliação da Expressão Gênica por Transcrição Reversa e Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qRT-PCR) .....	31
2.2.6 Análise Estatística .....	32
<b>2.3 RESULTADOS .....</b>	<b>33</b>
2.3.1 A Ausência do Receptor TNFR1 Limita a Formação da Lesão Periapical aos 42 Dias .....	33
2.3.2 A Contaminação Por Micro-Organismos Foi de Maneira Semelhante em Ambos os Grupos Ocasionalmente a Formação da Lesão Periapical .....	36
2.3.3 A Presença e Atividade dos Osteoclastos é Reduzido nos Animais Geneticamente Modificados Para TNFR1 .....	37
2.3.4 O TNF Influencia no Processo Inflamatório e na Reabsorção Óssea Periapical Desde os Períodos Iniciais da Lesão Periapical .....	42

<b>2.4 Discussão .....</b>	<b>51</b>
<b>2.5 Conclusão .....</b>	<b>54</b>
<b>3. CAPÍTULO 2.....</b>	<b>55</b>
<b>A Ausência de Ligação Eixo TNF-<math>\alpha</math>/TNFR1 Impede o Processo da Neoformação Dentinária .....</b>	<b>56</b>
<b>3.1 Proposição .....</b>	<b>59</b>
3.1.1 Objetivo Geral .....	59
3.1.2 Objetivos Específicos.....	59
<b>3.2 Material e Métodos.....</b>	<b>60</b>
3.2.1 Animais.....	60
3.2.2 Proteção Pulpar Direta .....	61
3.2.3 Processamento Histotécnico das Amostras .....	62
3.2.3.1 Avaliação Histopatológica e Histomorfométrica .....	63
3.2.3.2 Recrutamento de Neutrófilos Polimorfonucleares na Polpa e Região Periapical.....	63
3.2.3.3 Análise Histomicrobiológica .....	64
3.2.3.4 Imunohistoquímica.....	64
3.2.4 Análise Estatística .....	65
<b>3.3 Resultados.....</b>	<b>66</b>
3.3.1 A Neoformação de Tecido Mineralizado foi Limitada na Ausência do TNFR1 .....	66
3.3.2 A Ausência do Receptor 1 do TNF Ocasinou a Formação da Lesão Periapical Caracterizado Pelo Recrutamento de Células Inflamatórias, em Ambiente Livre de Contaminação Bacteriana.....	67
3.3.3 A Ablação do TNF-TNFR1 Reduz a Produção de Marcadores Associados Mineralização...70	
<b>3.4 Discussão .....</b>	<b>73</b>
<b>3.5 Conclusão .....</b>	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>78</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>90</b>
ANEXO A - Comissão de Ética no Uso de Animais.....	90
ANEXO B - Comissão Interna de Biossegurança .....	93

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1. INTRODUÇÃO

A polpa dentária é um tecido de origem mesenquimal oriundo da crista neural que está localizada no interior da câmara pulpar e no canal radicular (Shah et al., 2020; Galler et al., 2021). É composta por tecido conjuntivo frouxo com células pulpares (Odontoblastos, fibroblastos e células de defesa – macrófagos, histiócitos, células dendríticas e linfócitos T, células de Schwann e células vasculares / perivasculares), fibras de colágeno, matriz extracelular, nervos e vasos sanguíneos e apresenta capacidade de defesa frente a injúrias microbianas, químicas, físicas, mecânicas ou térmicas que afetam o tecido pulpar (Paula-Silva et al., 2009a; Cooper et al., 2014; Goldberg e Hirata, 2017; Shah et al., 2020; Galler et al., 2021). A resposta pulpar irá depender da duração, intensidade e profundidade da penetração bacteriana, podendo iniciar o processo de reparo com uma reação inflamatória (Shah et al., 2020).

O processo de neoformação dentinária é coordenado primariamente pelos odontoblastos, células que apresentam como função primária a deposição de tecido mineralizado. Estas células representam estruturas sensoriais importantes do tecido pulpar, ao detectar a agressão para, em seguida, sinaliza de modo parácrino o início da resposta imune (Couve e Osório, 2013; Bleicher, 2014; Cooper et al., 2014). Em quadros pulpares inflamatórios mais intensos, a deposição de dentina reacional pelos odontoblastos pode ser cessada e a neoformação dentinária passa ser realizada por células-tronco que migram do interior da polpa dental para a extremidade (Bleicher, 2014; Cooper et al., 2014). Por meio da modificação do micro-ambiente, estas células têm seu comportamento e potencial de diferenciação afetados. Diante da necrose e/ou apoptose de odontoblastos, as células mesenquimais indiferenciadas são capazes de sofrer diferenciação em células semelhantes a odontoblastos, as quais passam a secretar matriz dentinária sob a forma de dentina reparadora (Chmilewsky et al., 2014; Emilia e Neelakantan, 2015; Xu et al., 2018).

Durante a resposta imunoinflamatória do tecido pulpar ocorre também o recrutamento de células de defesa de origem hematopoiética. As células de defesa atravessam a barreira endotelial e atingem o local da injúria tecidual com o intuito de eliminar o agente agressor e propiciar um ambiente adequado para o restabelecimento da homeostase (Farges, 2013; Goldberg e Hirata, 2017). De modo geral, o processo de reparo ocorre por meio do adequado suprimento sanguíneo e de células inflamatórias finamente coordenadas por citocinas, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular e outras moléculas biologicamente ativas (Paula-Silva et al., 2009a; Bleicher, 2014; Bakhtiar et al., 2018; Goldberg, 2018; Giraud et al., 2019).



Um aspecto interessante e peculiar às células mesenquimais indiferenciadas (células-tronco) da polpa dentária e da região periapical é a sua plasticidade, uma vez que apresentam capacidade de autorrenovação, diferenciação, multilinhagem e produção de estruturas mineralizadas, além de propriedades antiinflamatórias e imunorregulatórias (Araújo-Pires et al., 2014a; Li et al., 2014; Ding et al., 2015; Mezey e Nemeth et al., 2015). Dessa forma, o tecido pulpar se revela um ambiente com ampla capacidade de reparo, especialmente por apresentar células progenitoras e síntese de moléculas sinalizadoras pró-reparo tecidual, mesmo em sítios inflamados (Gronthos et al., 2000; Chmilewsky et al., 2014).

Todavia, quando a capacidade de defesa da polpa dentária é vencida e ocorre a necrose tecidual, o canal radicular se torna contaminado por micro-organismos advindos da cavidade bucal, resultando no desenvolvimento da lesão periapical. A lesão periapical representa uma resposta imunoinflamatória localizada contra os micro-organismos advindos do interior dos canais radiculares (Stashenko et al., 1991; Stashenko, Teles e D'Souza, 1998; Nair, 1997; Nair, 2004; Marton e Kiss, 2014). É definida como inflamação e destruição do periodonto apical proveniente do tecido pulpar, clinicamente se observa como uma área radiolúcida no ápice radicular sendo assintomático (American Association of Endodontists, 2020). Essa lesão é caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório misto, composto por neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos e plasmócitos, dependendo do estágio da doença (Kabak et al., 2005; Paula-Silva et al., 2009b; Braz-Silva et al., 2019; Figueredo et al., 2018; Weber et al., 2018). A resposta inflamatória não-controlada na região periapical leva à reabsorção de tecidos mineralizados ao redor do dente (Paula-Silva et al., 2010a; Marton e Kiss, 2014).

A reabsorção óssea se inicia com a osteoclastogênese, um processo que envolve a proliferação de células precursoras de osteoclastos advindas de monócitos da linhagem hematopoiética, seguido pela diferenciação e maturação celular. Os osteoclastos ativos produzem enzimas proteolíticas e prótons que levam à degradação da matriz orgânica colagênica e solubilização do conteúdo inorgânico do tecido ósseo (Gallagher, 2008; Paula-Silva et al., 2009c; Paula-Silva et al., 2010a; Boyce, 2013). Esse processo é controlado pelo receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), pelo seu ligante (RANKL) e pela osteoprotegerina (OPG), membros da superfamília do fator de necrose tumoral. Sucintamente, o receptor RANK é expresso na superfície dos osteoclastos e seus precursores e células dendríticas (Lener, 2004; Boyce, 2013). O mediador solúvel RANKL, que ativa os osteoclastos, é sintetizado por osteoblastos, células do sistema imune e células endoteliais (Leibbrandt e Penninger, 2008). A OPG é um receptor solúvel que se liga ao RANKL e impede sua ligação ao

receptor RANK, inibindo a diferenciação e a atividade de osteoclastos (Belibasakis et al., 2013; Kang et al., 2014).

Tanto durante a resposta inflamatória pulpar, como durante o desenvolvimento da lesão periapical, diversos mediadores bioquímicos são liberados localmente com o objetivo de estimular a resposta imune inata e adaptativa (Cotti et al., 2014; Rechenberg et al., 2016; Hirsch et al., 2017). Trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa, demonstraram que duas vias de metabolismo do ácido araquidônico, ciclo-oxigenase e lipoxigenase, estão envolvidas na perda óssea (Paula-Silva et al., 2016; Ribeiro-Santos et al., 2019; Ribeiro-Santos et al., 2021; Lorencetti-Silva et al., 2022). Entretanto, as tentativas no sentido de controlar a reabsorção utilizando medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais não mostrou bons resultados (Petean et al., 2021). Por outro lado, Paula-Silva et al., (2009a) demonstraram *in vitro* que o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induz um fenótipo odontoblástico em células indiferenciadas da polpa dentária e posterior mineralização. Assim, neste estudo o foco será o TNF- $\alpha$ , uma citocina que é supra-regulada tanto durante a inflamação do tecido pulpar como na lesão periapical (Kawashima e Stashenko, 1999; Prso et al., 2007; Garlet et al., 2012; Araújo-Pires et al., 2014b; Rechenberg et al., 2016; Hirsch et al., 2017; Nokolic et al., 2019).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória associada a perda óssea em uma variedade de doenças inflamatórias, além de estimular prostaglandinas e síntese de protease por diversos tipos celulares incluindo fibroblastos e osteoblastos (Pezelj-Ribaric et al., 2007; Xu et al., 2018). Esta citocina é um mediador solúvel e sintetizado por macrófagos e outros tipos celulares imunocompetentes, seu papel é regular e coordenar alguns processos celulares que estão relacionado a resposta imune durante uma infecção (Idriss e Naismith, 2000; Prso et al., 2007). Além de ativar os leucócitos como linfócitos T e B, macrófagos e células NK, outros efeitos biológicos podem ser coordenados pelo TNF- $\alpha$  como indução de febre, regulação do sono, liberação de proteínas na fase aguda, citocinas e quimiocinas e ativação de células endoteliais (Kawashima e Stashenko, 1999; Prso et al., 2007). Os seus receptores de membrana são o TNFR1 ou P-55 / TNFR2 ou P-75 (Idriss e Naismith, 2000; Tacchini-Cottier et al., 1998). A maior parte dos efeitos antimicrobianos e pró-inflamatórios do TNF- $\alpha$  é mediada pelo receptor 1 (p55; TNFRSF1) (Peschon et al., 1998).

A citocina TNF- $\alpha$  foi descrita pela primeira vez por Carswell et al., 1975, ao qual, observou uma proteína capaz de ocasionar uma rápida diminuição em células necróticas de tumores, que foi denominado "Fator de Necrose Tumoral". Seu isolamento e caracterização foi realizado somente em 1984 (Holbrook et al., 2019). Este nome é abrangente aos dois tipos existentes de TNF, o TNF- $\alpha$  e a linfotóxina ou denominado TNF- $\beta$  (Idriss e Naismith, 2000). Está presente na forma solúvel e transmembrana, ao qual, o TNF transmembrana é a forma

inicial com 233 aminoácidos e necessita de uma enzima conversora de TNF (TACE) para ocasionar a liberação ao meio solúvel, composto por 157 aminoácidos (Holbrook et al., 2019; Jang et al., 2021). Quando se liga aos seus receptores TNFR1 (TNFRSF1A, CD120a e p55) e TNFR2 (TNFRSF1B, CD120b e p75) participa de diversos processos biológicos (Jang et al., 2021). O TNF transmembrana se liga principalmente no TNFR2, sendo que, possui uma capacidade de produzir respostas mais potentes do que o TNF solúvel (Holbrook et al., 2019). Estudos prévios demonstram a presença desta citocina em diversas respostas inflamatórias e na lesão periapical (Kawashima e Stashenko, 1999; Prso et al., 2007; Garlet et al., 2012; Araújo-Pires et al., 2014b; Nikolic et al., 2019), e também em estudos *in vitro* promovem um fenótipo de mineralização, favorecendo a proliferação, migração e diferenciação de células mesenquimais (Paula-Silva et al., 2009a; El Karim et al., 2015; Shi et al., 2017, Xu et al., 2018; Zhang et al., 2018). Sendo assim, decidimos avaliar *in vivo* os efeitos da ausência do eixo TNF- $\alpha$  via TNFR1 no processo de lesão periapical e no reparo pulpar.

## 2. CAPÍTULO 1

---

## 2. CAPÍTULO 1

### **A Ausência do TNFR1 Impede a Resposta Inflamatória Inicial e o Desenvolvimento da Lesão Periapical *In Vivo***

A lesão periapical é caracterizada por uma resposta imunoinflamatória delimitada contra os micro-organismos provenientes do interior dos canais radiculares, que por sua vez, podem em casos mais severos ocasionar a destruição de tecidos mineralizados ao redor do dente (Stashenko et al., 1991; Stashenko, Teles e D'Souza, 1998; Marton e Kiss, 2014; American Association of Endodontists, 2020; Paula-Silva et al., 2020a; Galler et al., 2021). Essa lesão é caracterizada pela presença de um infiltrado inflamatório misto, composto por neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos e plasmócitos, dependendo do estágio da doença (Paula-Silva et al., 2009b; Braz-Silva et al., 2019; Figueredo et al., 2018; Weber et al., 2018). O recrutamento dessas células inflamatórias se inicia através da liberação de quimiocinas e citocinas como as Interleucinas e Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Rechenberg et al., 2016; Hirsch et al., 2017; Paula-Silva et al., 2020a). A prevalência global da lesão periapical realizada em uma meta-análise foi de 52% (Tibúrcio-Machado et al., 2021), e na literatura pode variar entre 16% a 86% com lesão periapical em ao menos 1 dente (Tibúrcio-Machado et al., 2021; Al-Zahrani et al., 2017; Skudutyte-Rysstad e Eriksen, 2006).

O processo de reabsorção óssea é derivado da osteoclastogênese, que é controlado pelo sistema RANK, RANKL e OPG, membros da superfamília do TNF (Paula-Silva et al., 2010a; Boyce, 2013; Petean et al., 2021). Foi constatado que durante o processo da osteoclastogênese há um sinergismo entre o RANKL e o TNF- $\alpha$ , ao qual, o TNF- $\alpha$  pode atuar como um possível indutor na diferenciação de osteoclastos. Resumidamente este processo ocorre em três etapas: a primeira etapa ocorre o comprometimento celular com o fenótipo osteoclástico depois do contato ao RANKL, na segunda etapa, essas células serão expostas a agentes bacterianos resultando na liberação de citocinas e na terceira etapa o desfecho em que o TNF- $\alpha$  induza a osteoclastogênese de maneira autócrina/parácrina independente do RANKL (AlQranei e Chellaiah, 2020). Na segunda etapa estudos em camundongos relatam que a lesão periapical pode ser induzida por Lipopolissacarídeos (LPS) ou bactérias da própria cavidade bucal (Ribeiro-Santos et al., 2019; Paula-Silva et al., 2020b).

O TNF- $\alpha$  é uma importante citocina pró-inflamatória que está envolvida no processo de perda óssea (Xu et al., 2018). É sintetizado por macrófagos e outros tipos celulares imunocompetentes, e seu papel é regular e coordenar alguns processos celulares que estão relacionados a resposta imune durante uma inflamação (Gamrot et al., 2021). Possui dois tipos

de receptores principais que são o TNFR1 ou P-55 e TNFR2 ou P-75 (Tacchini-Cottier et al., 1998; Gamrot et al., 2021). O TNFR1 é expresso em quase todas as células existentes e possui sua forma trimétrica antes da estimulação pelo TNF- $\alpha$ . De acordo com a via em que desencadeia, promove diferentes respostas celulares como sinais citotóxicos, respostas inflamatórias, regulação de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão e outros receptores, além de induzir migração de neutrófilos (Kitaura et al., 2022). Estudos relatam que este receptor possui a maior parte dos efeitos antimicrobianos e pró-inflamatórios do TNF- $\alpha$ , além da resposta imune para combater a infecção (Zhang; Wanga e Zhao, 2020; Kitaura et al., 2022).

A expressão de TNFR2 é limitada comparado a expressão do TNFR1, que é encontrado em todas as regiões. O TNFR2 está presente em células endoteliais, células-tronco mesenquimais e células imunes, como macrófagos, monócitos, células T, células B, células NK e células neurais (Yang et al., 2018; Beldi et al., 2020; Shamdani et al., 2020; Kitaura et al., 2022). Seus efeitos ao contrário do TNFR1, estão envolvidos com proliferação, ativação e sobrevivência celular, induz apoptose e pode aumentar a morte celular mediado pelo TNFR1 (Kitaura et al., 2022).

É interessante ressaltar que alguns estudos citam o importante papel do TNFR1 no combate a infecções bacterianas e virais enquanto que o TNFR2 está envolvido na resposta de infecções virais (Wroblewski et al., 2016; Chen et al., 2016). No tecido ósseo, o TNF- $\alpha$  foi identificado em lesões periapicais experimentais e em humanos, principalmente naquelas lesões que se apresentam mais ativas, com maior expressão de RANKL (Kawashima e Stashenko, 1999; Prso et al., 2007; Garlet et al., 2012; Araújo-Pires et al., 2014b; Nikolic et al., 2019). Embora o papel do TNF- $\alpha$  na lesão periapical tenha sido descrito anteriormente (Safavi e Rossomando, 1991; Salles et al., 2017; Castro et al., 2023), o papel da ativação do receptor foi pouco explorado. Recentemente, o receptor TNFR1 demonstrou mediar a reabsorção dentária e óssea na infecção endodôntica (Carvalho et al., 2022), no entanto, os mediadores celulares e moleculares envolvidos neste processo ainda não foram investigados.

Sendo assim, como a lesão periapical é bastante prevalente na população, o mecanismo que está associado a doença ainda é discutido pela comunidade científica e o TNF- $\alpha$  pode estar associado ao processo inflamatório e de reabsorção óssea das lesões periapicais, decidimos estudar o papel desta citocina na resposta inflamatória na ausência do TNFR1, visto que, quando se inibe o receptor 1 podemos preservar a função reguladora do TNFR2 minimizando os efeitos colaterais que podem estar associados ao TNF- $\alpha$ .

## 2.1 PROPOSIÇÃO

### 2.1.1 *Objetivo Geral*

O objetivo geral do presente estudo foi investigar o papel do TNF- $\alpha$  na inflamação e no desenvolvimento da lesão periapical, utilizando como modelo experimental camundongos geneticamente deficientes do receptor-1 do mediador (TNFRSF1) comparativamente a animais selvagens (C57BL6).

### 2.1.2 *Objetivos Específicos*

- a) Mensurar a área correspondente a lesão periapical por meio de microtomografia computadorizada e microscopia de fluorescência, após a indução da formação da lesão periapical;
- b) Investigar o grau de inflamação dos tecidos por meio da quantificação de neutrófilos em microscopia óptica na lesão periapical;
- c) Marcar e Quantificar os osteoclastos nas superfícies ósseas por Meio de Histoenzimologia para Atividade da Enzima Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP) na lesão periapical;
- d) Avaliar a expressão gênica por RT-PCR e protéica por Imunohistoquímica para mediadores de TNF- $\alpha$ , RANK, RANKL, OPG, MMP9, Catepsina K, Ciclo-oxigenase-2, que estão envolvidos no processo do desenvolvimento da lesão periapical;
- e) Classificar a contaminação microbiana no tecido pulpar e periapical através de análise microscópica na lesão periapical por meio de Brown e Brenn modificado.

## 2.2 MATERIAL E MÉTODOS

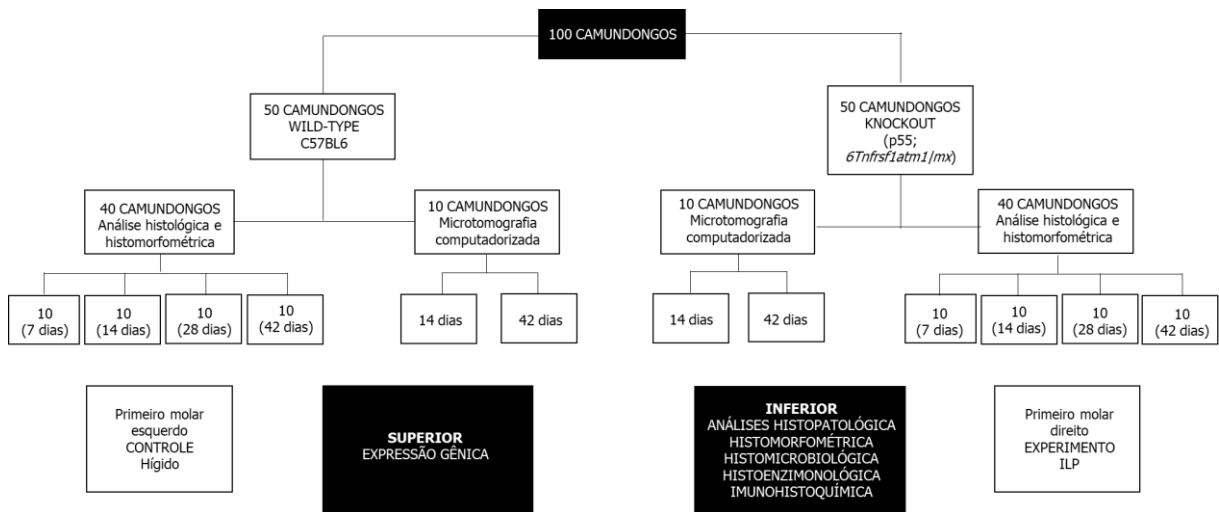
### 2.2.1 Animais

Inicialmente, o projeto foi submetido à apreciação e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (Processo nº 2019.1.139.58.0) (Anexo A) e pela Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (Projeto nº 0040/98.004-01.06/2020) (Anexo B). Os procedimentos realizados nos animais foram guiados pelas diretrizes éticas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, e baseados no guia *ARRIVE* para estudos em animais (Percie du Sert et al., 2020) e de acordo com o *Preferred Reporting Items for Animal Studies in Endodontology* - PRIASE 2021 (Nagendrababu et al., 2021).

O delineamento experimental seguiu o estudo de Collignon et al., (2017). Sendo assim, cem camundongos machos (*Mus musculus*), cinquenta C57BL/6 (*Wild-Type*) provenientes do Biotério Central da USP Campus de Ribeirão Preto e cinquenta camundongos geneticamente deficientes (*Knockout*) para o receptor-1 de TNF- $\alpha$  (p55; 6-*Tnfrsf1atm1 / mx*) obtidos do Jackson Immuno Research Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA) e fornecidos pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com idade entre seis a oito semanas, pesando de 16 a 23 gramas foram utilizados para o experimento. Os animais foram mantidos no Biotério I da FORP-USP, alocados em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 × 20 cm (5 animais por gaiola), forradas com maravalha, em temperatura de 22°C e umidade relativa do ar (55 ± 10%) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, durante todo o período experimental, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água filtrada. Após a indução da lesão periapical, foram realizadas as análises histopatológicas, histomorfométricas, histomicrobiológicas, histoenzimológicas, de expressão gênica por meio de RT-PCR e imunohistoquímica (Figura 1).



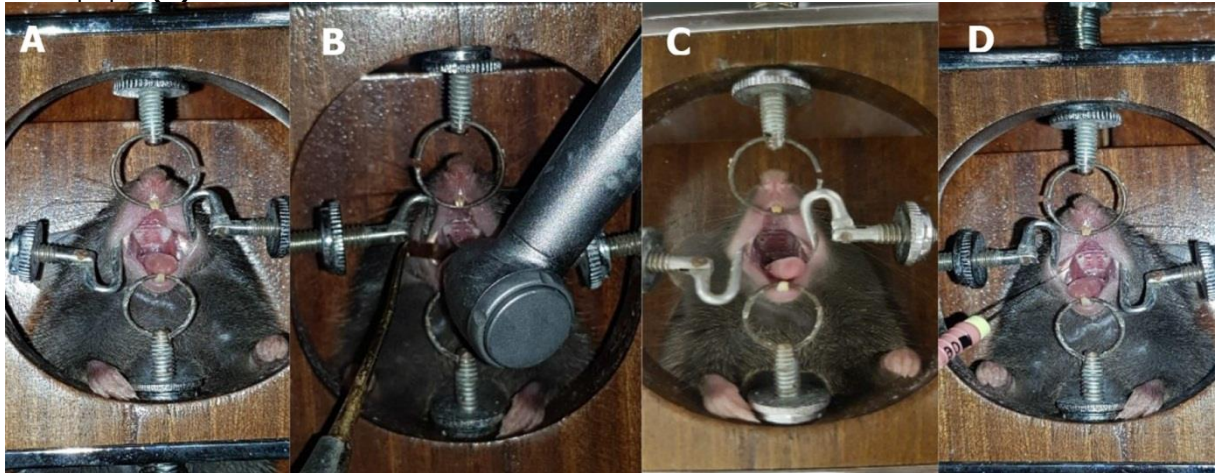
**Figura 1** - Fluxograma representativo da divisão e quantidade dos animais utilizados dos grupos *Wild-Type* e *Knockout*, e os tipos de análises que foram realizadas. ILP = Indução da lesão periapical



### 2.2.2 Indução da Lesão Periapical

Os animais foram anestesiados com Cloridrato de Ketamina 10% (150 mg kg; Química Farmacêutica Nacional Union Agener S / A, Embu-Guacu, SP, Brasil) e xilazina 2% (7,5 mg kg; Dopaser, Labs Calier S / A, Barcelona, Espanha), diluídos em soro fisiológico a 0,9% (1 ml de Ketamina + 0,3 ml de Xilazina + 4,6 ml de soro fisiológico) por via intramuscular na coxa traseira, complementado com sedação inalatória com Isoflurano a 1% (Isoforine, Cristalia Produtos Químicos Farmaceuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os camundongos *Wild-Type* e *Knockout* foram colocados em uma mesa cirúrgica com um dispositivo para retração mandibular, permitindo a imobilização dos animais e a manutenção da boca aberta, para acesso aos primeiros molares inferiores e superiores (Figura 2A). Do lado direito, foi induzida lesão periapical (n=10 por grupo) enquanto o lado esquerdo o dente permaneceu hígido (n=5 por grupo). Os canais radiculares foram acessados através da abertura coronária pela face oclusal (Classe I) utilizando uma broca carbide ¼ de haste curta (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP) de alta rotação (Figuras 2B e 2C), e posteriormente os canais radiculares foram localizados com uma lima tipo K 06 mm (Les Fils d 'Auguste Maillefer S / A, Ballaigues, Suíça) e o tecido pulpar foi parcialmente removido (Figura 2D). Os canais radiculares permaneceram abertos para contaminação microbiana da cavidade bucal, conforme descrito anteriormente (Paula-Silva et al., 2016; Paula-Silva et al., 2020b; Lorencetti-Silva et al., 2022), nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias. A anestesia foi mantida durante todos os procedimentos operatórios e os animais foram acompanhados por um médico veterinário durante todo o período experimental. Após os períodos experimentais os animais foram anestesiados e eutanasiados na câmara de CO<sub>2</sub>.

**Figura 2** - Fotos representativas do experimento de indução da lesão periapical em camundongos. Camundongo posicionado na mesa cirúrgica de retração mandibular **(A)**. Abertura coronária, acesso ao tecido pulpar **(B)**. Cavidade de classe I e exposição do tecido pulpar **(C)**. Inserção de uma Lima tipo K de 6 mm para remoção do tecido pulpar **(D)**.

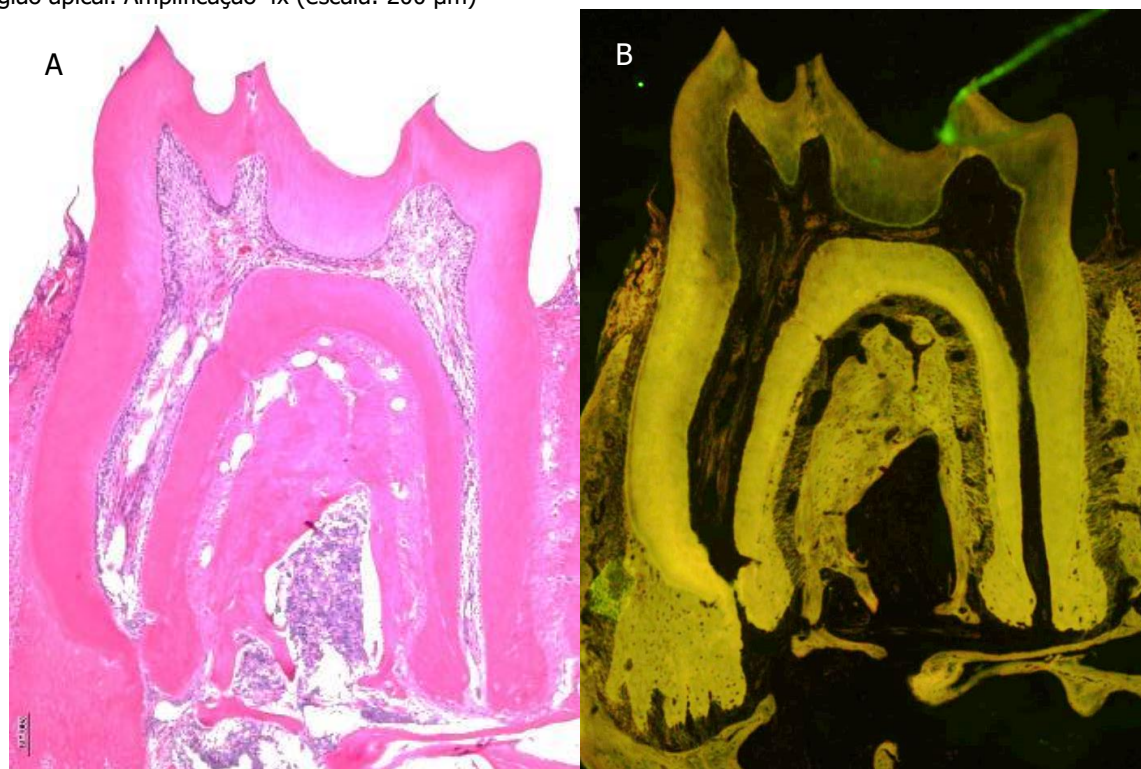


### 2.2.3 Processamento histotécnico das amostras

Após a anestesia e eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, oitenta mandíbulas, sendo 40 dos animais geneticamente deficientes (*Knockout*) para o receptor-1 de TNF- $\alpha$  (p55; 6-Tnfrsf1atm1 | mx) e 40 dos animais da linhagem C57BL/6 (*Wild-type*) foram dissecadas e removidas com tesoura cirúrgica. Os blocos contendo dentes e ossos foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h em temperatura ambiente e em seguida, lavadas por aproximadamente 4 horas em água corrente. A desmineralização foi feita em ácido etilenodiaminotetracético a 5% (EDTA; pH 7,4; Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), por aproximadamente 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 à técnica histológica de rotina, sendo lavadas em água corrente por 4 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80% e 95% por 45 minutos cada; 3 trocas de 100% por 45 minutos cada), diafanizadas em xilol (álcool/xilol por 30 minutos e 3 banhos de 40 minutos de xilol) e incluídas em parafina I por 2 horas e parafina II por 2 horas. Os blocos foram seccionados longitudinalmente em micrótomo HYRAX M60 (Carl Zeiss microImaging GmbH, Jena, Alemanha), na direção vestibulo-lingual, para obter amostras com espessura de 5  $\mu$ m. Por amostra, foram obtidos de 10 a 15 lâminas, com 3 cortes em cada lâmina. Inicialmente as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica e histomorfométrica (Figura 3), posteriormente por histoenzimologia para detectar a atividade da enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) para identificação de osteoclastos, pelo método de Brown & Brenn modificado para identificação de bactérias Gram-positivas e

Gram-negativas e por imunohistoquímica para confirmação do infiltrado inflamatório, identificação de marcadores da osteoclastogênese.

**Figura 3** - Fotomicrografias representativas do 1º molar inferior esquerdo hígido em HE (A) e Fluorescência (B), a polpa e os canais radiculares mesial e distal apresentam-se amplos, com espessura de dentina uniforme até a região apical. Amplificação 4x (escala: 200 µm)



#### 2.2.3.1 Avaliação Histopatológica e Histomorfométrica da Lesão Periapical

Cortes histológicos corados por Hematoxilina e Eosina (HE) foram avaliados, qualitativamente, usando microscopia de luz convencional (Zeiss Axio Imager; Carl Zeiss AG Light Microscopy, Göttingen, Alemanha) e a lesão periapical foi medida para análise quantitativa, de acordo com parâmetros descritos anteriormente (De Rossi et al., 2008, Paula-Silva et al., 2009c; Petean et al., 2021). Para análise morfométrica da área de lesão periapical, videomicroscopia foi usada com Zeiss Axio Imager (Upright microscope, Carl Zeiss AG Light Microscopy), com ampliação de 10x. O microscópio foi operado em modo de fluorescência (excitação em 450-490 nm, espelho dicromático de 510-515 nm) (De Rossi et al., 2008; Paula-Silva et al., 2009b, Paula-Silva et al., 2009d). Para cada espécime, a área de lesão periapical foi delineada e medida em  $\mu\text{m}^2$  nas seções que representam o maior diâmetro da lesão. O delineamento da lesão excluiu estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar) e incluídos áreas de reabsorção e infiltrado inflamatório. Os períodos analisados foram de 7, 14, 28 e 42 dias.

### *2.2.3.2 Recrutamento de Neutrófilos Polimorfonucleares na Região Periapical*

O número de neutrófilos foi contado utilizando lâminas coradas por HE em microscopia de luz convencional, nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias. Foram selecionados três campos ao redor do ápice radicular, localizados a uma distância pré-determinada e posicionados no centro do canal radicular e a 45° à esquerda e à direita do centro do canal (Paula-Silva et al., 2009d; Paula-Silva et al., 2020b). Os neutrófilos foram identificados de acordo com sua morfologia característica de células escuramente coradas com núcleos multilobulados em formato de ferradura.

### *2.2.3.3 Determinação da Presença de Osteoclastos por Meio de Histoenzimologia para Atividade da Enzima Fosfatase Ácida Resistente ao Tartarato (TRAP)*

Nos períodos de 14 e 42 dias, as seções de tecido desparafinado foram incubadas em uma solução contendo 1 mg de naftol AS-MX di-sódio fosfato (Sigma-Aldrich) em 0,1 mL de N,N-Dimetilformamida seguido pela adição de 10 mL de uma solução tampão de 0,2 mol / L acetato de sódio (pH 5,0) contendo 5 mg de Fast Red ITR (Sigma-Aldrich). Posteriormente, o substrato tartarato de sódio di-hidratado (50 mmol/L) foi adicionado à solução e incubado a 37 ° C durante 1 h. Em seguida, as seções foram lavadas em água destilada e corado com hematoxilina. Como controle, as seções foram incubadas com um meio sem substrato (Carvalho et al., 2022). Análise quantitativa do número de osteoclastos que foram positivos para a enzima TRAP foi realizada levando em consideração o número total de osteoclastos por µm da extensão do tecido ósseo e superfície radicular em processo de reabsorção lesão periapical.

### *2.2.3.4 Análise Histomicrobiológica*

Os cortes foram corados pelo método de Brown & Brenn modificado para evidenciação de micro-organismos nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias (Engbaek et al., 1979; De Rossi et al., 2008; Paula-Silva et al., 2010a; Paula-Silva, 2016). Inicialmente foram desparafinizados, hidratados e imersos em solução de cristal violeta (Ecibra, Cetus Ind. Com. Prod. Quim. Ltda., São Paulo) tamponada com bicarbonato de sódio (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro) a 5% por 30 segundos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de iodo por 10 segundos, lavadas em água destilada e mergulhadas em solução de éter-acetona (1:1), logo após, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em fucsina básica a 0,25 mg / mL (1 minuto), lavadas novamente em água destilada e posteriormente imersas em ácido pícrico aquoso (2:4:4 Trinitrophenol, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(OH)(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - May & Baker Ltda., Inglaterra), por 2 minutos. A seguir, foram lavadas novamente em água destilada e foram mergulhadas em

acetona p.a. (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, Ecibra) por 15 segundos seguida por imersão rápida em acetona-xilol (1:1) e montadas em Entellan® (Merck). Os micro-organismos foram observados em microscopia de luz convencional, com imersão à óleo, no aumento de 100×, efetuando-se a diferenciação entre Gram-negativos e Gram-positivos. Com esta coloração, as bactérias Gram-positivas são coradas em azul e as bactérias Gram-negativas em vermelho. No modelo de lesão periapical, as lâminas foram avaliadas quanto ao grau de penetração das bactérias de acordo com os escores:

- Escore 0: Ausência de bactérias;
- Escore 1: Presença de bactérias no terço cervical do canal radicular;
- Escore 2: Presença de bactérias no terço médio do canal radicular;
- Escore 3: Presença de bactérias no terço apical do canal radicular;
- Escore 4: Presença de bactérias nos túbulos dentinários;
- Escore 5: Presença de bactérias nas lacunas de reabsorção do cimento.

#### *2.2.3.5 Imunohistoquímica*

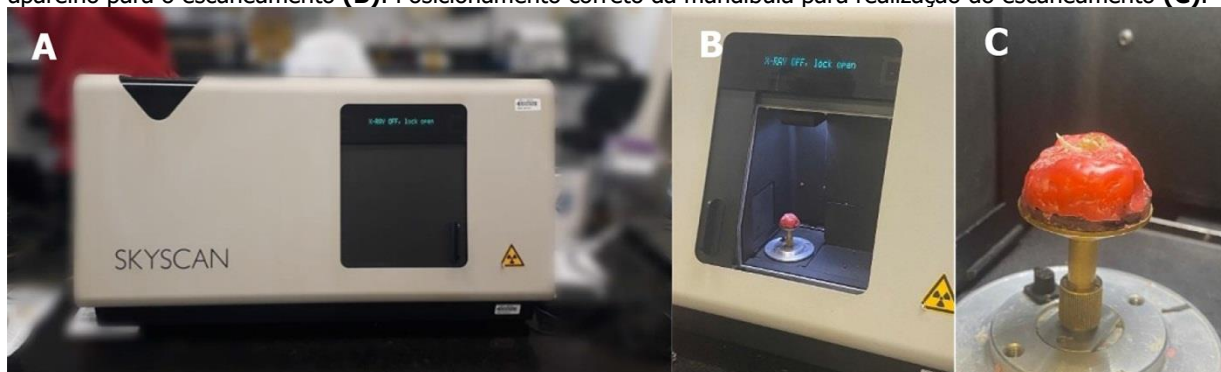
As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em série decrescente de álcoois e mantidas em salina fosfatada tamponada (PBS). As lâminas foram submetidas à recuperação dos epítomos antigênicos utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0) aquecido a 83°C no microondas (20 ciclos de 12 seg com intervalo de 2 min). Depois da temperatura estabilizada, as lâminas foram lavadas com PBS (3x) por 5 min, e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueado com peróxido de hidrogênio a 3% por 60 min. Os cortes foram ainda lavados com PBS (3x) por 5 min e sítios de ligação não específicos foram bloqueados com 5% de bovinos albumina sérica (BSA) (Sigma-Aldrich) por 60 min. Os tecidos foram então incubados com anticorpos primários para fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$  1:100 / sc-52746, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), metaloproteinase da matriz 9 (MMP9 1:10 / sc-135220, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), Catepsina K (CTSK 1:25 / sc-48353, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), Ciclo-oxigenase-2 (COX-2 1:100 / ab15191, Abcam, Cambridge, UK), RANK (1:50 / sc-374360, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), RANKL (1:50 / sc-377079, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), OPG (1:50 / sc-390518, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), em 4°C durante a noite. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse (1:200 / m-IgG KBp-B: sc-516142; Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA) exceto aos cortes de COX-2 que o anticorpo secundário foi anti-rabbit (1:200 / mouse anti-rabbit IgG-B: sc-2491; Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA) por 1 h, lavado em PBS e incubado com Complexo Avidina e Biotina (Kit ABC; Vector, Vectastain® ABC Kit No. PK- 4000) por 30 min.

3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich) foi usado como o substrato da enzima por até 5 min, as lâminas foram lavadas com PBS, contrastado com hematoxilina por 30 segundos, lavadas com água destilada, desidratada em álcool em crescentes concentrações e montadas em Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os cortes de controle em que o anticorpo primário foi omitido foi usado para testar a especificidade da imunocoloração. Os períodos de análises foram de 7, 14, 28 e 42 dias. Para a quantificação de imunocoloração, utilizou-se o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e o plugin de deconvolução de imagem (cor de convolução) Hematoxilina e Filtros DAB foram aplicados (Landini, Martinelli e Piccinini, 2021). Para medir a intensidade de coloração, as ferramentas de 'densidade integrada' e 'área' foram usados. Os dados são expressos como unidades arbitrárias por  $\mu\text{m}^2$ .

#### 2.2.4 Microtomografia Computadorizada

O volume da lesão periapical em  $\mu\text{m}^3$ , foi realizado por meio de microtomografia computadorizada com 10 dentes dos animais da linhagem *Wild-Type* e 10 dentes dos animais *Knockout* para o receptor-1 do TNF- $\alpha$  nos períodos de 14 e 42 dias, empregando o microtomógrafo SkyScan modelo 1174 v.2 (Bruker microCT, Kontich, Bélgica) (Figura 4A). Sucintamente, cada espécime foi individualmente inserido no aparato, perpendicularmente à fonte de radiação (Figuras 4B e 4C). A seguir, as amostras foram escaneadas utilizando 50 kV e 800 mA, com auxílio de um filtro de alumínio de 0,5 mm de espessura, em passos de rotação de 0,7°, e 2 frames e tamanho de resolução isotrópica de 9,78  $\mu\text{m}$  (Falcai et al., 2015). A reconstrução das secções transversais foi realizada por meio do software NRecon v.1.6.3 (Bruker microCT), sendo aplicada uma redução de artefatos em forma de anel no valor de 10. Alinhamento pelo software Dataviewer v. 1.5.6.3 (Bruker microCT). Para as análises, foi utilizado o software CTAn v.1.12 (Bruker microCT). Para tanto, a delimitação do espaço do ligamento periodontal (1 mm acima do ápice radicular) ou das lesões periapicais foi realizada no plano sagital, por meio da delimitação individualizada da região de interesse (ROI) e ajustada a cada 10 cortes, para assegurar a inclusão do volume total de perda óssea na região apical (Romualdo et al., 2018).

**Figura 4** - Análise microtomográfica das mandíbulas de camundongo do experimento da lesão periapical. Aparelho SkayScan utilizado para o escaneamento dos espécimes microtomográficos **(A)**. A mandíbula no interior do aparelho para o escaneamento **(B)**. Posicionamento correto da mandíbula para realização do escaneamento **(C)**.



### 2.2.5 Avaliação da Expressão Gênica por Transcrição Reversa e Reação da Polimerase em Cadeia em Tempo Real (qRT-PCR)

Após anestesia e eutanásia dos animais em câmara de CO<sub>2</sub>, as maxilas (10 por período) foram divididas e o lado direito e esquerdo foram armazenados em solução que inibe a ação de RNAses (RNA later) e armazenados a -80° C para posterior análise. O RNA total foi obtido por extração à base de PureLink™ RNA Mini Kit (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) e a pureza e a estimativa da quantidade de ácidos nucleicos foram realizadas utilizando a espectrofotometria em NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) em taxa de absorção de 260/230 e 260/280. O cDNA foi sintetizado por meio de uma reação de transcrição reversa, a partir de 1 µg de RNA total. As amostras foram incubadas a 25 °C por 10 minutos para ligação do primer ao RNA, seguido por incubação a 37 °C por 2 horas para transcrição reversa, utilizando a enzima transcriptase reversa, e posterior incubação a 85 °C por 5 segundos para inativação da enzima e finalização do processo (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, EUA). Os primers selecionados foram, fator de necrose tumoral-α (*Tnf-α* / Mm00443258\_m1), *Tnfsf11* (*Rankl* / 00441906\_m1), *Tnfsf11b* (*Opg* / Mm00435454\_m1), metaloproteinase da matriz 9 (*Mmp9* / Mm00442991\_m1), Catepsina K (*Ctsk* / Mm00484039\_m1), Prostaglandina-Endoperóxido Sintase 2 (*Ptsg2* / Mm00478374\_m1). Os genes para a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Gapdh* / Mm99999915\_g1) e para beta-actina (*Actb* / 02619580\_g1) foram utilizados como referência. Os primers e sondas foram obtidos comercialmente e são propriedades privadas, portanto as sequências não estão disponíveis (TaqMan® Gene Expression Assay, Applied Biosystems). A amplificação foi realizada sob as seguintes condições: ativação da polimerase TaqMan™ Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA) a 95 °C por 2º segundos, seguida por 40 ciclos de 95 °C por 1 segundo para desnaturação do DNA e 60 °C por 20 segundos para anelamento

do primer e polimerização. O aparelho Step One Plus (Applied Biosystems) foi utilizado para as reações de amplificação e detecção e o Software Step One versão 2.3 (Applied Biosystems) para quantificação das amostras por meio da análise da quantidade de fluorescência gerada pela liberação do fluoróforo FAM exceto para os genes de referência VIC, após a clivagem pela exonuclease 5'. Os resultados foram analisados com base no valor do ciclo limiar (Ct, cycle threshold). Como controle negativo foi utilizada água destilada deionizada, submetida a reação com cada par das sequências dos primers utilizados. A quantificação relativa da expressão gênica foi realizada utilizando o método  $\Delta\Delta Ct$ .

#### 2.2.6 *Análise Estatística*

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o *Software GraphPad Prism 8.0* (Prism, Chicago, IL, EUA). Para as análises microtomográficas, histopatológicas, histomicrobiológicas e TRAP foi utilizado o método ANOVA seguido do teste de *Tukey*, entretanto para as análises de imunohistoquímica e de expressão gênica por (qRT-PCR) foram por meio de ANOVA seguido de pós-teste de Bonferroni. Adotando o nível de significância de 5%.

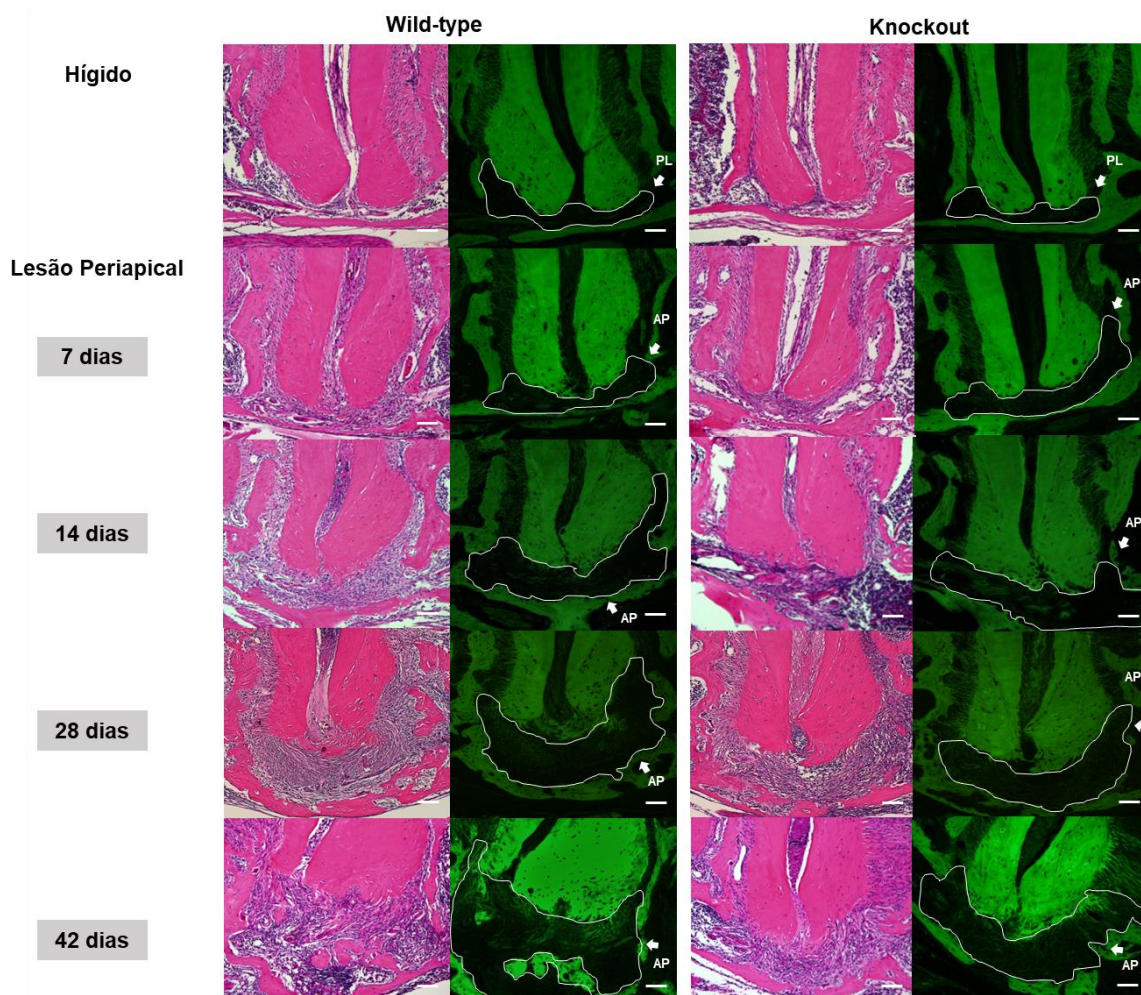


## 2.3 RESULTADOS

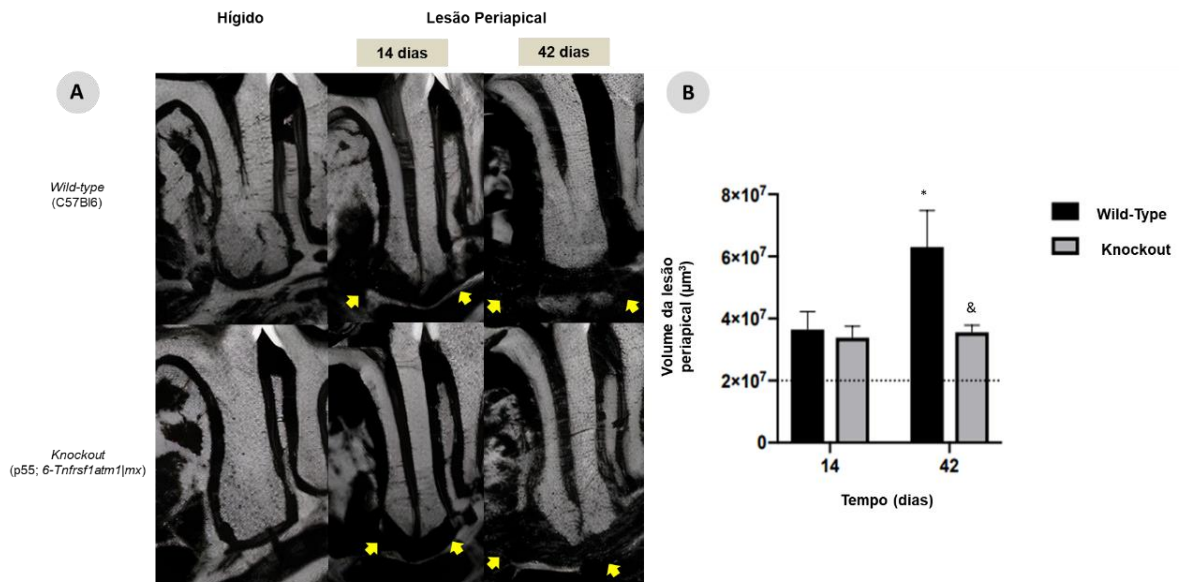
### 2.3.1 A Ausência do Receptor TNFR1 Limita a Formação da Lesão Periapical aos 42 Dias

O desenvolvimento da lesão periapical foi caracterizado pelo amplo espaçamento do ligamento periodontal, recrutamento de células inflamatórias e perda óssea apical (Figura 5). Na avaliação da microtomografia computadorizada, os animais geneticamente modificados para o receptor 1 do TNF- $\alpha$ , apresentaram uma manutenção do volume da lesão periapical no período de 42 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 6). A área da lesão periapical também se manteve menor no período de 42 dias nos animais *knockout* nos ensaios histomorfométricos ( $p < 0,05$ ). Entretanto, podemos observar que nos períodos de 14 e 28 dias existe uma tendência de menor área da lesão periapical nos animais *Knockout* (Figura 7A). Em consonância, os animais geneticamente modificados se mostraram com menor número de neutrófilos nos períodos de 14, 28 e 42 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 7B).

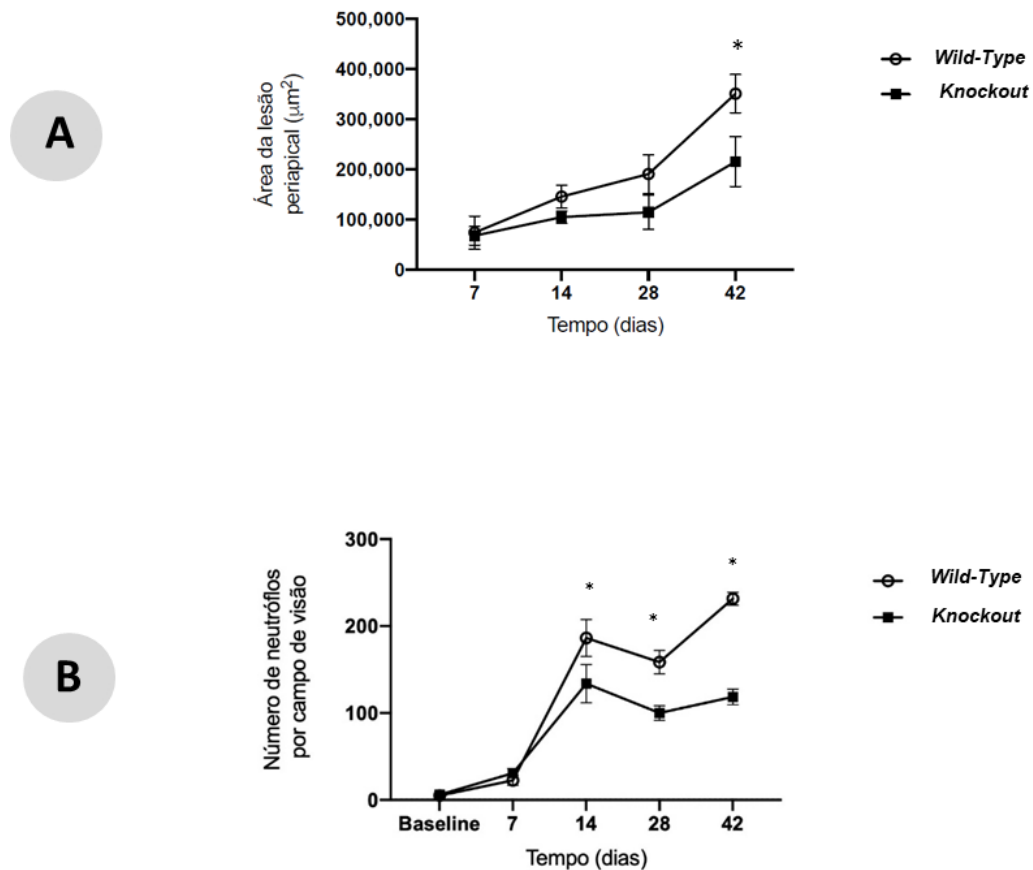
**Figura 5-** Fotomicrografias representativas obtidas dos primeiros molares inferiores direito e esquerdo, hígido e após a indução da lesão periapical nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias em microscopia convencional e Fluorescência dos animais *Wild-Type* ou *Knockout*. HE e Fluorescência em amplificação de 10x (escala = 100µm). A linha em branco delimita a área do ligamento periodontal (LP) em dentes hígidos e da lesão periapical (AP) dos grupos experimentais.



**Figura 6-** Imagem representativa da microtomografia computadorizada da região periapical dos primeiros molares de animais *Wild-Type* (C57Bl6) e *knockout* (p55; 6-Tnfrsf1atm1|mx) dos grupos experimentais aos 14 e 42 dias, após indução da lesão periapical **(A)**. Representação gráfica do volume da lesão periapical em  $\mu\text{m}^3$  aos 14 e 42 dias realizado através da microtomografia computadorizada **(B)**. A linha tracejada indica o volume do ligamento periodontal apical de dentes hígidos. Nota: Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ( $P < 0,05$ ).



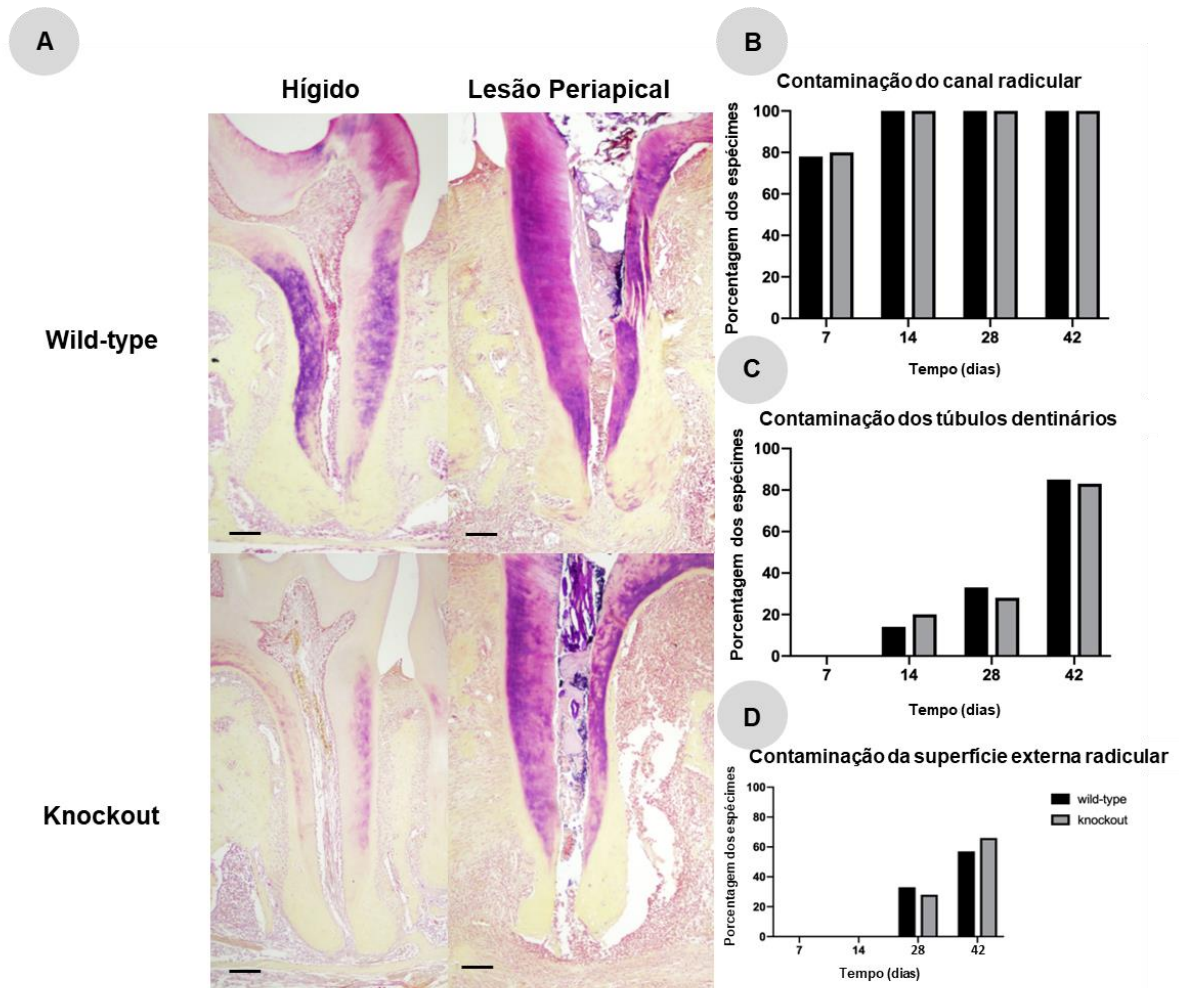
**Figura 7-** Representação gráfica da medida da área da lesão periapical em  $\mu\text{m}^2$  aos 7, 14, 28 e 42 dias **(A)**. Número de neutrófilos por campo de visão nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias **(B)**. Nota: \*  $P < 0,05$  Diferença estatística entre os animais *Knockout* comparado aos animais *Wild-Type*.



2.3.2 A Contaminação Por Micro-Organismos Foi de Maneira Semelhante em Ambos os Grupos Ocasionalmente a Formação da Lesão Periapical

O processo de contaminação bacteriana foi semelhante em ambos os grupos analisados (Figura 8A). A contaminação do canal radicular nos terços (cervical, médio e apical) não apresentam diferença em nenhum dos grupos analisados ( $p > 0,05$ ) (Figura 8B). Possuindo resultados semelhantes e não havendo diferenças estatísticas por contaminação nos túbulos dentinários ( $p > 0,05$ ) (Figura 8C) e na superfície do canal radicular externa ( $p > 0,05$ ) (Figura 8D).

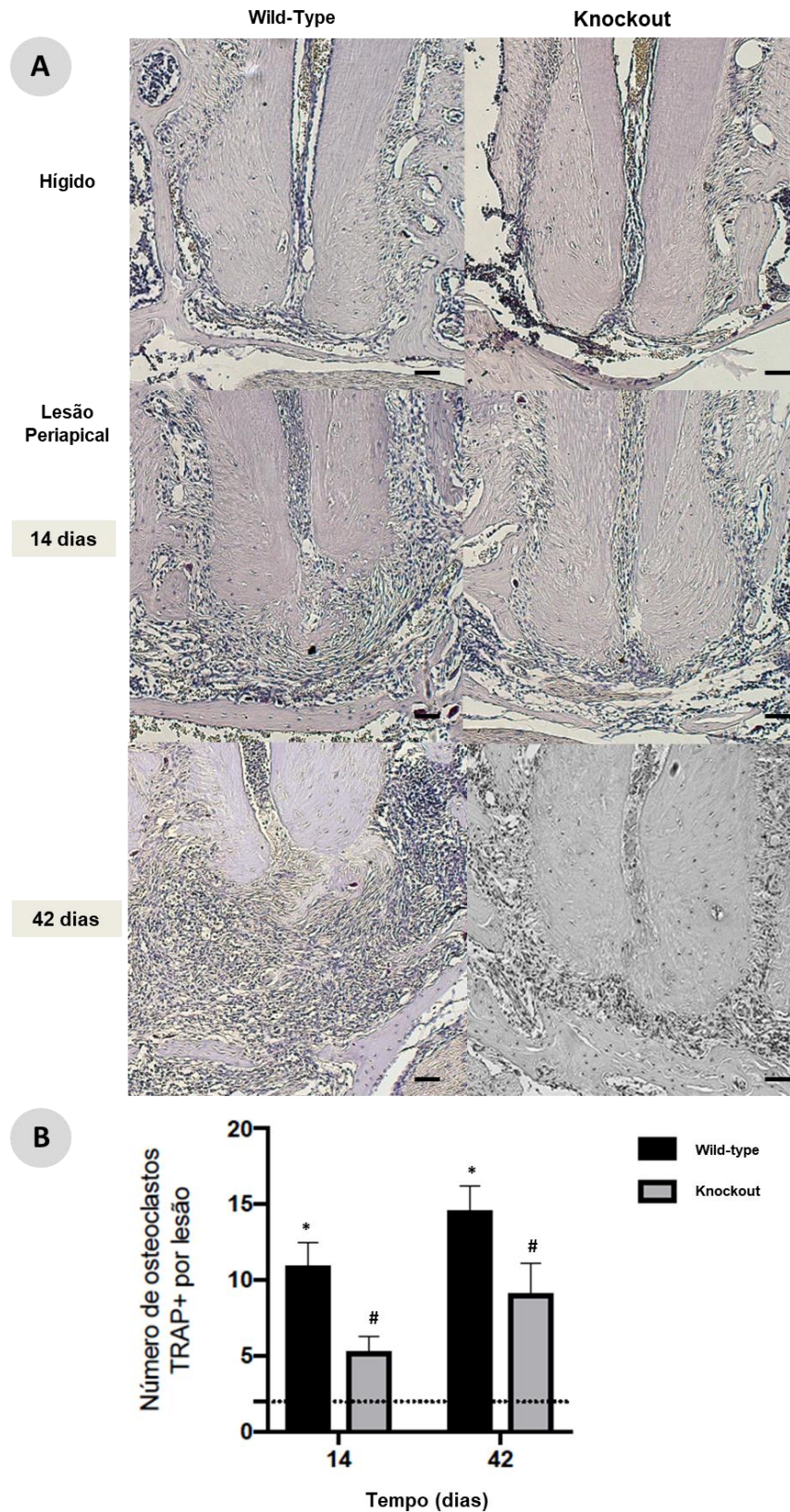
**Figura 8** - Visão representativa da penetração bacteriana após acesso à coroa e contaminação do canal radicular no período de 42 dias (A). Ampliação original de 4x (escala = 200µm). Representação gráfica da penetração bacteriana no canal radicular nos terços (cervical, médio e apical) ( $p > 0,05$ ) (B). Representação gráfica da penetração bacteriana nos túbulos dentinários ( $p > 0,05$ ) (C). Representação gráfica da penetração bacteriana na superfície externa do canal radicular ( $p > 0,05$ ) (D).



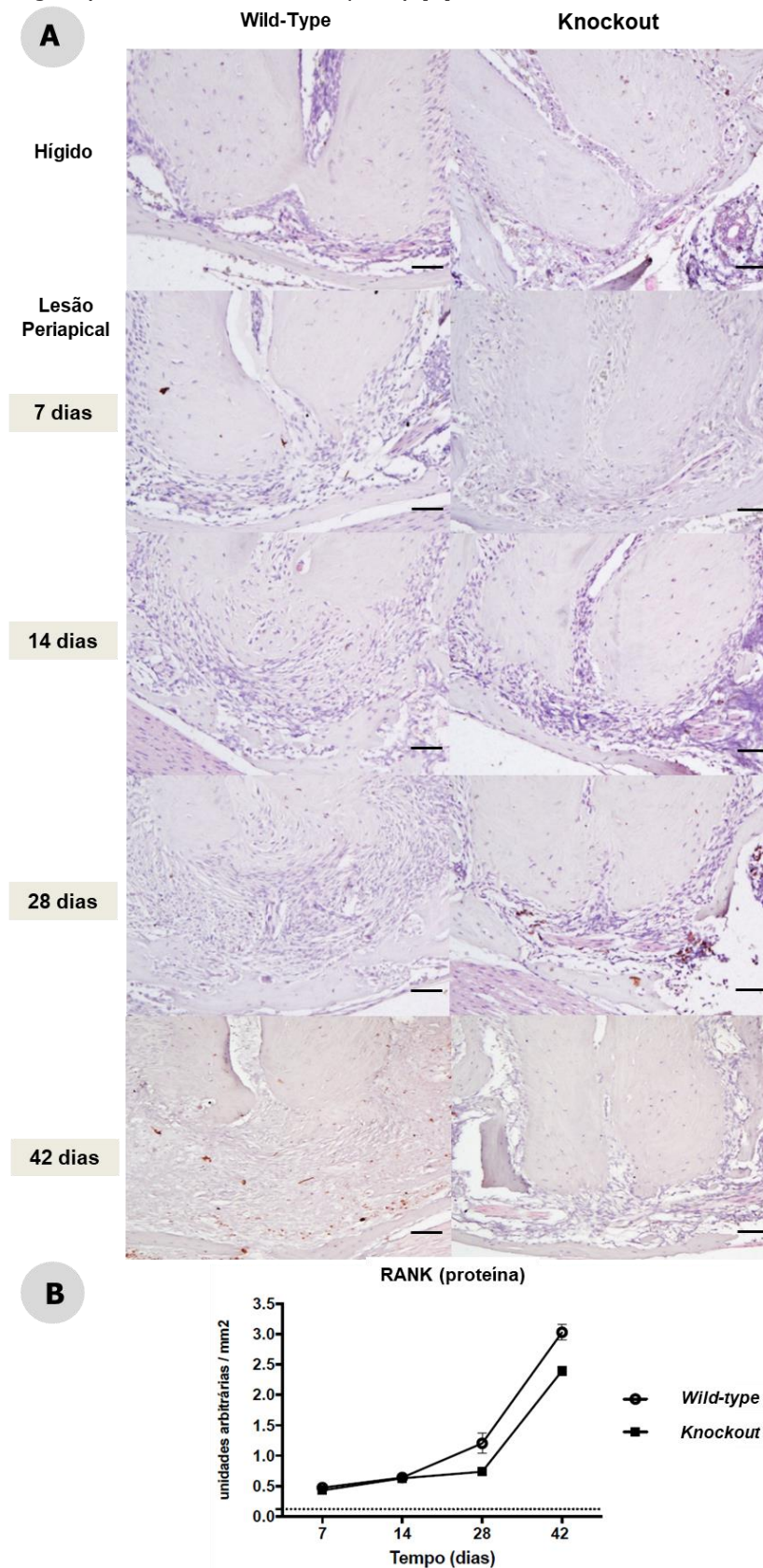
### 2.3.3 A Presença e Atividade dos Osteoclastos é Reduzida nos Animais Geneticamente Modificados Para TNFR1

O número de osteoclastos foi relativamente menor nos animais *Knockout* em relação aos animais *Wild-Type* nos períodos de 14 e 42 dias ( $p < 0,05$ ) (Figura 9). A quantificação da síntese de proteínas RANK não apresentou diferença estatística entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 10). A expressão de *Rankl* se mostrou reduzida nos animais *Knockout* nos períodos de 14 e 42 dias ( $p < 0,001$ ) (Figuras 11; 13A), ao contrário da expressão do gene *Opg*, que aos 28 dias a ausência do TNFR1 tornou-se reduzido ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 12; 13C). A maior expressão *Rankl* sobre *Opg* (Razão  $> 1$ ) foi encontrado nos animais *Wild-Type* nos períodos iniciais e finais da lesão, ou seja, 7 ( $p < 0,0001$ ) e 42 dias ( $p < 0,001$ ) e nos animais *Knockout* aos 14 dias ( $p < 0,01$ ) e 28 dias ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 13E). Assim, os genes relacionados a osteoclastogênese é menor nos períodos iniciais e após a lesão estar estabelecida na ausência do receptor do TNFR1. A imunomarcagem para RANKL, OPG e sua razão RANKL sobre OPG (Razão  $> 1$ ), não apresentaram diferenças entre os grupos ( $P > 0,05$ ) (Figuras 13B; 13D e 13F).

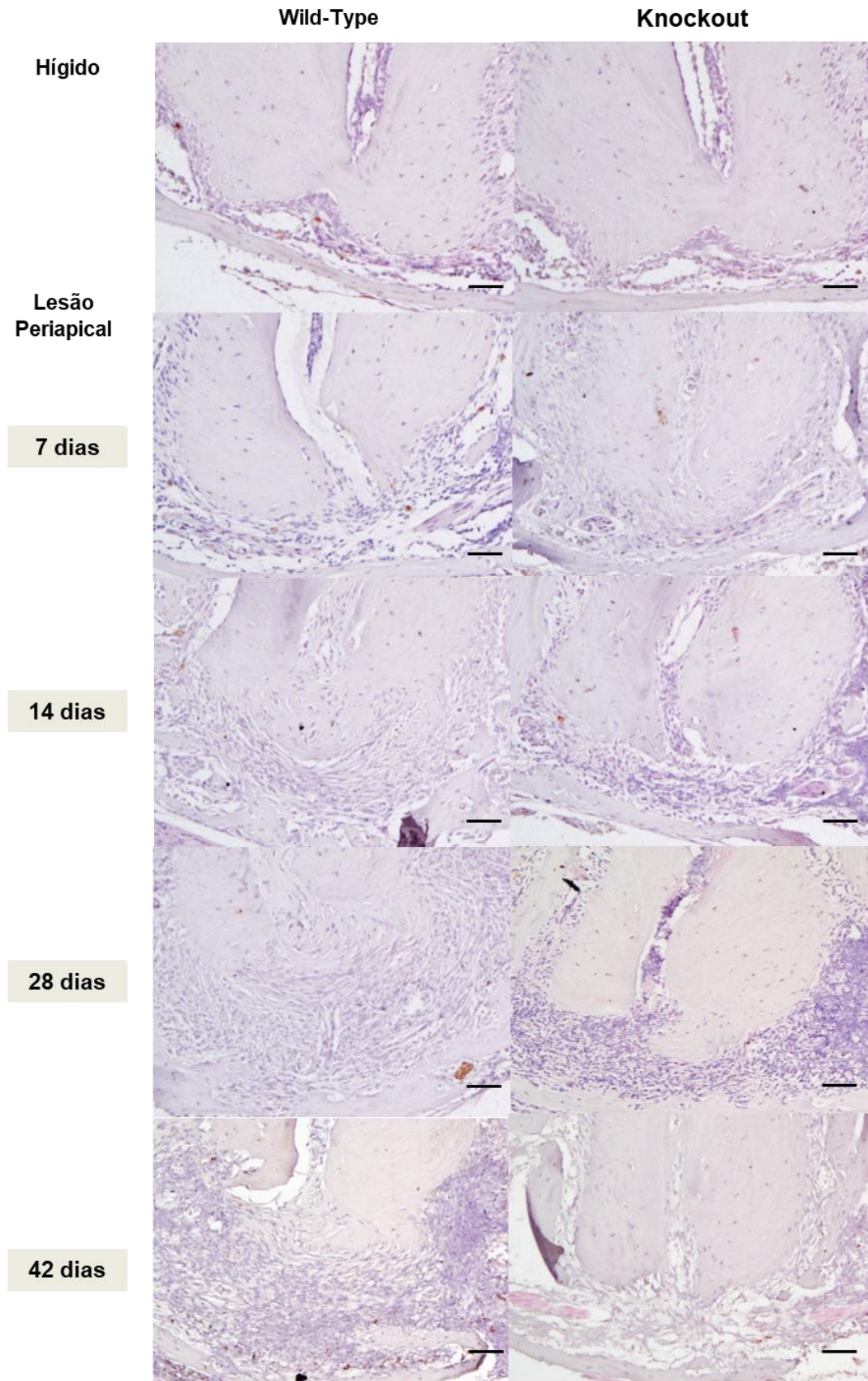
**Figura 9** - Fotomicrografias representativas de histoenzimologia para a enzima fosfatase ácida resistente ao tartarato (TRAP) na região periapical dos primeiros molares dos animais *Wild-Type* e *Knockout* obtidas de dentes hígidos ou após a indução da lesão periapical nos períodos de 14 e 42 dias **(A)**. Ampliação original 10x (escala = 100µm). Representação gráfica do número de osteoclastos TRAP + por lesão periapical nos diferentes grupos aos 14 e 42 dias (mediana e intervalo interquartil) **(B)**. Linhas tracejadas indica o número de osteoclastos TRAP + no ligamento periodontal apical hígido. Nota: Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os grupos (P <0,05).



**Figura 10** - Fotomicrografias representativas de coloração imunohistoquímica para RANK em animais *Wild-Type* e *Knockout* com dentes hígidos ou com lesão periapical após 7, 14, 28 e 42 dias **(A)**. Ampliação original 10x (escala = 100µm). Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas RANK usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(B)**.

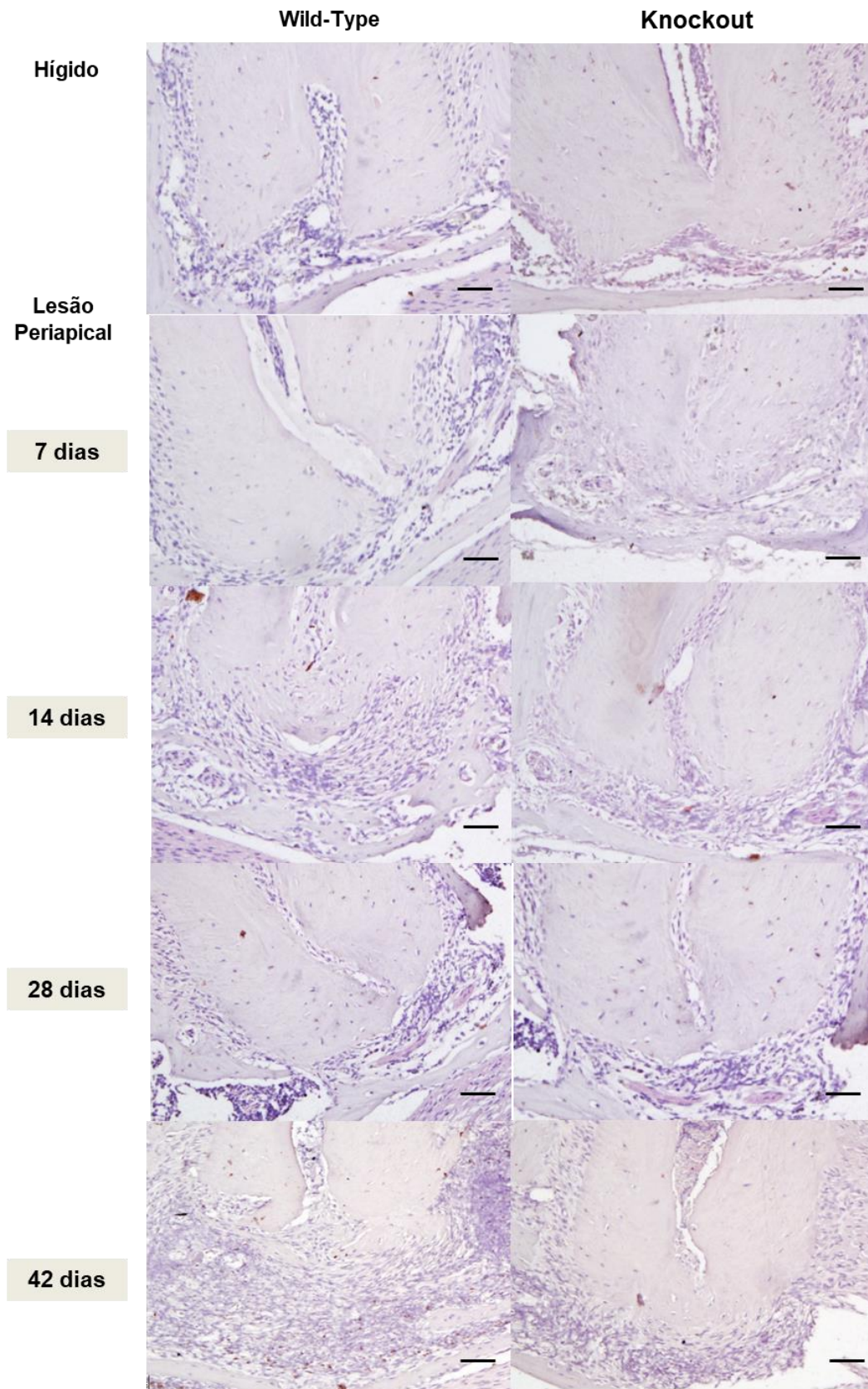


**Figura 11** - Fotomicrografias representativas de coloração imunohistoquímica para RANKL em animais *Wild-Type* e *Knockout*, com dentes hígidos ou com lesão periapical após 7, 14, 28 e 42 dias. Ampliação original 10x (escala = 100µm).

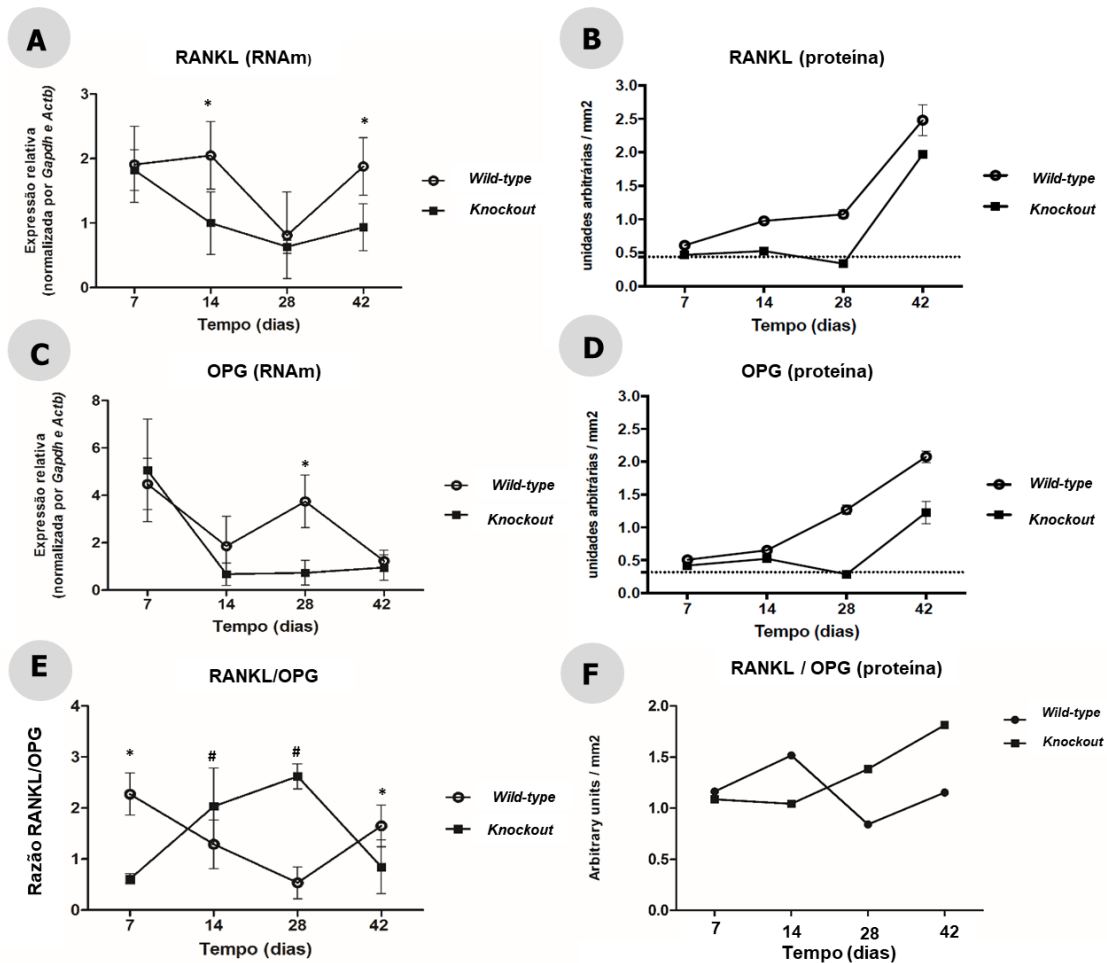




**Figura 12** - Fotomicrografias representativas de coloração imunohistoquímica para OPG em em animais *Wild-Type* e *Knockout*, com dentes hígidos ou com lesão periapical após 7, 14, 28 e 42 dias. Ampliação original 10x (escala = 100µm).



**Figura 13** - Expressão relativa de RNAm que codifica o gene *Rankl* nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias após a indução da lesão periapical **(A)**. Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas RANKL usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(B)**. Expressão relativa de RNAm que codifica o gene *Opg* nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias após a indução da lesão periapical **(C)**. Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas OPG usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(D)**. Expressão relativa de RNAm da Razão de *Rankl* sobre *Opg* (Razão > 1) nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias após a indução da lesão periapical **(E)**. Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas da razão de RANKL sobre OPG (Razão > 1) usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(F)**. \* ou #  $P < 0,05$  Diferença estatística entre os animais *Knockout* comparado aos animais *Wild-Type*.

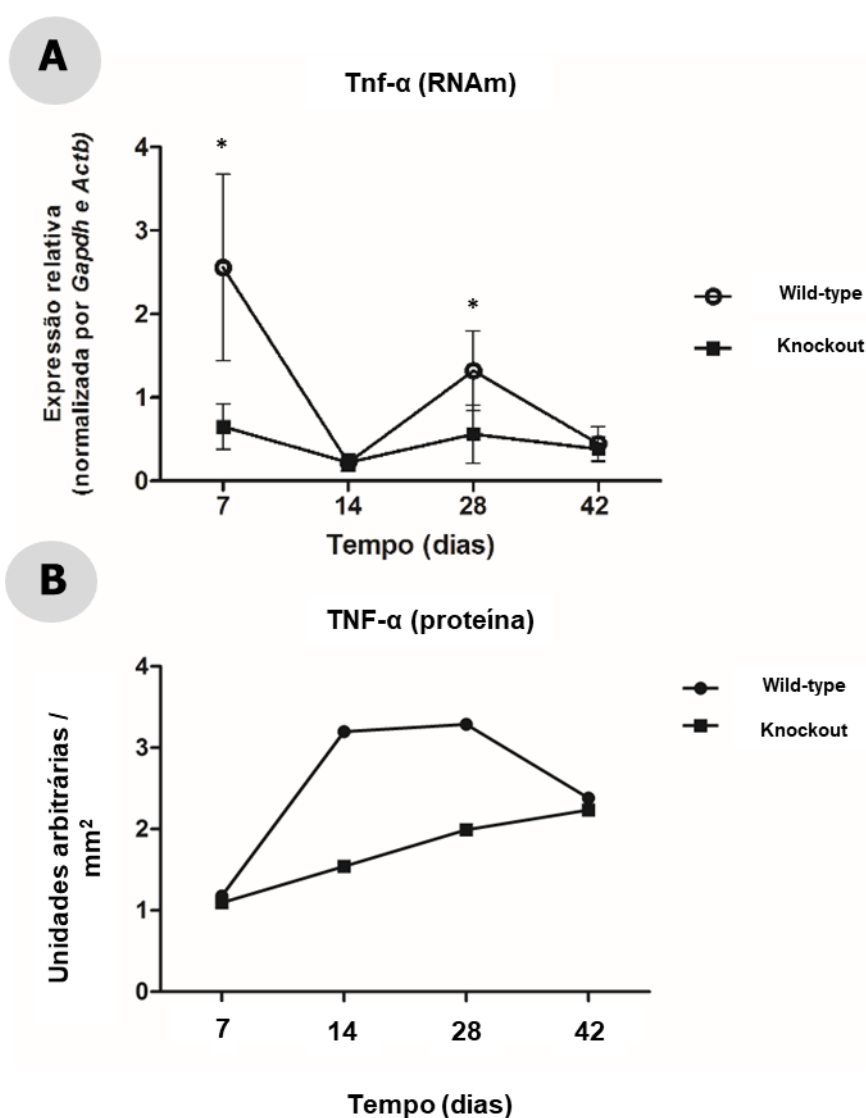


### 2.3.4 O *TNF-α* Influencia no Processo Inflamatório e na Reabsorção Óssea Periapical Desde os Períodos Iniciais da Lesão Periapical

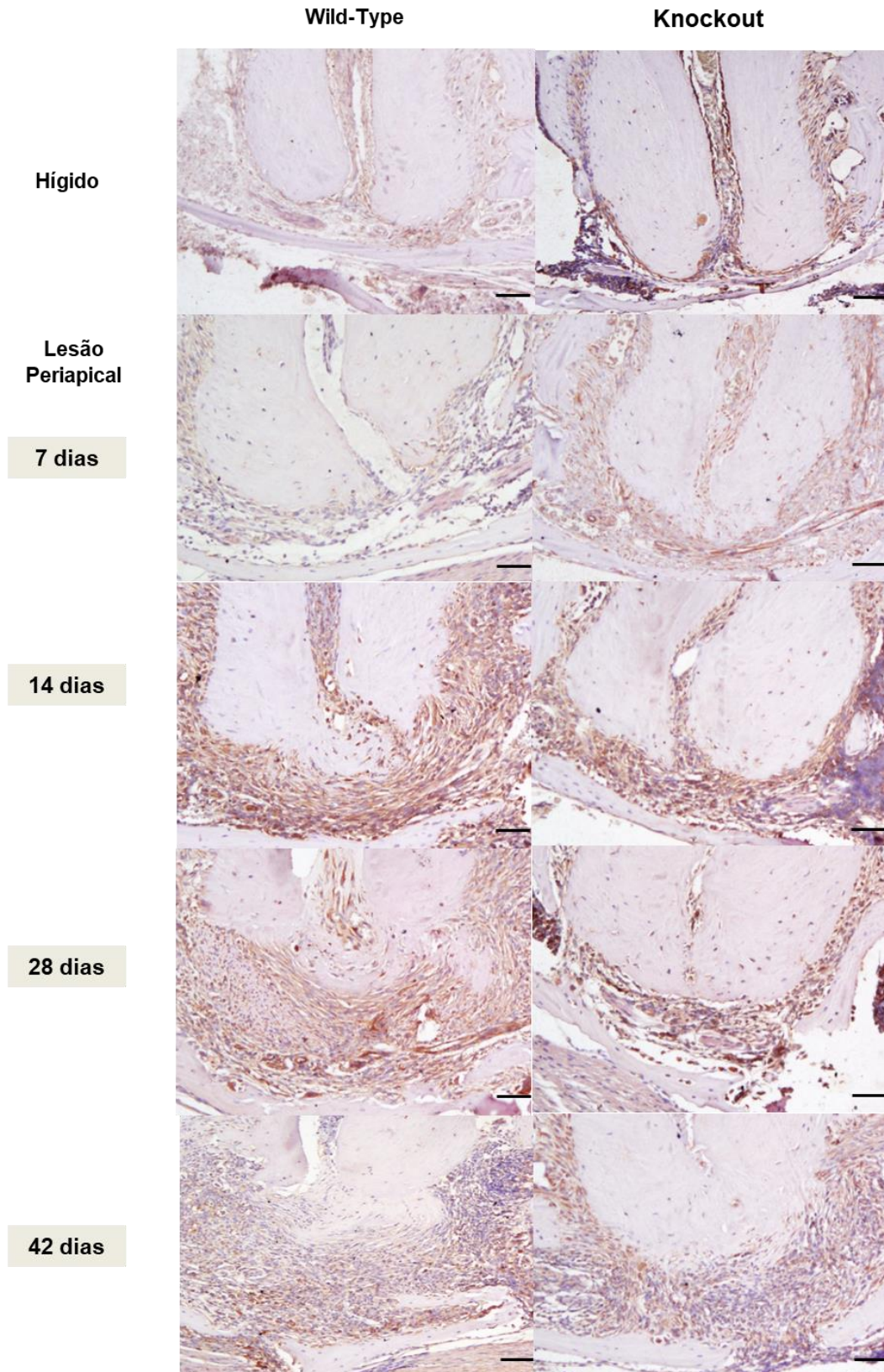
Baixa expressão de RNAm para o *Tnf-α* foi observado nos períodos de 7 e 28 dias nos animais *Knockout* em comparação aos *Wild-Type* ( $p < 0,0001$ ) (Figura 14A e 15). A expressão do gene para *Ptsg2* foi detectado em menor quantidade aos 7 dias nos animais geneticamente modificados para o receptor 1 do *TNF-α* ( $p < 0,0001$ ), podendo significar uma redução no processo inflamatório (Figuras 16A e 17). A marcação de proteínas para *TNF-α* e *COX-2* não apresentaram diferença entre os animais *Knockout* em relação aos *Wild-Type* ( $P > 0,05$ ) (Figuras 14B e 16B) De modo semelhante, a expressão da *Mmp9* foi menor no período de 7

dias nos animais *Knockout* ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 18A e 19), apontando uma redução na degradação da matriz extracelular, igualmente, na expressão de *CtsK* que também se mostrou menor aos 7 dias nos animais geneticamente modificados ( $p < 0,0001$ ), assim um menor processo de reabsorção óssea (Figuras 20A e 21). A imunomarcagem para MMP9 e CTSK não houve diferença entre os animais *Knockout* e *Wild-Type* ( $P > 0,05$ ) (Figuras 18B e 20B).

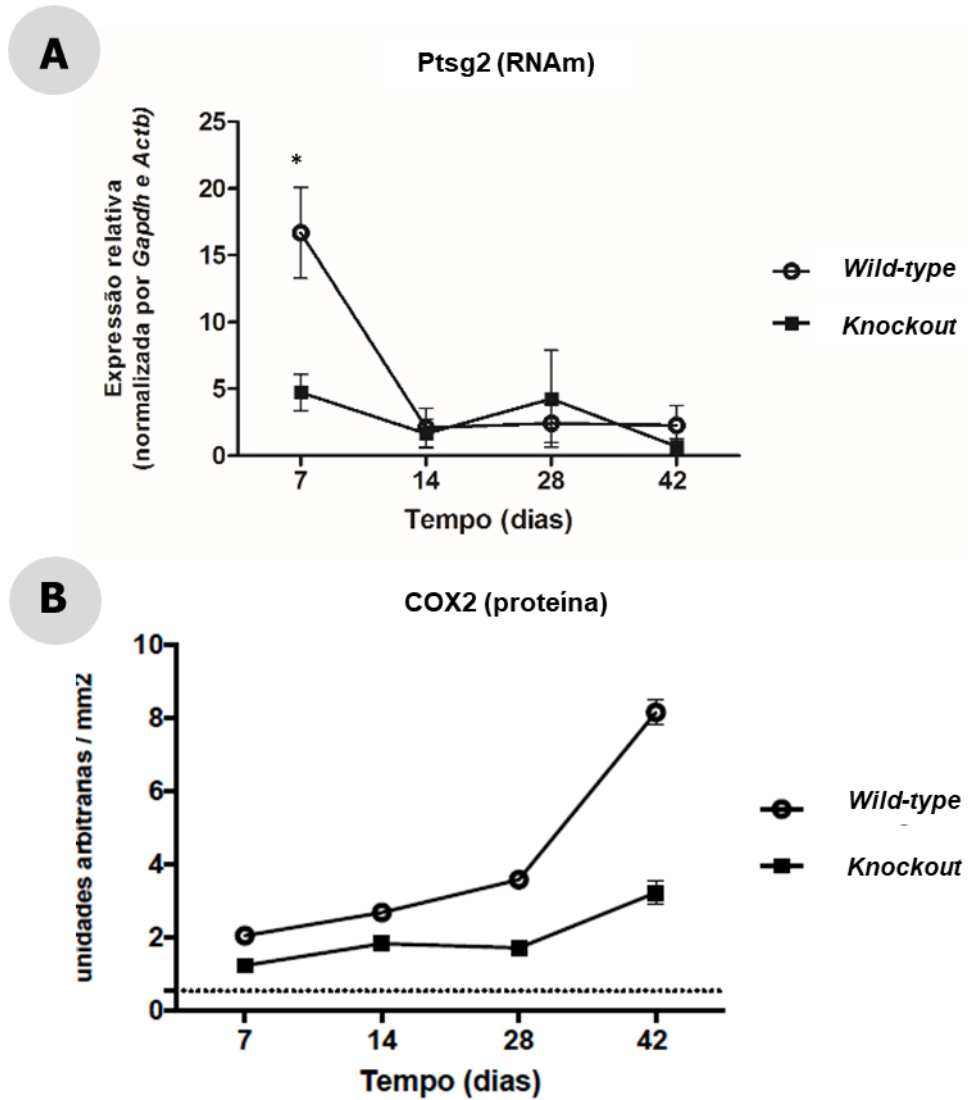
**Figura 14** - Expressão relativa de RNAm que codifica o gene *Tnf- $\alpha$*  nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias após a indução da lesão periapical **(A)**. Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas TNF- $\alpha$  usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(B)**. \*  $P < 0,05$  Diferença estatística entre os animais *Knockout* comparado aos animais *Wild-Type*.



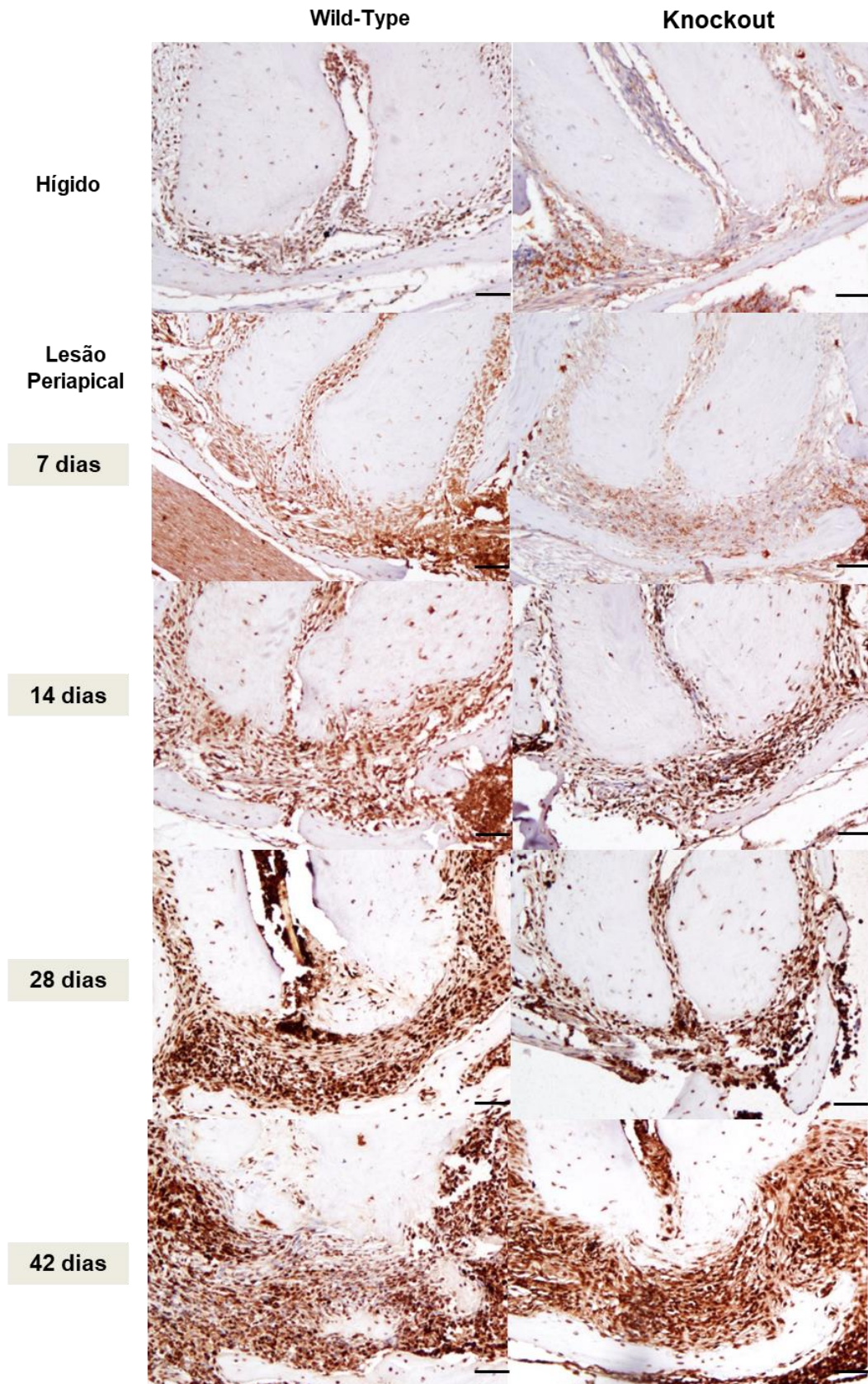
**Figura 15** - Fotomicrografias representativas de coloração imunohistoquímica para TNF- $\alpha$  em animais *Wild-Type* e *Knockout* com dentes hígidos ou com lesão periapical após 7, 14, 28 e 42. Ampliação original 10x (escala = 100 $\mu$ m).



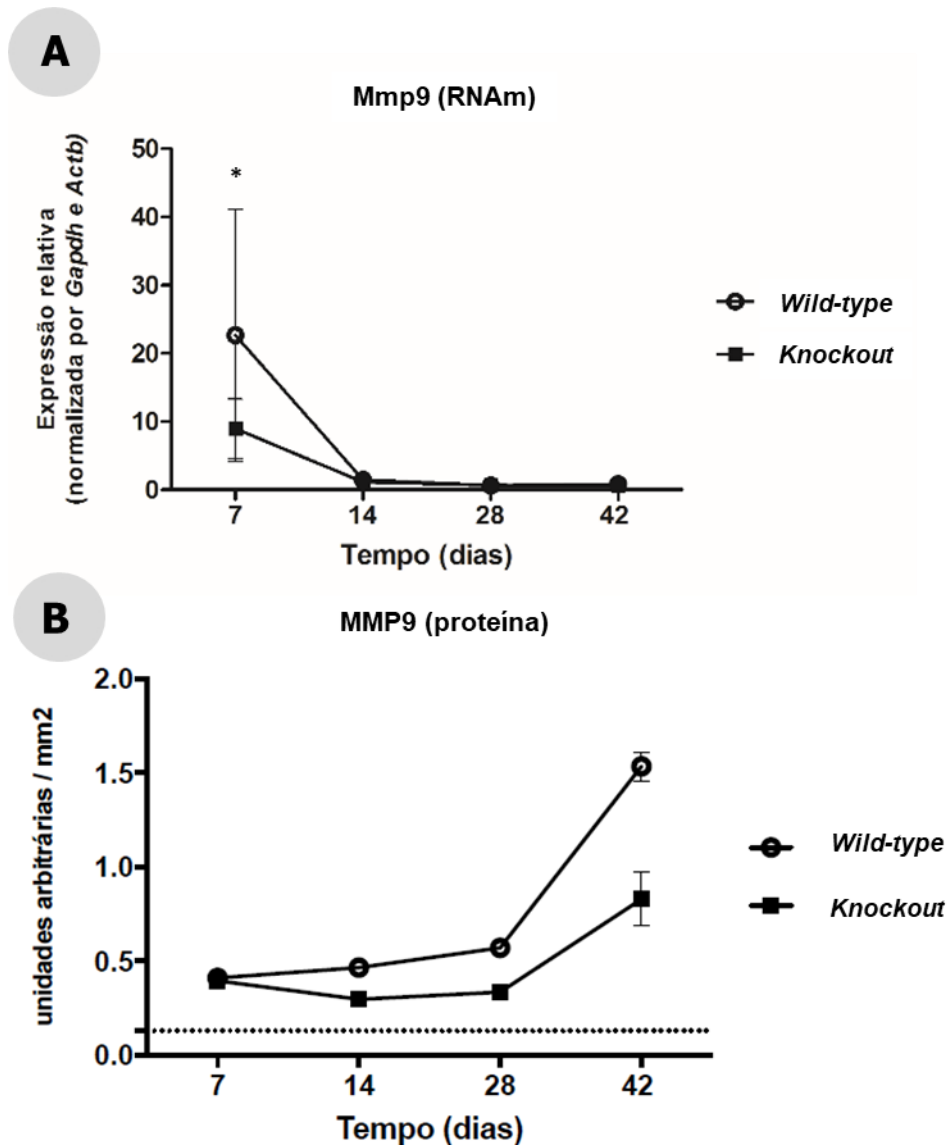
**Figura 16** - Expressão relativa de RNAm que codifica o gene *Ptsg2* nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias após a indução da lesão periapical **(A)**. Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas COX-2 usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(B)**. \*  $P < 0,05$  Diferença estatística entre os animais *Knockout* comparado aos animais *Wild-Type*.



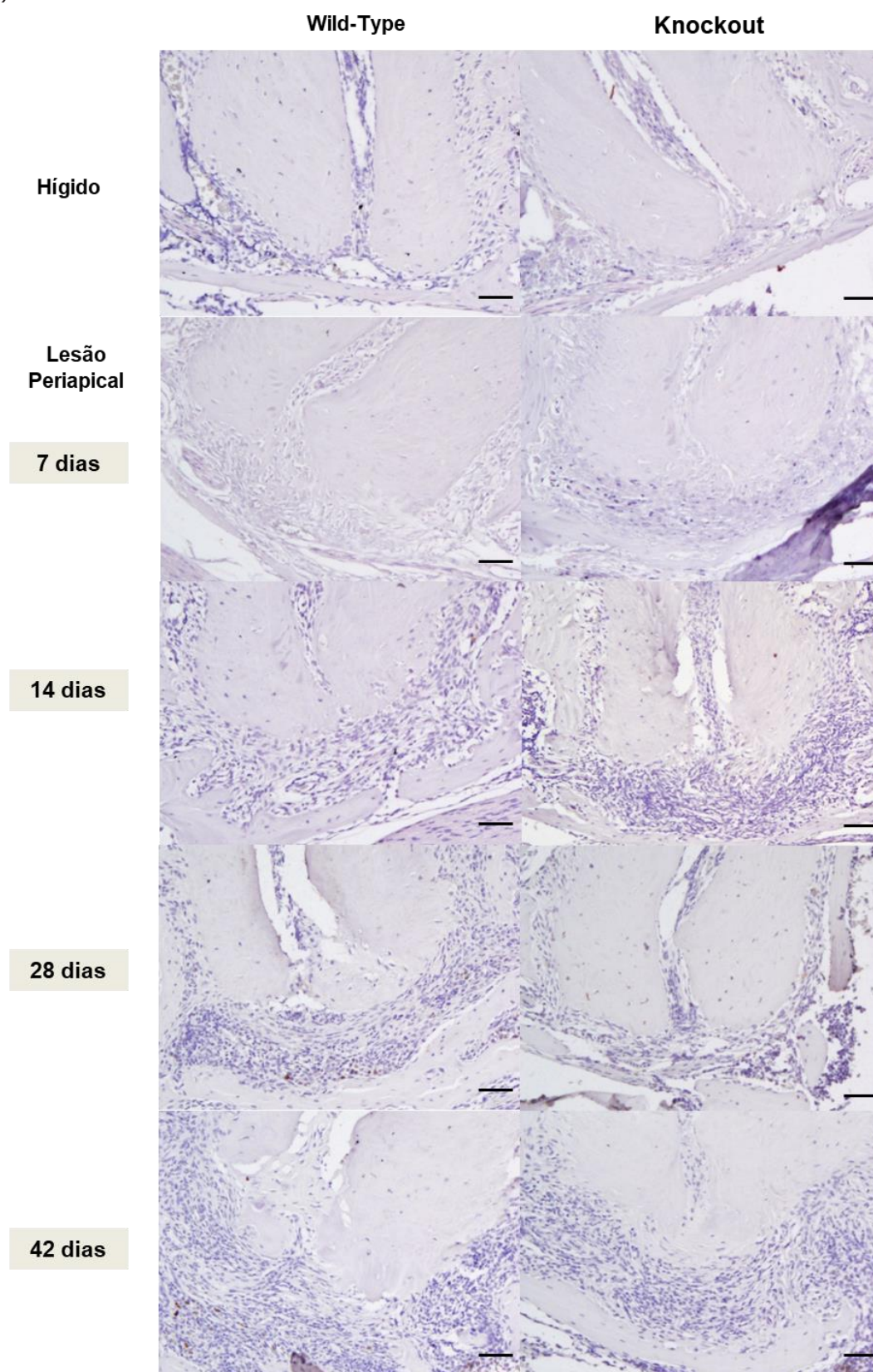
**Figura 17** - Fotomicrografias representativas de coloração imunohistoquímica para COX-2 em animais *Wild-Type* e *Knockout* com dentes hígidos ou com lesão periapical após 7, 14, 28 e 42 dias. Ampliação original 10x (escala = 100µm).



**Figura 18** - Expressão relativa de RNAm que codifica o gene *Mmp9* nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias após a indução da lesão periapical **(A)**. Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas MMP9 usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(B)**. \*  $P < 0,05$  Diferença estatística entre os animais *Knockout* comparado aos animais *Wild-Type*.

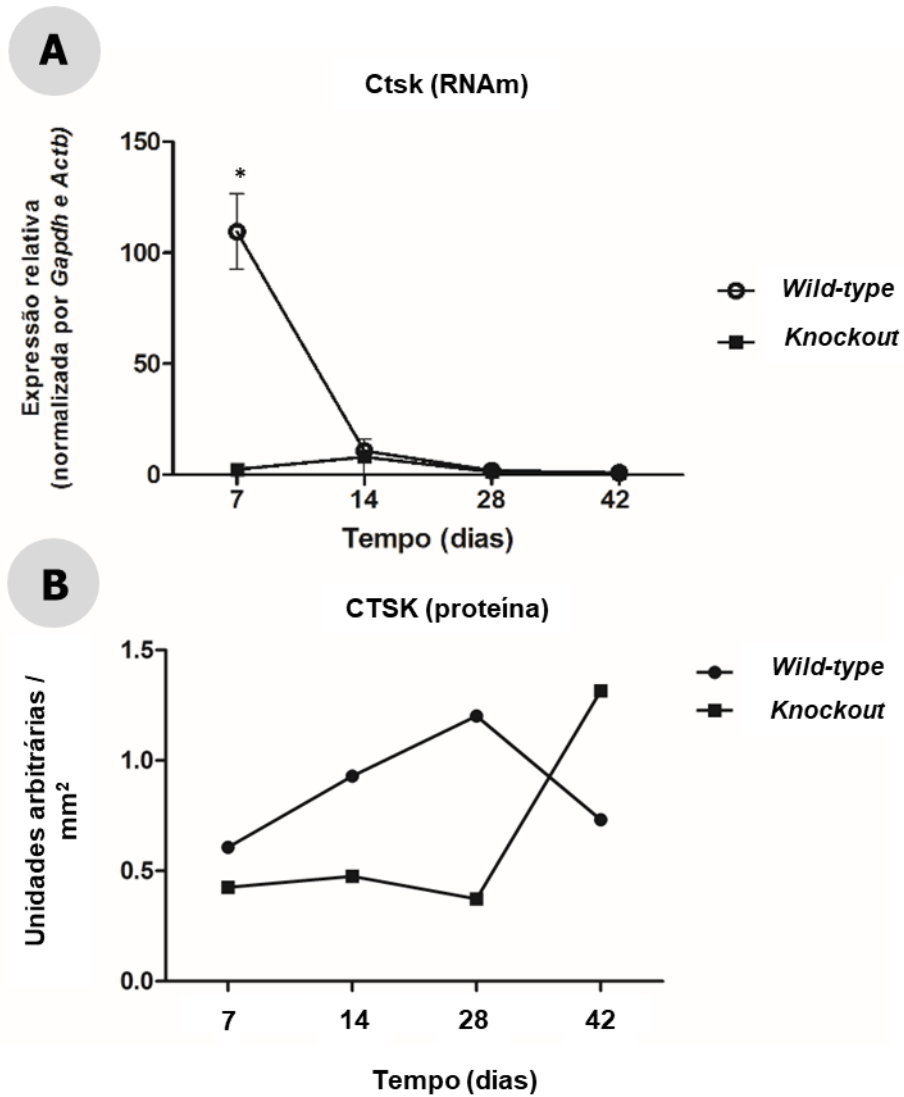


**Figura 19** - Fotomicrografias representativas de coloração imunohistoquímica para MMP9 em animais *Wild-Type* e *Knockout* com dentes hígidos ou com lesão periapical após 7, 14, 28 e 42 dias. Ampliação original 10x (escala = 100µm).

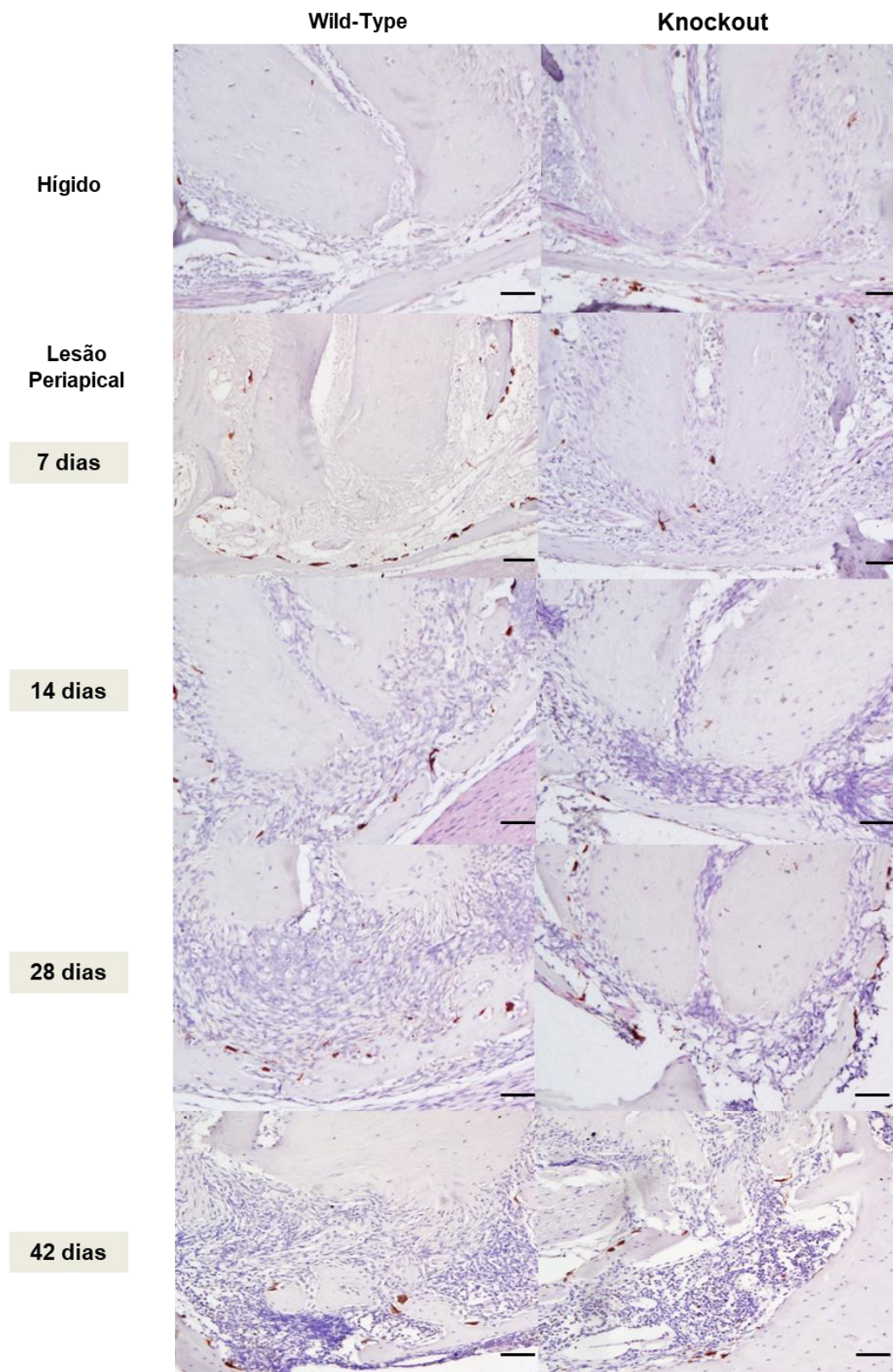




**Figura 20** - Expressão relativa de RNAm que codifica o gene *Ctsk* nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias após a indução da lesão periapical **(A)**. Representação gráfica da quantificação de imunocoloração da síntese de proteínas CTSK usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil) **(B)**. \*  $P < 0,05$  Diferença estatística entre os animais *Knockout* comparado aos animais *Wild-Type*.



**Figura 21** - Fotomicrografias representativas de coloração imunohistoquímica para CTSK em animais *Wild-Type* e *Knockout* com dentes hígidos ou com lesão periapical após 7, 14, 28 e 42 dias. Ampliação original 10x (escala = 100µm).



## 2.4 DISCUSSÃO

A prevalência global da lesão periapical é de aproximadamente 52% (Tibúrcio-Machado et al., 2021), e achados na literatura podem variar de 16% a 86% com lesão periapical em ao menos 1 dente (Tibúrcio-Machado et al., 2021; Al-Zahrani et al., 2017; Skudutyte-Rysstad e Eriksen, 2006). Assim, essa doença apresenta grande importância dos estudos nesta área de conhecimento, pois, se a lesão periapical não for tratada pode gerar problemas como futura perda dentária, conseqüentemente, maior índice de pacientes adultos desdentados, afetar a qualidade de vida da população, influenciar em alterações sistêmicas como doenças cardiovasculares e diabetes (Seerig et al., 2015; Khalighinejad et al., 2016; Haag et al., 2017)

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por macrófagos ou por outras células de linhagem monocíticas. Sua ação pode desencadear diversos efeitos biológicos como, por exemplo, apoptose, citotoxicidade em linhagens celulares neoplásicas, estimulação da fagocitose, estimulação e formação de fibroblastos, osteoclastos, citocinas e quimiocinas, aumento da temperatura corporal, regulação do sono, entre outros (Gamrot et al., 2021). Foi observado a presença do TNF- $\alpha$  nas lesões periapicais, e que esta citocina possui envolvimento no processo de desenvolvimento da lesão periapical e degradação óssea devido ao sinergismo ao RANKL (Nikolic et al., 2019). Recentemente, estudos tem sustentado a hipótese de que o TNF- $\alpha$  pode atuar no desenvolvimento e manutenção da lesão periapical (Jakovljevic et al., 2020; Teixeira et al., 2021; Castro et al., 2023). Existem duas formas de TNF- $\alpha$ , uma ligada a membrana e a porção solúvel, esta citocina atua em dois receptores transmembrana TNFR1 ou P-55, presente na maioria dos mamíferos, e o TNFR2 ou P-75, presente principalmente em células do sistema imunológico (Gamrot et al., 2021).

Nosso trabalho optou por inibir o TNFR1 na lesão periapical, visto que, estudos anteriores relataram que o TNFR1 está diretamente ligado ao processo de apoptose e inflamação e o TNFR2 responsável pela ativação do NF- $\kappa$ B para induzir a expressão gênica e a regulação da imunidade (Nikolic et al., 2019; Zhang; Wanga e Zhao, 2020; Gamrot et al., 2021). Clinicamente, a inibição do TNF- $\alpha$  aos dois receptores tem apresentado alto risco de infecção e malignidade, distúrbios desmielinizantes do SNC e desenvolvimento de doenças autoimunes adicionais, como diabetes tipo I e psoríase. Isto se deve a perda da função reguladora promovida pelo TNFR2, sendo assim, a inibição apenas do TNFR1 e preservação da ligação do TNF- $\alpha$  ao TNFR2 pode reduzir estes efeitos colaterais (Bloom, 2000; Tack; Kleijwegt e Van Riel, 2009; Kollias et al., 2002; Zhang; Wanga e Zhao, 2020).

A indução da lesão periapical foi por meio de micro-organismos provenientes da cavidade bucal, este método é eficaz para formação da lesão periapical (Stashenko, Teles e

D'Souza, 1998; Paula-Silva et al., 2020a). Houve relativamente uma limitação no desenvolvimento da lesão periapical em animais *Knockout* do que em animais *Wild-Type*, indicando que o eixo TNF-alfa-TNFR1 é central para o catabolismo ósseo mediado por micro-organismos. Por outro lado, Chen et al., (1999) observaram que a formação de periodontite apical foi mais exacerbada em animais geneticamente modificados para TNF associado a Interleucina-1 na ausência de ambos os receptores, demonstrando assim que a resposta periapical poderia ser mais prejudicada após infecção endodôntica. Alguns trabalhos demonstraram que aos 28 dias a lesão periapical estava estabelecida (Ribeiro-Santos et al. 2019; Paula-Silva et al., 2020a; Paula-Silva et al., 2020b; Petean et al., 2021), corroborando com nossa pesquisa. Contudo, há uma escassez na literatura de estudos demonstrando o desenvolvimento da lesão periapical em períodos superiores a 28 dias, por isso, em nosso estudo decidimos avaliar o desenvolvimento e a cinética da lesão periapical na ausência do TNFR1 nos períodos de 7, 14, 28 e 42 dias.

A formação da lesão periapical foi relativamente limitada nos animais geneticamente modificados para o TNFR1 em relação aos animais *Wild-type* no período de 42 dias. A explicação se dá devido a ligação ocorrer no TNFR2 que, por sua vez, possui uma forte atividade anti-inflamatória e protetora tecidual (Medler e Wajant, 2019). E também do sinergismo que o TNF- $\alpha$  possui com o RANKL, que após a produção da citocina TNF- $\alpha$ , induz a osteoclastogênese de maneira autócrina/parácrina independente do RANKL (Nikolic et al., 2019; AlQranei e Chellaiah, 2020). A literatura relata que o TNF- $\alpha$  é um potente indutor osteoclastogênico, atuando de forma sinérgica ao RANKL (Pagliari et al., 2015) ou de maneira independente (Kobayashi et al., 2000; Yao et al., 2017). Lam et al., (2000) citam que o TNF- $\alpha$  sozinho não é capaz de promover a formação e ação dos osteoclastos, entretanto, quando associado ao RANKL, observaram um aumento na diferenciação de osteoclastos sendo de maneira dose-dependente. As lesões periapicais de pacientes fumantes apresentaram maior marcação de RANKL, uma leve marcação de TNF- $\alpha$ , e menor marcação de OPG e OPN, favorável ao processo de osteoclastogênese (De Paula et al., 2022). Consolidando nossos resultados, que quando a expressão de *Rankl* apresentou-se aumentada nos animais *Wild-Type* nos períodos de 14 e 42 dias observamos também um aumento no número de osteoclastos, e um número inferior nos animais ausentes do receptor 1 do TNF- $\alpha$ .

Alguns trabalhos relatam a ação da OPG na neutralização do processo de osteoclastogênese, e que somente o TNF- $\alpha$  não seria capaz de induzir um aumento desta diferenciação de células osteoclastogênicas e, conseqüentemente, aumentar a reabsorção óssea periapical (Lam et al., 2000; Kobayashi et al., 2000; Thomson et al., 1987; Azuma et al., 2000; Komine et al., 2001). De acordo com nossos achados, com a razão *Rankl/Opn*

observa-se um aumento da expressão de *Rankl* nos animais *knockout* nos períodos de 14 e 28 dias, em concordância, não houve diferença na área e volume da lesão periapical nos períodos de 14 e 28 dias apenas no período de 42 dias nos animais *Wild-Type*. Mostrando o sinergismo entre o RANKL e TNF- $\alpha$  no processo de osteoclastogênese, como visto em alguns trabalhos publicados (Nikolic et al., 2019; AlQranei e Chellaiah, 2020).

Cirelli et al., (2009) relataram os efeitos causados pela inibição do TNFR1 promovida por um vírus adeno-associado (AAV2/1 TNFR:FC) na doença periodontal. O agente que promove a inibição dessa citocina reduz a capacidade de recrutamento de células inflamatórias, além de prevenir a perda óssea alveolar após 56 dias. Após 28 dias níveis reduzidos de RANKL e OPG podem ser observados, além de inibir a formação de células semelhantes a osteoclastos. Confirmando os achados encontrados neste estudo em que na ausência TNFR1 reduziu o recrutamento de neutrófilos na lesão periapical aos 14, 28 e 42 dias, além de possuir uma menor expressão de *Rankl* e *Opg* comparado aos animais *Wild-Type*.

Nossos resultados apresentaram uma expressão RNAm reduzida do *Tnf- $\alpha$*  aos 7 e 28 dias nos animais *Knockout*, e obteve uma menor expressão dos genes *Mmp9*, *Ptsg2* e *Ctsk* no período de 7 dias, sendo assim, podemos inferir que nos períodos iniciais da lesão o TNF- $\alpha$  interfere diretamente no processo de inflamação, degradação da matriz extracelular e reabsorção óssea periapical. Pesquisas demonstram que elevados níveis de TNF- $\alpha$  podem estimular a expressão de *Mmp9*, havendo um desequilíbrio desta metaloproteinase, que ocasiona uma excessiva degradação da matriz extracelular gerando uma destruição tecidual (Sorokin et al., 2010; Maretti-Mira et al., 2011). A proteína CTSK produzida por osteoclastos, também atua no processo de degradação da matriz extracelular, está vinculada perdas ósseas e problemas periodontais, participa principalmente na degradação do colágeno tipo I e tipo II (Novinec et al., 2013).

Sendo assim, observamos uma interação do eixo TNF- $\alpha$ -TNFR1 com os mediadores envolvidos no processo de reabsorção óssea na lesão periapical. A ausência da sinalização do TNF- $\alpha$ -TNFR1 conteve a formação de lesão periapical, concomitantemente com a redução da expressão de genes relacionados à inflamação, degradação da matriz extracelular e catabolismo ósseo.

## 2.5 CONCLUSÃO

A ausência da ligação do eixo TNF- $\alpha$ -TNFR1 limitou a formação da lesão periapical e influenciou no processo inflamatório e no catabolismo ósseo no período inicial da lesão periapical. O TNF- $\alpha$  atuou desde o início do desenvolvimento da lesão periapical e posteriormente associado com o RANKL promoveu um aumento do número de osteoclastos e uma maior lesão periapical.

- A) A área e o volume da lesão periapical foi menor nos animais *Knockout* em comparação aos *Wild-Type* aos 42 dias após a indução da lesão.
- B) O recrutamento de neutrófilos foi menor nos animais *Knockout* em relação aos *Wild-Type* nos períodos de 14, 28 e 42 dias.
- C) O número de osteoclastos foi significativamente menor nos animais *Knockout* comparado ao *Wild-type* no período de 14 e 42 dias.
- D) Menor expressão do gene *Rankl* nos animais *Knockout* no período de 14 e 42 dias, entretanto, *Opg* possuiu menor expressão aos 28 dias após a indução da lesão periapical. Os genes envolvidos com a osteoclastogênese são menos expressos nos períodos iniciais na ausência do TNFR1. Aos 7 dias menor expressão do *TNF- $\alpha$*  induz concomitante a redução dos genes relacionados a inflamação e degradação da matriz extracelular.
- E) A contaminação microbiana aconteceu de forma semelhante em ambos os grupos, podendo-se observar penetração de bactérias no interior dos túbulos dentinários aos 42 dias.

## 3. CAPÍTULO 2

---

### 3. Capítulo 2

#### **A Ausência de Ligação do Eixo TNF- $\alpha$ /TNFR1 Impede o Processo da Neoformação Dentinária**

A indicação para a proteção pulpar direta é exposição pulpar por acidente, sem contaminação ou fratura coronária com exposição pulpar após traumatismo dentário nas primeiras 24 horas com prognóstico favorável (ABOPED, 2020; Silva, 2022). Um material biocompatível deve ser utilizado para promover uma proteção contra contaminação ou novas lesões e também estimular o reparo tecidual (ABOPED, 2020). O Agregado de Trióxido Mineral (MTA) é um material a base de silicato de cálcio, padrão ouro, sendo amplamente utilizado para terapias pulpares radicais e conservadoras, como o caso de proteção pulpar direta e indireta (Giraud et al., 2019; Pushpalatha et al., 2022). Possui biocompatibilidade, ação antimicrobiana, atividade indutora de mineralização e excelente selamento nas margens (Youssef et al., 2019; Babaki, Yaghoubi e Matin, 2020; Toida et al., 2022). As finalidades da proteção pulpar direta são estimular as células da polpa a formação de tecido mineralizado, promover selamento biológico a área de exposição pulpar e evitar a contaminação por micro-organismos da cavidade bucal (Silva, 2022).

O tecido pulpar é circunscrito por uma camada de tecido mineralizado, ou seja, camada de dentina rígida, e possui uma circulação sanguínea terminal (Giraud et al., 2019). O tecido pulpar possui mecanismos de defesa para regulação da inflamação e regeneração tecidual, em que o processo de reparo está envolvido inicialmente pela camada de odontoblastos, localizado na porção mais externa da polpa dentária (Giraud et al., 2019; Liu et al., 2020). Após uma agressão a cárie, a resposta biológica dos odontoblastos é a extensão ou formação de uma barreira mineralizada, com o objetivo de se afastar da propagação da infecção (Horst et al., 2011). Por outro lado, os fibroblastos da polpa expressam receptores de reconhecimento padrão, que possuem a capacidade de detectar micro-organismos invasores através de reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos (PAMPs) (Giraud et al., 2019). Após este processo, se inicia uma cadeia de respostas inflamatórias através da via NF- $\kappa$ B, estimulando a liberação de mediadores e citocinas pró-inflamatórias (Giraud et al., 2019).

O TNF- $\alpha$  é uma citocina ligada ao processo inflamatório produzido por macrófagos e linfócitos T. Inicialmente é expresso na membrana plasmática e após ser clivado pela enzima TACE ou ADAM-17 se torna solúvel e participa dos processos biológicos (Bradley, 2008; Jang et al., 2021). Possui sua forma trimérica, tanto na forma solúvel ou de membrana, que induzem



respostas distintas. A TACE faz a clivagem do TNF- $\alpha$  o deixando no formato solúvel, além de interferir em diversas proteínas ou receptores de membrana celular, como TNFR1 e TNFR2 permitindo a neutralização das ações do TNF- $\alpha$ . Sendo assim a TACE pode ser a favor ou contra a inflamação (Bradley, 2008; Jang et al., 2021). Segundo estudos anteriores, o TNF- $\alpha$  não está presente em pacientes saudáveis, entretanto, em processos inflamatórios ou infecciosos pode ser encontrado (Nurnberger et al., 1995; Robak; Gladalska e Stepień, 1998).

Os receptores do TNF- $\alpha$ , denominados TNFR1 e TNFR2, possuem efeitos antagonistas, por sua vez, o TNFR1 está localizado em todo tecido humano e na via de sinalização do TNF- $\alpha$  é o principal receptor. Já o TNFR2 é mais comum sua expressão em células imunes e possui limitação nas respostas biológicas (Jang et al., 2021). Relacionado ao processo de reparo, o TNF- $\alpha$  se liga ao TNFR1 na via de sinalização do complexo I, formado na membrana plasmática, já os complexos IIa, IIb, IIc são realizados no citoplasma. O complexo I inicia-se na ligação TNFR1 ao TRADD, ao que desencadeia uma reação de vários componentes, incluindo serina/treonina-proteína quinase 1 de interação com o receptor (RIPK1), fator 2 ou 5 associado ao TNFR (TRAF2/5), inibidor celular da proteína de apoptose 1 ou 2 (cIAP1/2), e o complexo de montagem da cadeia de ubiquitina linear (LUBAC), resultando a ativação do fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). A resposta final deste complexo é favorável ao processo de inflamação, viabilidade e proliferação celular e a defesa imunológica contra patógenos (Kallioli e Ivashkiv, 2016; Holbrook et al., 2019; Jang et al., 2021).

A ligação do TNFR2 no complexo I, desencadeia a interação com TRAF1 ou 2 para recrutar cIAP1 ou 2, obtendo como resposta a sinalização de manutenção da viabilidade celular e a indução de NF- $\kappa$ B, MAPK e Akt, ativando o processo de proliferação celular e regeneração tecidual. O papel regulatório principalmente pela via TNFR1 se dá devido a ligação ao TRAF2 ser mais fraca do que ao TRADD (Holbrook et al., 2019). Estudos apontam que o TNF- $\alpha$  promove a formação de estruturas semelhantes vasos sanguíneos de cultura de sistema de células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) e células-tronco de dente permanente (hDPSCs) (De-Deus et al., 2015; Versiani et al., 2016; An et al., 2019). Em cultura de células mesenquimais indiferenciadas da polpa dentária, o TNF- $\alpha$  induz a proliferação, migração e diferenciação de células com um fenótipo mineralizador (Paula-Silva et al., 2009a; El Karim et al., 2015; Shi et al., 2017, Xu et al., 2018; Zhang et al., 2018). Esse papel na diferenciação celular é concentração-dependente, uma vez que em baixas concentrações induz a diferenciação e em altas concentrações inibe, possivelmente devido à ativação de diferentes vias de sinalização: proteínas quinase ativadoras de mitose (MAPK) ou do fator de transcrição nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (Paula-Silva et al., 2009a; Qin et al., 2015).

Alguns estudos relatam que em dentes cariados ou com defeitos minerais a expressão de TNF- $\alpha$  é aumentada e está associado aos sinais e sintomas clínicos, tudo isso porque em dentes com cáries profundas o tecido dentário irá receber uma grande quantidade de TNF- $\alpha$ , ao qual ativará canais como TRP (TRPA1, TRPV2 e TRPV4) no tecido pulpar e estão envolvidos no processo de manutenção da inflamação e dor (Horst et al., 2011; Liu et al., 2020). Como os estudos na literatura ainda são conflitantes em relação ao processo saúde e doença associado ao TNF- $\alpha$ , estima-se que através do conhecimento da via de sinalização do TNF- $\alpha$ -TNFR1, novas terapias com biologia molecular possam ser realizadas.

### 3.1 PROPOSIÇÃO

#### 3.1.1 *Objetivo Geral*

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o papel do TNF- $\alpha$  no processo de reparo pulpar após proteção pulpar direta com MTA, utilizando como modelo experimental camundongos geneticamente deficientes do receptor-1 do mediador (TNFRSF1) comparativamente a animais selvagens (C57BL6).

#### 3.1.2 *Objetivos Específicos*

- A) Mensurar a área da dentina neoformada por meio de microscopia de fluorescência após a proteção pulpar direta;
- B) Avaliar a inflamação local dos tecidos por meio da quantificação de neutrófilos em microscopia óptica;
- C) Classificar a contaminação microbiana no tecido pulpar e periapical por meio de análise microscópica no reparo pulpar, pelo método de Brown e Breen Modificado;
- D) Analisar os mediadores envolvidos no processo de reparo pulpar TNF- $\alpha$ , RUNX-2, OPN e DSP por meio da Imunohistoquímica.

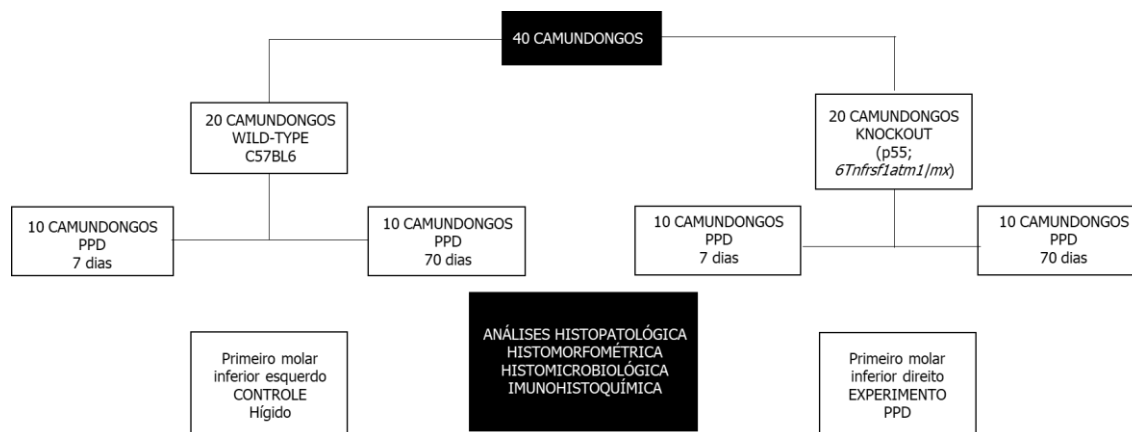
## 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.2.1 Animais

Após a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (Processo no 2019.1.139.58.0) (Anexo A) e pela Comissão Interna de Biossegurança da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) (Projeto nº 0040/98.004-01.06/2020) (Anexo B), os procedimentos foram realizados nos animais e guiados pelas diretrizes éticas da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de São Paulo – Campus de Ribeirão Preto, e baseados no guia *ARRIVE* para estudos em animais (Percie du Sert et al., 2020) e de acordo com o *Preferred Reporting Items for Animal Studies in Endodontology* - PRIASE 2021 (Nagendrababu et al., 2021).

O delineamento experimental seguiu o estudo de Collignon et al., (2017). Assim, quarenta camundongos machos (*Mus musculus*), vinte C57BL/6 (*Wild-Type*) provenientes do Biotério Central da USP Campus de Ribeirão Preto e vinte camundongos geneticamente deficientes (*Knockout*) para o receptor-1 de TNF-  $\alpha$  (p55; *6-Tnfrsf1atm1 / mx*) obtidos do Jackson Immuno Research Laboratories (Bar Harbor, Maine, EUA) e fornecidos pelo Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, com idade entre seis a oito semanas, pesando de 20 a 22 gramas foram utilizados para o experimento. Os animais foram mantidos no Biotério I da FORP-USP, alocados em gaiolas de polipropileno e tampas de aço inoxidável perfurado, de 15 × 20 cm (5 animais por gaiola), forradas com maravalha, em temperatura de 22°C e umidade relativa do ar (55 ± 10%) constantes, em um ciclo de claro-escuro de 12:12 horas, durante todo o período experimental, com dieta padrão de laboratório e livre acesso à água filtrada. Após a proteção pulpar Direta foram realizadas as análises histopatológicas, histomorfométricas, histomicrobiológicas e imunohistoquímica (Figura 22).

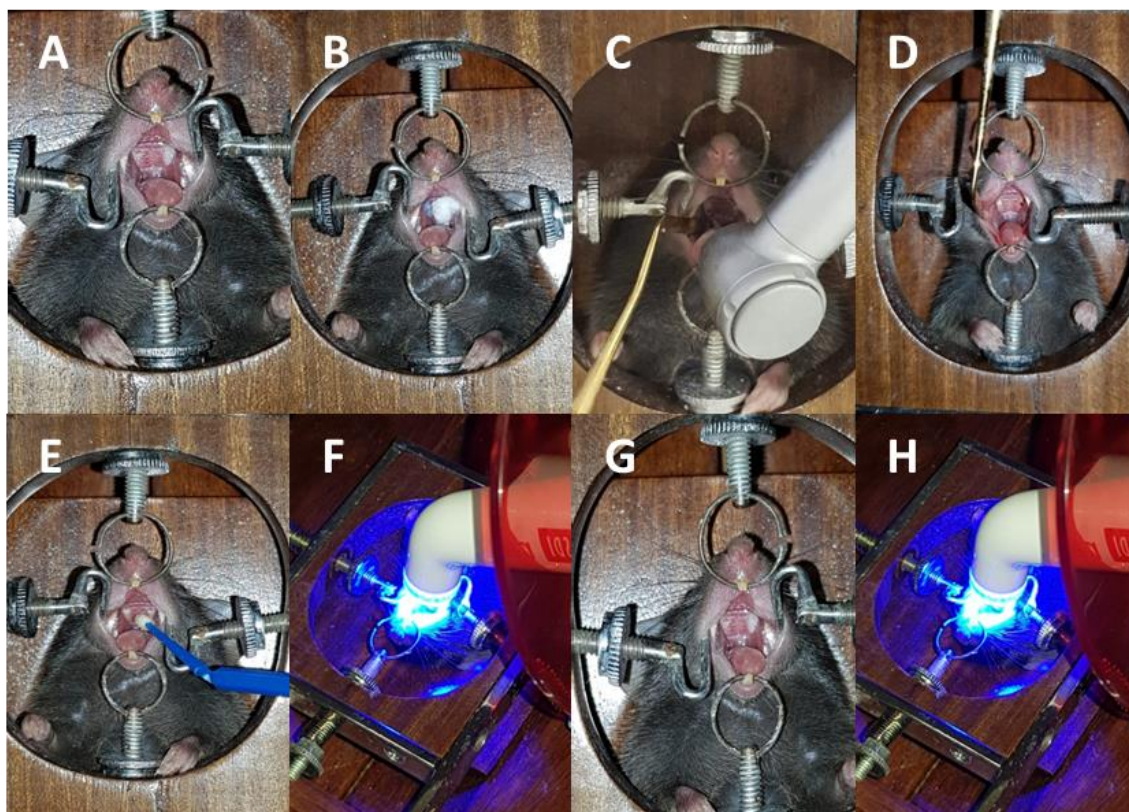
**Figura 22** - Fluxograma representativo da divisão e quantidade dos animais dos grupos *Wild-Type* e *Knockout*, e os tipos de análises que foram realizadas. PPD = Proteção Pulpar Direta.



### 3.2.2 Proteção Pulpar Direta

Para os procedimentos operatórios os animais foram anestesiados com cloridrato de ketamina a 10% (150 mg / kg; Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, SP) e xilazina a 2% (7,5 mg / kg; Dopaser, Laboratórios Calier S/A, Barcelona, Espanha) diluídos em soro fisiológico a 0,9% (1 ml de Ketamina + 0,3 ml de Xilazina + 4,6 ml de soro fisiológico), por via intramuscular na coxa traseira, complementado com sedação inalatória com Isoflurano a 1% (Isoforine, Cristalia Produtos Químicos Farmaceuticos Ltda., São Paulo, SP, Brasil). Os camundongos *Wild-Type* e *knockout* foram posicionados em uma mesa cirúrgica com dispositivo para retração mandibular, permitindo a imobilização dos animais e manutenção da boca aberta, para acesso aos primeiros molares inferiores e superiores (Figura 23A). Anteriormente a abertura realização da cavidade de Classe I foi feito o condicionamento ácido por 30 segundos, para evitar risco de contato do ácido com o tecido pulpar (Figura 23B). Cavidades de classe I foram realizadas pela face oclusal, utilizando uma broca carbide tamanho ¼ de haste curta (KG Sorensen Ind. Com. Ltda., Barueri, SP) de alta rotação, até atingir profundidade suficiente para ocasionar uma exposição do tecido pulpar (Simon et al., 2008; Collignon et al., 2017) (Figura 23C). A seguir, o tecido pulpar exposto foi irrigado com soro fisiológico a 0,9% (Eurofarma, Ribeirão Preto, SP), seco com uma bolinha de algodão estéril e inserido o agregado de trióxido mineral branco (MTA Angelus Cimento Reparador; Angelus® Indústria de Produtos Odontológicos S/A, Londrina, PR), manipulado de acordo com as instruções do fabricante (Figuras 23D). Posteriormente, foi realizado o uso do sistema adesivo de dois passos e as cavidades foram restauradas com resina composta (Filtek™ Z100; 3M ESPE, St. Paul, MN, EUA) (Figura 23E, 23F, 23G, 23H) (n= 10 por período). Como controle, foram utilizados dentes hígidos (n= 5 por período). O período de avaliação foi realizado aos 7 e 70 dias após a proteção pulpar direta.

**Figura 23** - Fotos representativas do experimento de proteção pulpar direta em camundongos (**A-H**). Camundongo posicionado na mesa cirúrgica de retração mandibular (**A**). Condicionamento ácido com isolamento relativo (**B**). Abertura coronária, acesso ao tecido pulpar e posteriormente irrigação com soro fisiológico 0,9% (**C**). Após secagem, inserção e condensação do MTA na cavidade (**D**). Aplicação do sistema adesivo com *microbrush* (**E**). Fotopolimerização por 30 segundos (**F e H**). Inserção incremental da resina composta (**G**).



### 3.2.3 Processamento histotécnico das amostras

Após a anestesia e eutanásia em câmara de CO<sub>2</sub>, os tecidos foram dissecados e removidos com tesoura cirúrgica. Os blocos contendo dentes e ossos da mandíbula foram fixados em formalina tamponada a 10% por 24 h em temperatura ambiente e em seguida, lavadas por aproximadamente 4 horas em água corrente. A desmineralização foi feita em ácido etilenodiaminotetracético a 5% (EDTA; pH 7,4; Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro, RJ, Brasil), por aproximadamente 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 à técnica histológica de rotina, sendo lavadas em água corrente por 4 horas, desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70%, 80% e 95% por 45 minutos cada; 3 trocas de 100% por 45 minutos cada), diafanizadas em xilol (álcool/xilol por 30 minutos e 3 banhos de 40 minutos de xilol) e incluídas em parafina I por 2 horas e parafina II por 2 horas. Os blocos foram seccionados longitudinalmente em micrótomos HYRAX M60 (Carl Zeiss microImaging GmbH, Jena, Alemanha), na direção vestibulo-lingual, para obter amostras com espessura de 5 µm. Por

amostra, foram obtidos de 10 a 15 lâminas, com 3 cortes em cada lâmina. Inicialmente as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação histopatológica e histomorfométrica, pelo método de Brown & Brenn modificado para identificação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e por imunohistoquímica para identificação de marcadores de inflamação e mineralização.

### *3.2.3.1 Avaliação Histopatológica e Histomorfométrica*

A análise do tecido dentinário mineralizado neoformado foi em lâminas coradas por hematoxilina e eosina utilizando o microscópio Zeiss Axio Imager (Upright microscope, Carl Zeiss AG Light Microscopy, Göttingen, Alemanha), em campo claro, sem conhecimento prévio do grupo experimental ao qual o espécime pertencia (De Rossi et al. 2007; De Rossi et al. 2008; Paula-Silva et al. 2009b). Para realização das medidas foi utilizado parâmetros como espessura e área de dentina neoformada e a resposta inflamatória local, conforme descrito previamente por nosso grupo de pesquisa (Silva et al., 2007; Silva et al., 2017; Queiroz et al., 2019). O espaço do ligamento periodontal ou a lesão periapical foi medido para análise quantitativa, de acordo com parâmetros descritos anteriormente (De Rossi et al. 2008, Paula-Silva et al. 2009c; Petean et al., 2021). Para análise morfométrica da área de lesão periapical, videomicroscopia foi usada com Zeiss Axio Imager (Upright microscope, Carl Zeiss AG Light Microscopy), com ampliação de 10x. O microscópio foi operado em modo de fluorescência (excitação em 450-490 nm, espelho dicromático de 510-515 nm) (De Rossi et al., 2008; Paula-Silva et al., 2009b, Paula-Silva et al., 2009d). Para cada espécime, a área de lesão periapical foi delineada e medida em  $\mu\text{m}^2$  nas seções que representam o maior diâmetro da lesão. O delineamento da lesão foi incluído áreas de reabsorção e infiltrado inflamatório. Os períodos analisados foram de 7 e 70 dias.

### *3.2.3.2 Recrutamento de Neutrófilos Polimorfonucleares na Polpa e Região Periapical*

O número de neutrófilos foi contado utilizando lâminas coradas por HE em microscopia de luz convencional, nos períodos de 7 e 70 dias. Foram selecionados seis campos de visão, sendo três no tecido pulpar (terço cervical, médio e apical) e três campos ao redor do ápice radicular, localizados a uma distância pré-determinada e posicionados no centro do canal radicular e a 45° à esquerda e à direita do centro do canal (Paula-Silva et al., 2009d; Paula-Silva et al., 2020b). Os neutrófilos foram identificados de acordo com sua morfologia característica de células escuramente coradas com núcleos multilobulados em formato de ferradura.

### 3.2.3.3 *Análise Histomicrobiológica*

Os cortes foram corados pelo método de Brown & Brenn modificado para evidenciação de micro-organismos aos 7 e 70 dias (Engbaek et al., 1979; De Rossi et al., 2008; Paula-Silva et al., 2010a; Paula-Silva, 2016). Inicialmente foram desparafinizados, hidratados e imersos em solução de cristal violeta (Ecibra, Cetus Ind. Com. Prod. Quim. Ltda., São Paulo) tamponada com bicarbonato de sódio (Merck S.A. Indústrias Químicas, Rio de Janeiro) a 5% por 30 segundos. A seguir, as lâminas foram imersas em solução de iodo por 10 segundos, lavadas em água destilada e mergulhadas em solução de éter-acetona (1:1), logo após, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em fucsina básica a 0,25 mg / mL (1 minuto), lavadas novamente em água destilada e posteriormente imersas em ácido pícrico aquoso (2:4:4 Trinitrophenol, C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>(OH)(NO<sub>2</sub>)<sub>3</sub> - May & Baker Ltda., Inglaterra), por 2 minutos. A seguir, foram lavadas novamente em água destilada e foram mergulhadas em acetona p.a. (CH<sub>3</sub>COCH<sub>3</sub>, Ecibra) por 15 segundos seguida por imersão rápida em acetona-xilol (1:1) e montadas em Entellan® (Merck). Os micro-organismos foram observados em microscopia de luz convencional, com imersão à óleo, no aumento de 100×, efetuando-se a diferenciação entre Gram-negativos e Gram-positivos. Com esta coloração, as bactérias Gram-positivas são coradas em azul e as bactérias Gram-negativas em vermelho. No modelo de proteção pulpar direta, as lâminas serão avaliadas quanto a (0) ausência ou (1) presença de bactérias.

### 3.2.3.4 *Imunohistoquímica*

As lâminas foram desparafinizadas, hidratadas em série decrescente de álcoois e mantidas em salina fosfatada tamponada (PBS). As lâminas foram submetidas à recuperação dos epítomos antigênicos utilizando solução tampão de citrato de sódio (pH 6,0) aquecido a 83°C no microondas (20 ciclos de 12 seg com intervalo de 2 min). Depois da temperatura estabilizada, as lâminas foram lavadas com PBS (3x) por 5 min, e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueado com peróxido de hidrogênio a 3% por 60 min. Os cortes foram ainda lavados com PBS (3x) por 5 min e sítios de ligação não específicos foram bloqueados com 5% de bovinos albumina sérica (Sigma-Aldrich) por 60 min. Os tecidos foram então incubados com anticorpos primários para fator de necrose tumoral-α (TNF-α 1:100 / sc-52746, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), Osteopontina (OPN 1:50 / sc-21742, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), sialofosfoproteína dentária (DSP 1:50 / sc-33587, Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA), fator de transcrição 2 (RUNX-2 1:100 / ab-23981, Abcam, Cambridge, UK), em 4°C durante a noite. Em seguida, as lâminas foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti-mouse (1:200 / m-IgG KBp-B: sc-516142; Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA) exceto aos cortes de RUNX-2 e OPN que o anticorpo



secundário foi anti-rabbit (1:200 / mouse anti-rabbit IgG-B: sc-2491; Santa Cruz Biotechnology Dallas, Texas, EUA) por 1 h, lavado em PBS e incubado com Complexo Avidina e Biotina (Kit ABC; Vector, Vectastain® ABC Kit No. PK- 4000) por 30 min. 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich) foi usado como o substrato da enzima por até 5 min, as lâminas foram lavadas com PBS, contrastado com hematoxilina por 30 segundos, lavadas com água destilada, desidratada em álcool em crescentes concentrações e montadas em Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha). Os cortes de controle em que o anticorpo primário foi omitido foi usado para testar a especificidade da imunocoloração. Os dados de proteína foram analisados usando imagem deconvolução de acordo com Landini; Martinelli e Piccinini et al., (2021). Resumidamente, para quantificação de imunocoloração, o software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) e o plugin de deconvolução de imagem (cor de convolução). Hematoxilina e Filtros DAB foram aplicados. Para medir a intensidade de coloração, as ferramentas de 'densidade integrada' e 'área' foram usados. Os dados são expressos como unidades arbitrárias por  $\mu\text{m}^2$ .

#### *3.2.4 Análise Estatística*

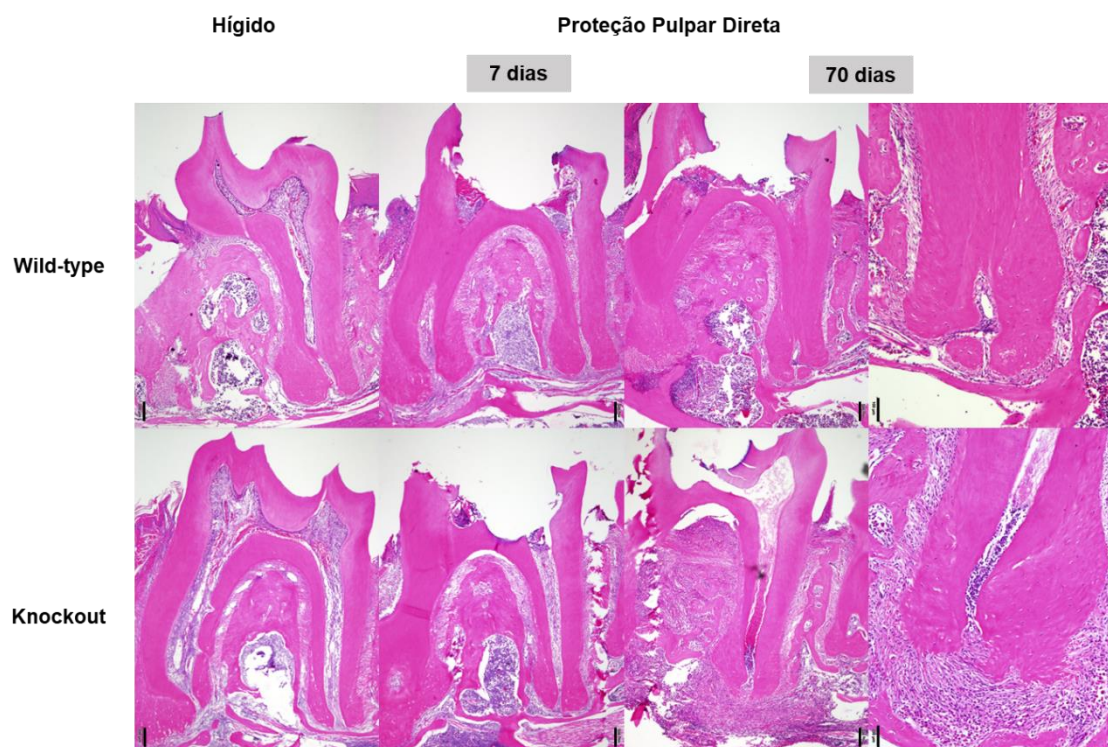
Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o Software GraphPad Prism 8.0 (Prism, Chicago, IL, EUA). Para as análises de neoformação de tecido mineralizado, extensão de tecido mineralizado neoformado, necrose pulpar e lesão periapical foi teste do Qui-Quadrado. Para a área da região periapical, o número de neutrófilos na região periapical, na polpa e imunohistoquímica foi através de ANOVA de uma via seguida de pós-teste de Tukey. Para a área de tecido mineralizado, foi utilizado o teste t de Student. Adotando o nível de significância de 5%. A análise histomicrobiológica foi qualitativa através de escores.

### 3.3 RESULTADOS

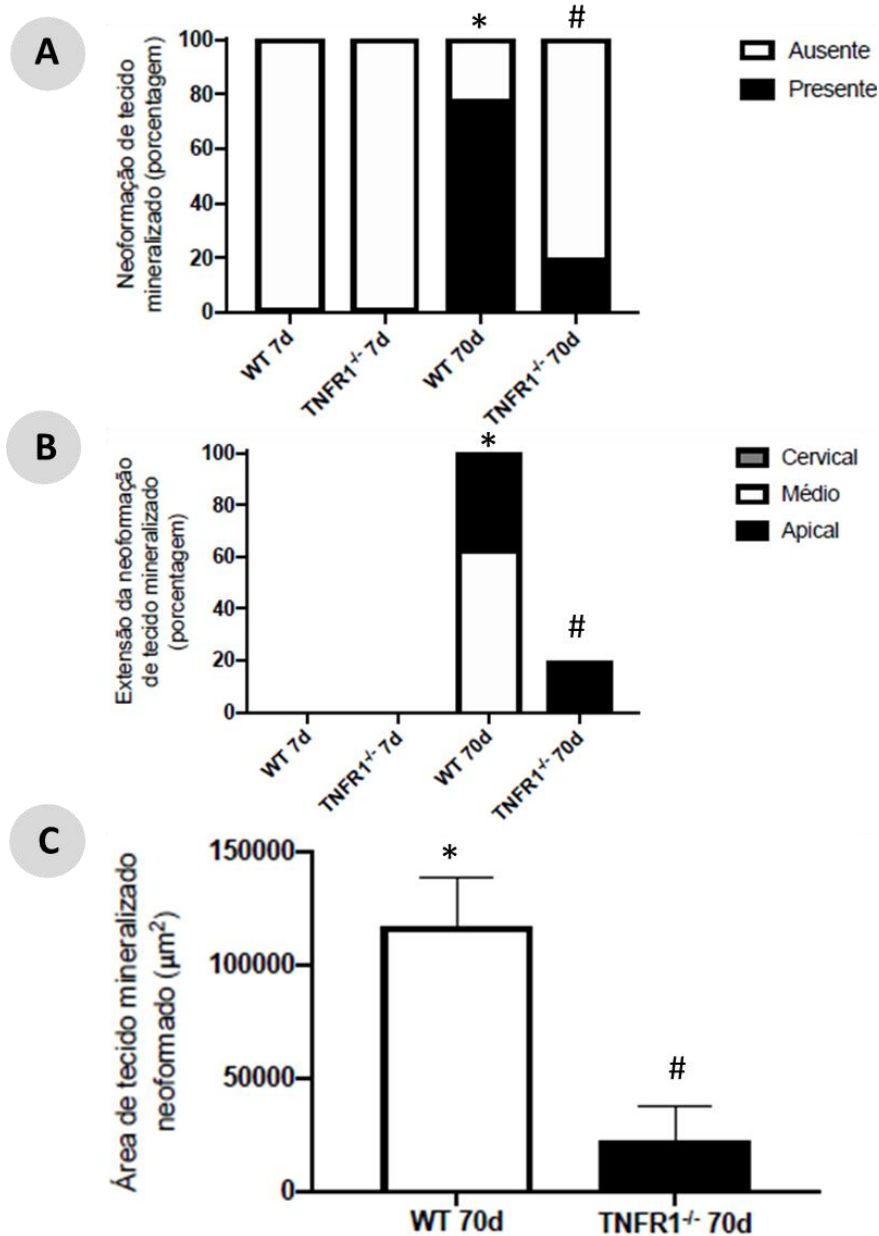
#### 3.3.1 A Neoformação de Tecido Mineralizado foi Limitada na Ausência do TNFR1

A neoformação do tecido mineralizado foi visivelmente menor no grupo *Knockout* em relação ao *Wild-Type* no período de 70 dias. Aos 7 dias não houve formação de tecido mineralizado em ambos os grupos (Figura 24). Aos 70 dias cerca de 80% dos dentes avaliados *Wild-Type* apresentaram formação de mineral no canal radicular e apenas 20% nos animais *Knockout* ( $p < 0,0001$ ) (Figura 25A). A mineralização ocorreu até o terço médio em 60% dos casos e até o terço apical em 40% dos casos nos *Wild-Type*, entretanto, nos dentes do grupo *Knockout* que mineralizaram, foram até a região apical ( $p < 0,05$ ) (Figura 25B). Os animais geneticamente modificados para o TNFR1 apresentaram uma menor área de tecido mineralizado em comparação aos animais *Wild-Type* ( $P < 0,0001$ ) (Figura 25C).

**Figura 24** - Fotomicrografias representativas de dentes hígidos e após a proteção pulpar direta aos 7 e 70 dias em HE. Ampliação original de 4x e 10x (escala = 200 $\mu$ m e 100 $\mu$ m)



**Figura 25** - Representação gráfica da porcentagem da neoformação de tecido mineralizado no interior dos canais radiculares após a proteção pulpar direta aos 7 e 70 dias ( $p < 0,0001$ ) **(A)**. Representação gráfica em porcentagem da extensão da neoformação de tecido mineralizado no interior do canal radicular após a proteção pulpar direta aos 7 e 70 dias ( $p < 0,0001$ ) **(B)**. Representação gráfica da área de tecido mineralizado em  $\mu\text{m}^2$  após a proteção pulpar direta aos 70 dias ( $p < 0,0001$ ) **(C)**. Nota: Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.

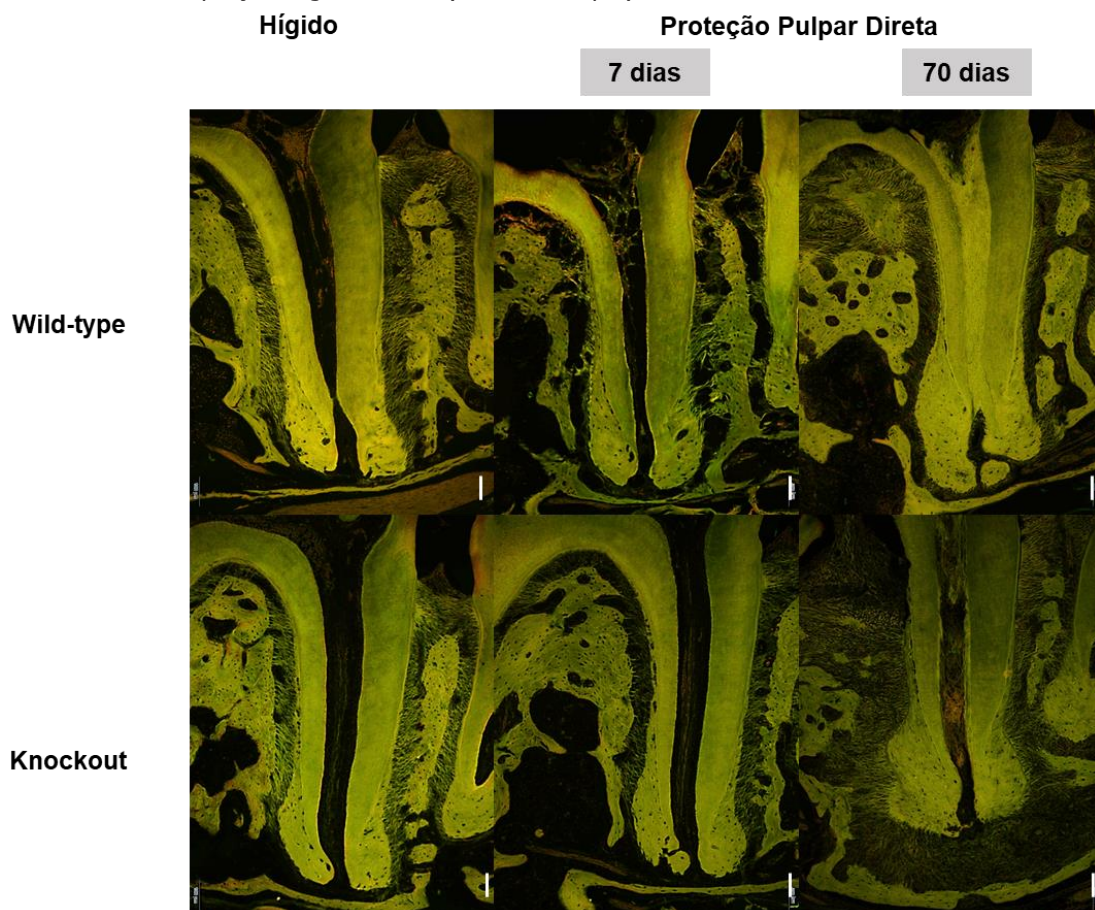


### 3.3.2 A Ausência do Receptor 1 do TNF- $\alpha$ Ocasinou a Formação da Lesão Periapical Caracterizada Pelo Recrutamento de Células Inflamatórias, em Ambiente Livre de Contaminação Bacteriana

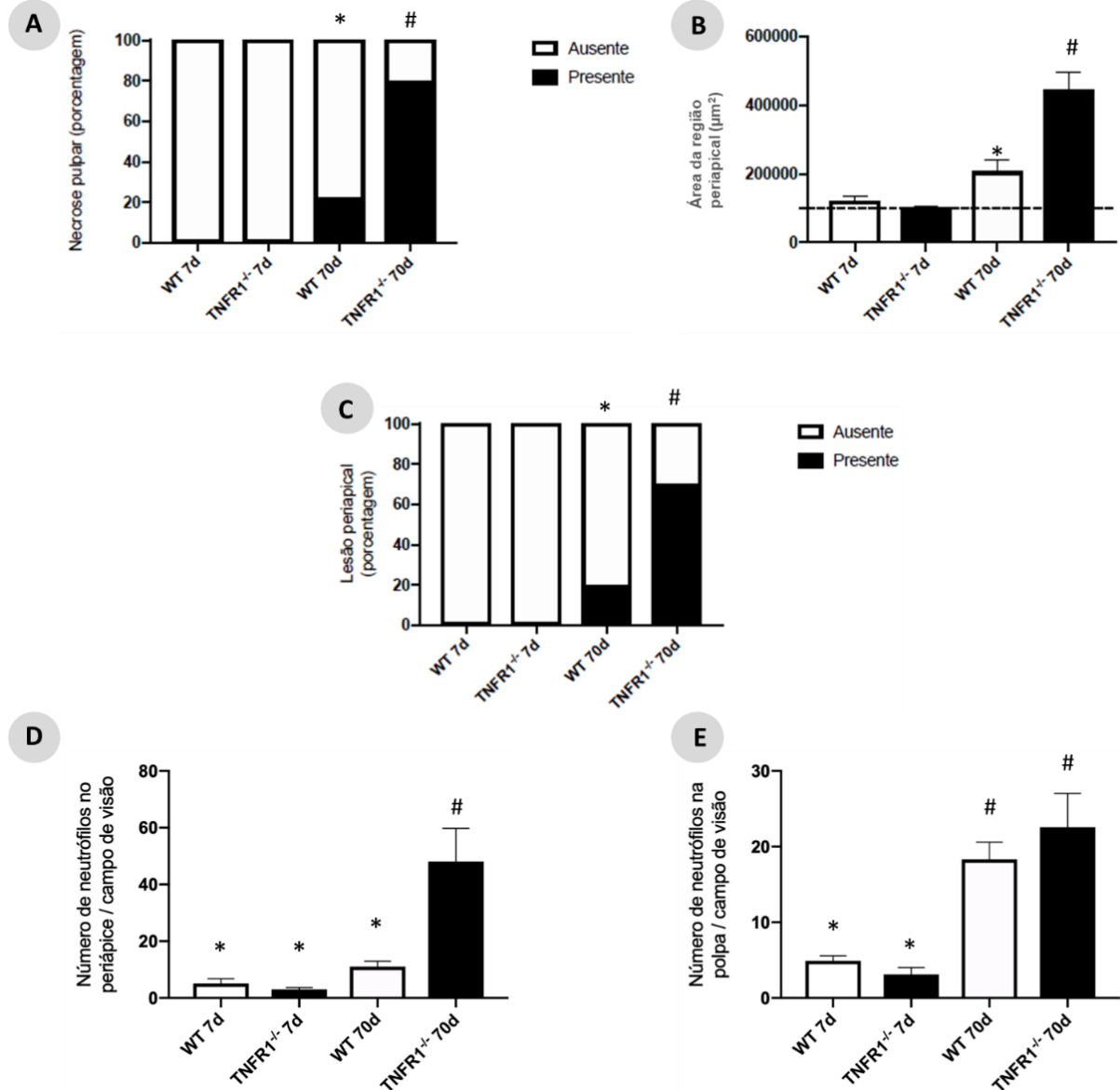
A região periapical permaneceu íntegra em ambos os grupos no período de 7 dias e aos 70 dias apenas nos *Wild-Type*, enquanto que, os *Knockout* apresentaram reabsorção óssea e lesão periapical (Figura 26). Aos 7 dias não observamos necrose do tecido pulpar em ambos os grupos ( $p > 0,05$ ), entretanto, no período de 70 dias os animais *Knockout* apresentaram maior número de dentes com necrose pulpar em comparação aos *Wild-Type* ( $p < 0,0001$ )

(Figuras 24 e 27A). A área da região periapical estava aumentada no período de 70 dias em ambos os grupos, porém em maior escala na falta do TNFR1 ( $p < 0,0001$ ) (Figura 27B). Ao qual, houve a formação da lesão periapical nos animais geneticamente modificados para receptor 1 do TNF- $\alpha$  ( $p < 0,0001$ ) (Figuras 24 e 27C). O recrutamento de neutrófilos foi mais exacerbado na região periapical nos animais *Knockout* no período de 70 dias ( $p = 0,0003$ ) (Figura 27D). No tecido pulpar aos 70 dias os grupos apresentaram maior número de neutrófilos comparado aos 7 dias ( $p < 0,0001$ ). Entretanto, não houve diferença estatística no recrutamento de neutrófilos no interior do canal radicular aos 70 dias entre *Wild-Type* e *Knockout* ( $p = 0,6279$ ) (Figura 27E). Não houve presença de bactéria em nenhum grupo analisado, assim, mostrando a ausência de contaminação na polpa dentária e nas paredes dentinárias (Figura 28).

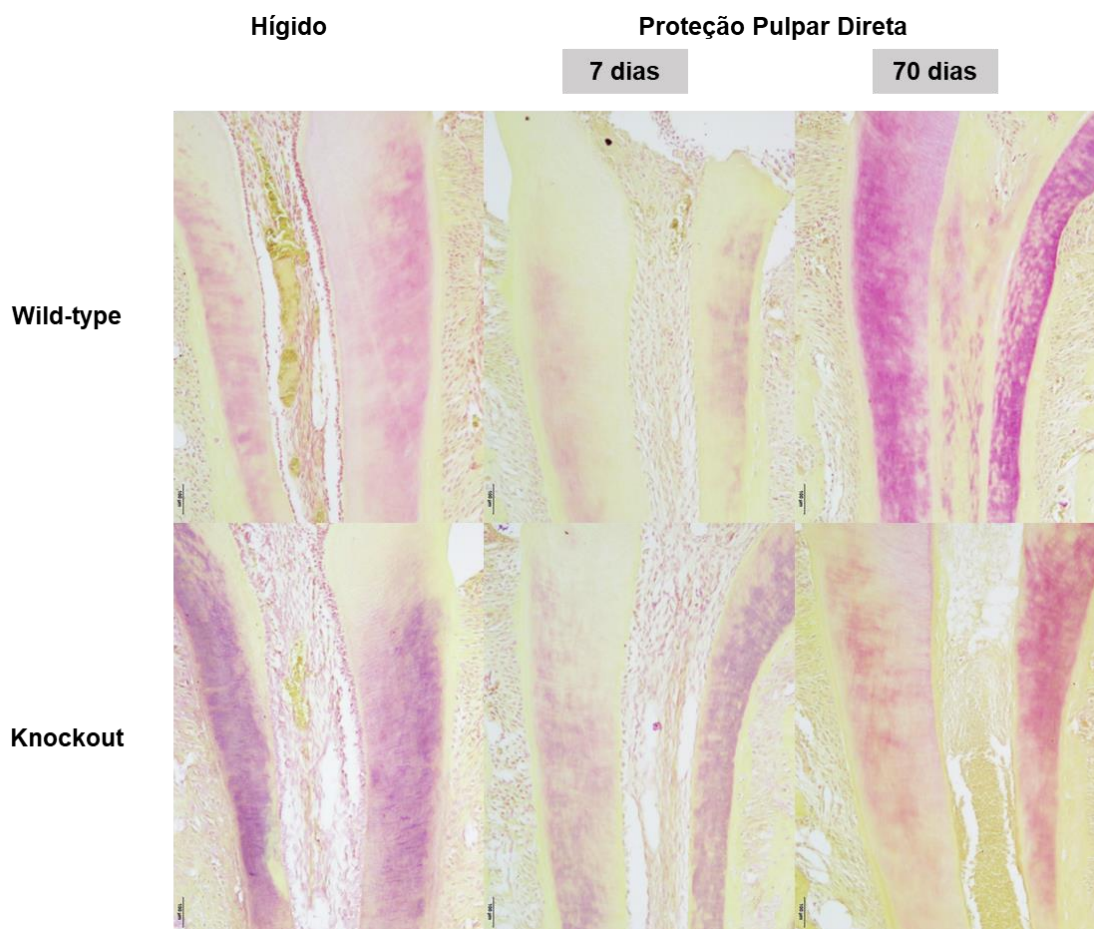
**Figura 26** - Fotomicrografias representativas de dentes hígidos e após a proteção pulpar direta aos 7 e 70 dias em Fluorescência. Ampliação original de 10x (escala = 100 $\mu$ m).



**Figura 27** - Representação gráfica da porcentagem de dentes com necrose pulpar após a proteção pulpar direta aos 7 e 70 dias ( $p < 0,0001$ ) **(A)**. Representação gráfica da área em  $\mu\text{m}^2$  da região periapical após a proteção pulpar direta aos 7 e 70 dias ( $p < 0,0001$ ) **(B)**. Representação gráfica da porcentagem de dentes com lesão periapical após a proteção pulpar direta aos 7 e 70 dias ( $p < 0,0001$ ) **(C)**. Representação gráfica do número de neutrófilos na região periapical após a proteção pulpar direta aos 7 ( $p = 0,9936$ ) e 70 dias ( $p = 0,0003$ ) **(D)**. Representação gráfica do número de neutrófilos no tecido pulpar após a proteção pulpar direta nos períodos de 7 ( $p = 0,9570$ ) e 70 dias ( $p > 0,6279$ ) **(E)**. Nota: Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.



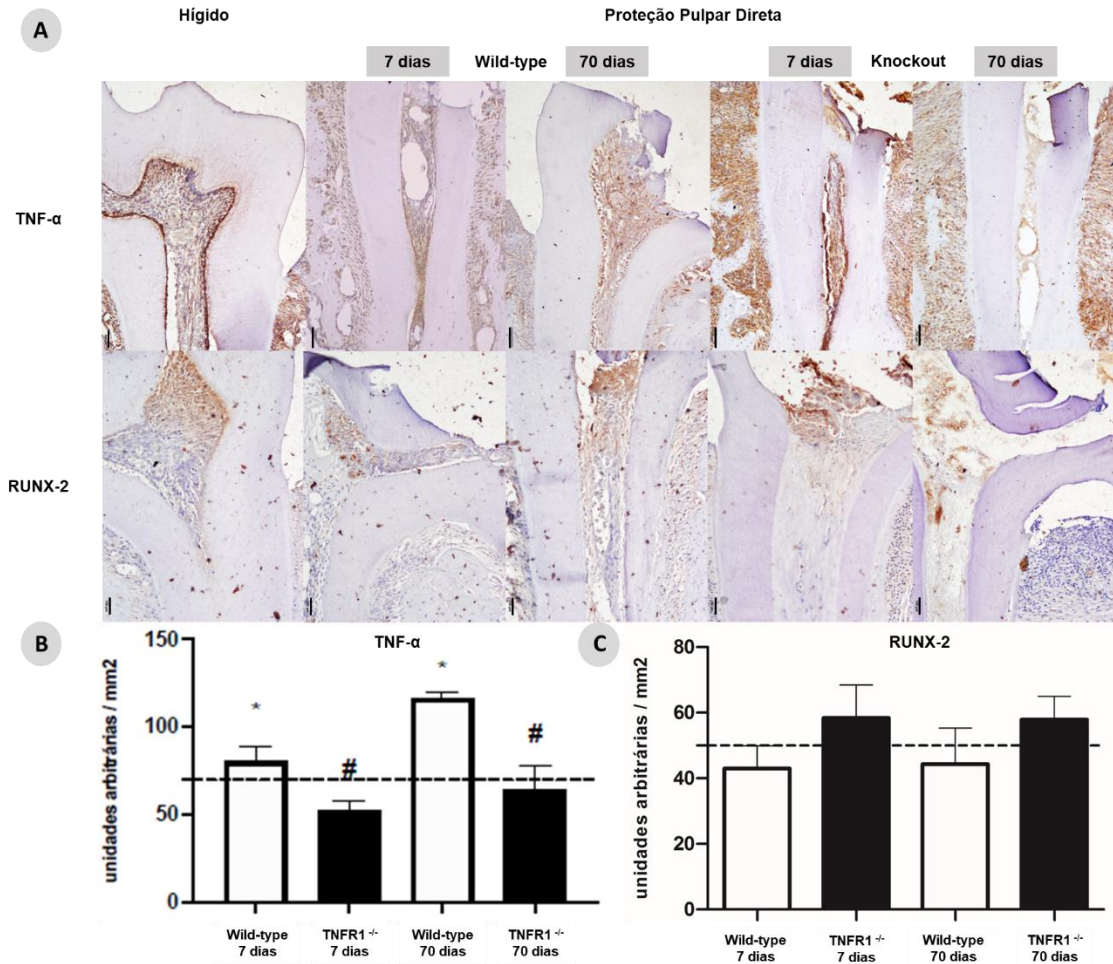
**Figura 28** - Fotomicrografias representativas da penetração bacteriana após a proteção pulpar direta com MTA aos 7 e 70 dias. Amplificação original de 10x (escala = 100µm).



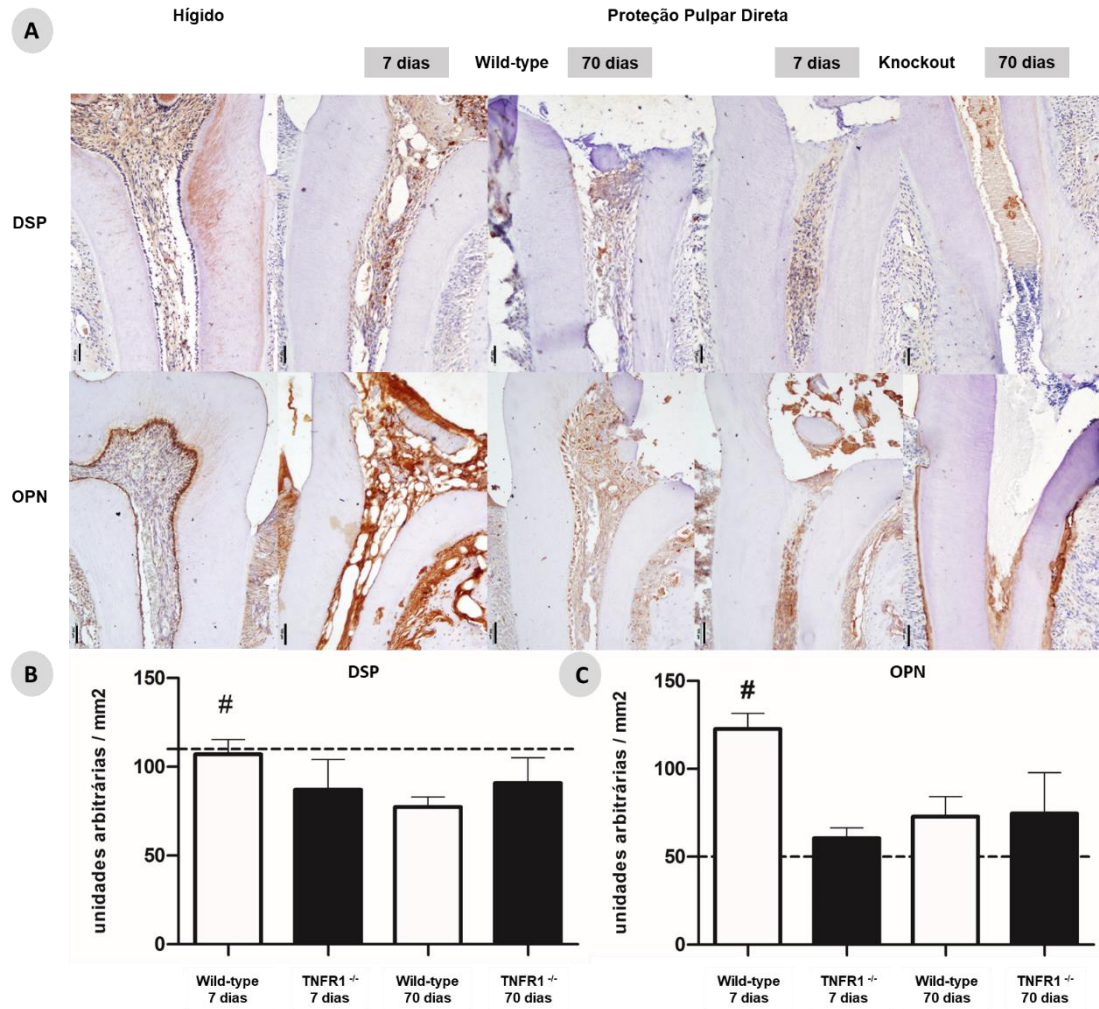
### 3.3.3 A Ablação do TNFR1 Reduz a Produção de Marcadores Associados a Mineralização

Os animais *Knockout* apresentaram menor marcação de TNF- $\alpha$  na região da exposição pulpar ou área subjacente ao tecido mineralizado aos 7 e 70 dias ( $p > 0,05$ ) (Figuras 29 A e B). Por sua vez, a marcação para a síntese de proteína RUNX-2 não apresentou diferença entre os grupos analisados ( $p > 0,05$ ) (Figuras 29 A e C). Interessantemente, na ausência do TNFR1, os marcadores de mineralização se mostraram reduzidos, tanto para DSP ( $p = 0,0003$ ), quanto para OPN ( $p = 0,0289$ ) (Figura 30). Demonstrando, que a via TNF- $\alpha$ -TNFR1 quando ausente, inibe a marcação de mediadores envolvido no processo de mineralização.

**Figura 29** - Fotomicrografias representativas da coloração imunohistoquímica de TNF e RUNX-2 (A). Amplificação original de 10x (escala = 100µm). Representação gráfica da quantificação por imunocoloração da síntese protéica de TNF (B) e RUNX-2 (C) usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil). A linha tracejada indica a marcação em dentes hígdos. Nota: Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.



**Figura 30** - Fotomicrografias representativas da coloração imunohistoquímica de DSP e OPN (A). Amplificação original de 10x (escala = 100 $\mu$ m). Representação gráfica da quantificação por imunocoloração da síntese protéica de DSP (B) e OPN (C) usando deconvolução de imagem (mediana e intervalo interquartil). A linha tracejada indica a marcação em dentes hígidos. Nota: Símbolos diferentes indicam diferença estatística entre os grupos.





### 3.4 DISCUSSÃO

A neoformação do tecido mineralizado após a proteção pulpar direta com MTA foi limitada nos animais geneticamente modificados para o receptor 1 do TNF- $\alpha$ . Além de que, o tecido pulpar foi necrosado e houve a formação da lesão periapical na ausência do TNFR1. O TNF- $\alpha$  regula processos celulares relacionados a resposta imune durante processos inflamatórios e infecciosos (Xu et al., 2018). *In vivo*, foi detectado maior expressão do TNF- $\alpha$  em polpa inflamada de ratos anteriormente a pulpotomia (Minic et al., 2021). Alguns estudos avaliam a produção de TNF- $\alpha$  com materiais para terapia pulpar vital como MTA e Biodentine e relatam diferenças entre a produção desta citocina nas células pulpares (Omid et al., 2020; Silva et al., 2016). Todavia, um estudo demonstrou que o material Biodentine reduz a liberação de TNF- $\alpha$  em células semelhantes a odontoblastos (El Karin et al., 2016). Após a proteção pulpar direta com MTA ou Biodentine em modelo experimental, observaram a formação de barreira mineralizada, sendo que o MTA foi mais pontual, ou seja, no local da exposição e Biodentine uma calcificação patológica (Paula et al., 2019). O MTA no tecido conjuntivo inibiu a expressão do TNF- $\alpha$  nos períodos de 7 e 63 dias (Silva et al., 2022). Entretanto, observamos que a resposta no tecido pulpar foi distinta, ao qual os animais *Wild-Type* apresentaram uma maior marcação de TNF- $\alpha$  aos 7 e 70 dias enquanto que o *Knockout* apresentou menor marcação.

Estudos demonstram que a citocina TNF- $\alpha$  inibiu a atividade de fosfatase alcalina, um mediador de diferenciação odontoblástico e osteogênico, em períodos prolongados (Nakayama et al., 2016; Min et al., 2006). Enquanto que, Paula-Silva et al., 2009a em um estudo *in vitro* demonstram que o TNF- $\alpha$  estimula as células da polpa dentária em fenótipo odontoblástico. Por outro lado, Lamarque, (2022), observou *in vitro* que células da polpa dentária estimuladas com TNF- $\alpha$  induzem a biomineralização, e inibe a diferenciação de pré-osteoblastos, além de que, o TNF- $\alpha$  reduziu a expressão de *Runx-2*, elemento chave na transcrição associado a diferenciação osteoblástica. Outro estudo *in vitro* relatou que células-tronco da polpa dentária (DPSC) senescente apresentaram uma maior diferenciação odontoblástica com o TNF- $\alpha$  devido a altos níveis de TNFR1 (Nozu et al., 2018). Corroborando com achados encontrados em nosso trabalho, em que, o grupo de animais *Wild-Type*, ou seja, com o TNFR1 apresentou maior neoformação de tecido mineralizado comparado com os animais *Knockout*.

A concentração de TNF- $\alpha$  pode influenciar na resposta pulpar *in vitro*, sendo que em baixas concentrações estimula o processo de diferenciação osteogênica em células da polpa, além de induzir um aumento de marcadores de mineralização e também de transcrição *Runx-2*, em altas doses possui o papel de inibir, sendo um processo dose dependente (Qin et al.,

2015). O TNF- $\alpha$  induziu a mineralização, além de aumentar a expressão de genes relacionados com a osteogênese e fator de transcrição *Runx-2* (Feng et al., 2013; Cui et al., 2017). Em nossos achados, a via de sinalização TNF- $\alpha$ -TNFR1 não impactou na síntese de RUNX-2 por odontoblasto e células da polpa dentária.

*In vitro*, a expressão de OPN e DSP foi aumentada no período de 7 dias em células-tronco pulpares que estiveram em contato com MTA (Youssef et al., 2019). Resultados semelhantes encontrados em nosso estudo, ao qual, esses marcadores de mineralização apresentaram maior marcação no período de 7 dias. O estímulo com MTA e Biodentine promoveu maior expressão de SPP1, RUNX-2 e ALPL em células da polpa dentária (Daltoé et al., 2016). A OPN é um importante mediador de remodelação óssea e está associado ao processo de mineralização, sendo que em baixas concentrações sugere que o tecido é menos propenso a formação de tecido mineralizado, ou quando superexpresso pode inibir a deposição de mineral (De Paula et al., 2022).

Foi visto que, macrófagos, TNF- $\alpha$  e Interleucina-1 $\beta$  promovam a transcrição e liberação de OPN (Icer e Gezmen-Karadag, 2018). Um estudo observou uma correlação entre a expressão RNAm para *TNF- $\alpha$*  com *OPN* na polpa dentária humana, sugerindo que a OPN pode mediar a produção de TNF- $\alpha$  (Hasan et al., 2022). Foi observado em dentes de ratos, que a falta de OPN promove formação mais rápida de dentina e cimento (Foster et al., 2018). Em nosso estudo observamos essa interação do TNF- $\alpha$  com a OPN, e que a ausência do TNFR1 reduziu a marcação de OPN e não apresentou formação de dentina no interior dos canais radiculares.

A DSP é necessária para diferenciação de células da linhagem de odontoblasto e favorece o processo de mineralização da dentina (Ritchie, 2018; Lim et al., 2021). Estudos relatam que a ausência desta proteína reduz a espessura de dentina neoformada, além de possuir defeitos mais graves de hipomineralização (Suzuki et al., 2009; Gibson et al., 2013). Um estudo *in vitro* com células mesenquimais da papila apical e células-tronco da polpa dentária e *in vivo*, demonstraram que DSP participa do processo de diferenciação e mineralização em células dentárias (Li et al., 2017). A DSP apresentou um papel importante na diferenciação da polpa dentária, na secreção da matriz dentinária e na mineralização, além de promover maior formação de barreira mineralizada após proteção pulpar direta em Furões em um estudo *in vitro* e *in vivo* (Chuang et al., 2022). Em nosso estudo a DSP foi marcada em maior quantidade aos 7 dias na presença do TNFR1 e reduzida na ausência deste receptor, ao qual, esta proteína possa estar envolvida no processo de formação da barreira dentinária vista no período de 70 dias nos animais *Wild-Type*.

A literatura relata que a longo prazo a permanência de um processo inflamatório e da citocina TNF- $\alpha$  pode inibir o processo de mineralização nas células pulpares *in vitro* (Min et al., 2006). Estudos que avaliam a resposta tecidual dos materiais endodônticos, citam que inicialmente acontece um recrutamento de células inflamatórias, que posteriormente, é controlado e inicia a formação de colágeno ou tecido mineralizado (Daltoé et al., 2016; Paula et al., 2019; Silva et al., 2022). Nossos resultados demonstram, que a resposta inflamatória nos animais *Knockout* foi exacerbada e não controlada devido a ausência de ligação do TNF- $\alpha$  ao seu receptor, assim promovendo necrose tecidual e formação da lesão periapical tardiamente *in vivo*. O conhecimento de qual via está envolvido no reparo pulpar pelo TNF- $\alpha$  ainda é obscuro. Nosso estudo objetivou demonstrar que a via TNF- $\alpha$ /TNFR1 influencia o processo de reparo pulpar através de mediadores de mineralização, desde os períodos iniciais e até mesmo à longo prazo *in vivo*. E que, esta compreensão mais detalhada possibilita descobertas de novos caminhos em busca de terapias endodônticas conservadoras.

### 3.5 CONCLUSÃO

A ausência do TNFR1 não permitiu a formação de tecido mineralizado no canal radicular e levou a um maior processo inflamatório do tecido pulpar, o que ocasionou a formação da necrose pulpar e lesão periapical. A falta do TNFR1 impediu a síntese de mediadores de mineralização OPN e DSP, e conseqüentemente alterou a resposta no processo de neoformação dentária.

- A) A neoformação dentinária foi menor nos animais *Knockout* aos 70 dias comparados aos animais *Wild-Type*. Aos 7 dias não foi observado formação de tecido mineralizado em nenhum grupo.
- B) O processo inflamatório exacerbado ocasionou a formação da lesão periapical nos animais *Knockout* aos 70 dias e, conseqüentemente apresentou maior número de neutrófilos na região periapical.
- C) Os canais radiculares não apresentaram contaminação bacteriana em nenhum dos grupos analisados.
- D) Os animais *Knockout* apresentaram menor marcação para TNF aos 7 e 70 dias comparados aos *Wild-Type*. A ablação de TNFR1 resultou em menor síntese de proteínas de mineralização (DSP e OPN) aos 7 e 70 dias.

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- AlQranei MS, Chellaiah MA. Osteoclastogenesis in periodontal diseases: Possible mediators and mechanisms. *J Oral Biosci.* 2020 Jun;62(2):123-130.
- Al-Zahrani MS, Abozor BM, Zawawi KH. The relationship between periapical lesions and the serum levels of glycosylated hemoglobin and C-reactive protein in type 2 diabetic patients. *Saudi Med J.* 2017 Jan;38(1):36-40.
- American Association of Endodontists. *Glossary of Endodontic Terms.* 10th ed. Chicago, IL: American Association of Endodontists; 2020.
- An L, Shen S, Wang L, Li Y, Fahim S, Niu Y, Pan S. TNF-alpha increases angiogenic potential in a co-culture system of dental pulp cells and endothelial cells. *Braz Oral Res.* 2019 Oct 28;33:e059.
- Araujo-Pires AC, Bigueti CC, Repeke CE, Rodini CO, Campanelli AP, Trombone AP, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Mesenchymal stem cells as active prohealing and immunosuppressive agents in periapical environment: evidence from human and experimental periapical lesions. *J Endod.* 2014a;40(10):1560-5.
- Araujo-Pires AC, Francisconi CF, Bigueti CC, Cavalla F, Aranha AM, Letra A, Trombone AP, Faveri M, Silva RM, Garlet GP. Simultaneous analysis of T helper subsets (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, Tfh, Tr1 and Tregs) markers expression in periapical lesions reveals multiple cytokine clusters accountable for lesions activity and inactivity status. *J Appl Oral Sci.* 2014b; 22(4):336-46.
- Associação Brasileira de Odontopediatria. *Terapia Pulpar em Dente Decíduo.* In.: Associação Brasileira de Odontopediatria. Diretrizes para Procedimentos Clínicos em Odontopediatria. Rio de Janeiro: Santos; 2020. P.185-202.
- Azuma Y, Kaji K, Katigi R, Takeshita S, Kudo A. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem.* 2000;275 (7):4858-4864.
- Babaki D, Yaghoubi S, Matin MM. The effects of mineral trioxide aggregate on osteo/odontogenic potential of mesenchymal stem cells: a comprehensive and systematic literature review. *Biomater Investig Dent.* 2020 Dec 2;7(1):175-185.
- Bakhtiar H, Mazidi SA, Mohammadi AI S, Ellini MR, Moshiri A, Nekoofar MH, Dummer PMH. The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Prog Biomater.* 2018;7(4):249-268.
- Beldi G, Bahiraii S, Lezin C, Nouri Barkestani M, Abdelgawad ME, Uzan G, Naserian S. TNFR2 Is a Crucial Hub Controlling Mesenchymal Stem Cell Biological and Functional Properties. *Front Cell Dev Biol.* 2020 Dec 4;8:596831.
- Belibasakis GN, Rechenberg DK, Zehnder M. The receptor activator of NF-kB ligand-osteoprotegerin system in pulpal and periapical disease. *Int Endod J.* 2013;46(2):99-111.
- Bleicher F. Odontoblast physiology. *Exp Cell Res.* 2014;325(2): 65-71.
- Bloom BJ. Development of diabetes mellitus during etanercept therapy in a child with systemic-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000 Nov;43(11):2606-8.

Boyce BF. Advances in the regulation of osteoclasts and osteoclast functions. *J Dent Res.* 2013;92(10):860-7.

Bradley JR. TNF-mediated inflammatory disease. *J Pathol.* 2008 Jan;214(2):149-60.

Braz-Silva PH, Bergamini ML, Mardegan AP, De Rosa CS, Hasseus B, Jonasson P. Inflammatory profile of chronic apical periodontitis: a literature review. *Acta Odontol Scand.* 2019 Apr;77(3):173-180.

Carvalho MS, de Almeida-Junior LA, Silva-Sousa AC, Sousa-Neto MD, Lucisano MP, Arnez MFM, da Silva LAB, Paula-Silva FWG. Absence of Tumor Necrosis Factor Receptor 1 Inhibits Osteoclast Activity in Apical Dental Resorption Caused by Endodontic Infection in Mice. *J Endod.* 2022 Nov;48(11):1400-1406.

Castro GAP, Petean IBF, de Paula-Silva FWG, Kuchler EC, Antunes LDS, Segato RAB, da Silva LAB, Silva-Sousa AC, Sousa-Neto MD. Genetic polymorphism in the tumour necrosis factor alpha gene (G-308A) is associated with persistent apical periodontitis in Brazilians. *Int Endod J.* 2023 Jan;56(1):17-26.

Chen CP, Hertzberg M, Jiang Y, Graves DT. Interleukin-1 and tumor necrosis factor receptor signaling is not required for bacteria-induced osteoclastogenesis and bone loss but is essential for protecting the host from a mixed anaerobic infection. *Am J Pathol.* 1999 Dec;155(6):2145-52.

Chen Q, Hou T, Wu X, Luo F, Xie Z, Xu J. Knockdown of TNFR1 Suppresses Expression of TLR2 in the Cellular Response to *Staphylococcus aureus* Infection. *Inflammation.* 2016 Apr;39(2):798-806.

Chmilewsky F, Jeanneau C, Dejou J, About I. Sources of dentin/pulp regeneration signals and their modulation by the local microenvironment. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S19-25.

Chuang SF, Chen YH, Ma PX, Ritchie HH. Dentin Sialoprotein/Phosphophoryn (DSP/PP) as Bio-Inductive Materials for Direct Pulp Capping. *Polymers (Basel).* 2022 Sep 3;14(17):3656.

Cirelli JA, Park CH, MacKool K, Taba M Jr, Lustig KH, Burstein H, Giannobile WV. AAV2/1-TNFR:Fc gene delivery prevents periodontal disease progression. *Gene Ther.* 2009 Mar;16(3):426-36.

Collignon AM, Amri N, Lesieur J, Sadoine J, Ribes S, Menashi S, Simon S, Berdal A, Rochefort GY, Chaussain C, Gaucher C. Sclerostin Deficiency Promotes Reparative Dentinogenesis. *J Dent Res.* 2017;96(7):815-821.

Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod.* 2014;40(4 Suppl):S46-51.

Cotti E, Schirru E, Acquas E, Usai P. An overview on biologic medications and their possible role in apical periodontitis. *J Endod.* 2014;40(12):1902-11.

Couve E, Osorio R, Schmachtenberg O. The amazing odontoblast: activity, autophagy, and aging. *J Dent Res.* 2013;92(9):765-72.

Cui YM, Han XH, Lin YY, Lv WW, Wang YL. TNF- $\alpha$  was involved in calcium hydroxide-promoted osteogenic differentiation of human DPSCs through NF- $\kappa$ B/p38MAPK/Wnt pathway. *Pharmazie.* 2017 Jun 1;72(6):329-333.

Daltoé MO, Paula-Silva FW, Faccioli LH, Gatón-Hernández PM, De Rossi A, Bezerra Silva LA. Expression of Mineralization Markers during Pulp Response to Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):596-603.

De Paula KM, Gomes CC, Valente MIB, Pires FR, Thuller KABR, Salles L, Armada L. EVALUATION OF RANKL, OPG, OPN AND TNF- $\alpha$  ON CHRONIC APICAL PERIODONTITIS IN SMOKERS. *J Endod.* 2022 Nov 19:S0099-2399(22)00757-9.

De-Deus G, Belladonna FG, Silva EJNL, Marins JR, Souza EM, Perez R, et al. Micro-ct evaluation of non-instrumented canal areas with different enlargements performed by niti systems. *Braz Dent J.* 2015 Jun; 26(6):624-9.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Application of fluorescence microscopy on hematoxylin and eosin-stained sections of healthy and diseased teeth and supporting structures. *J Oral Pathol Med.* 2007 Jul;36(6):377-81.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod.* 2008;34(1):31-8.

Ding G, Niu J, Wei F. Current understanding of orofacial tissue derived mesenchymal stem cells: an immunological perspective. *Histol Histopathol.* 2015 Mar;30(3):255-65.

El Karim I, McCrudden MT, Linden GJ, Abdullah H, Curtis TM, McGahon M, About I, Irwin C, Lundy FT. TNF- $\alpha$ -induced p38MAPK activation regulates TRPA1 and TRPV4 activity in odontoblast-like cells. *Am J Pathol.* 2015;185(11):2994-3002.

El Karim IA, McCrudden MT, McGahon MK, Curtis TM, Jeanneau C, Giraud T, Irwin CR, Linden GJ, Lundy FT, About I. Biodentine Reduces Tumor Necrosis Factor Alpha-induced TRPA1 Expression in Odontoblastlike Cells. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):589-95.

Emilia E, Neelakantan P. Biomarkers in the dentin-pulp complex: role in health and disease. *J Clin Pediatr Dent.* 2015 Winter;39(2):94-9.

Engbaek K, Johansen KS, Jensen ME. A new technique for Gram staining paraffin-embedded tissue. *J Clin Pathol.* 1979;32(2):187-90.

Falcai MJ, Zamarioli A, Leoni GB, de Sousa Neto MD, Volpon JB. Swimming Activity Prevents the Unloading Induced Loss of Bone Mass, Architecture, and Strength in Rats. *Biomed Res Int.* 2015;2015:507848.

Farges JC, Alliot-Licht B, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Carrouel F. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. *Front Physiol.* 2013 Nov 11;4:326.

Feng X, Feng G, Xing J, Shen B, Li L, Tan W, Xu Y, Liu S, Liu H, Jiang J, Wu H, Tao T, Gu Z. TNF- $\alpha$  triggers osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells via the NF- $\kappa$ B signalling pathway. *Cell Biol Int.* 2013 Dec;37(12):1267-75.

Figueiredo JAP, Machado AM, Oliveira VP, Hartmann R, Waltrick SBG, Borba MG, Brew MC, Estrela CRA, Böttcher DE. Dendritic cells and their relation to apical peridontitis. *Braz Oral Res.* 2018;32(suppl 1):e71.



- Foster BL, Ao M, Salmon CR, Chavez MB, Kolli TN, Tran AB, Chu EY, Kantovitz KR, Yadav M, Narisawa S, Millán JL, Nociti FH Jr, Somerman MJ. Osteopontin regulates dentin and alveolar bone development and mineralization. *Bone*. 2018 Feb;107:196-207.
- Gallagher JC. Advances in bone biology and new treatments for bone loss. *Maturitas*. 2008 May 20;60(1):65-9.
- 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 Feb 2;22(3):1480.
- Gamrot Z, Adamczyk P, Świętochowska E, Roszkowska-Bjanid D, Gamrot J, Szczepanska M. Tumour necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ) and alpha-Klotho ( $\alpha$ KL) in children and adolescents with chronic kidney disease (CKD). *Endokrynol Pol*. 2021;72(6):625-633.
- Garlet GP, Horwat R, Ray HL Jr, Garlet TP, Silveira EM, Campanelli AP, Trombone AP, Letra A, Silva RM. Expression analysis of wound healing genes in human periapical granulomas of progressive and stable nature. *J Endod*. 2012;38(2):185-90.
- Gibson MP, Liu Q, Zhu Q, Lu Y, Jani P, Wang X, Liu Y, Paine ML, Snead ML, Feng JQ, Qin C. Role of the NH<sub>2</sub>-terminal fragment of dentin sialophosphoprotein in dentinogenesis. *Eur J Oral Sci*. 2013 Apr;121(2):76-85.
- Giraud T, Jeanneau C, Rombouts C, Bakhtiar H, Laurent P, About I. Pulp capping materials modulate the balance between inflammation and regeneration. *Dent Mater*. 2019 Jan;35(1):24-35.
- Goldberg M, Hirata A. The dental pulp: composition, properties and functions. *JSM Dent*. 2017; 5(1):1079.
- Goldberg M. Regenerative medicine, stem cells and pulp repair. *Int J Regenerative Med*. 2018; 1:2-3.
- Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(25):13625-30.
- Haag DG, Peres KG, Balasubramanian M, Brennan DS. Oral conditions and health-related quality of life: a systematic review. *Journal of Dental Research*. 2017; 96, 864–74.
- Hasan A, Roome T, Wahid M, Ansari SA, Akhtar H, Jilani SNA, Kiyani A. Gene expression analysis of toll like receptor 2 and 4, Dectin-1, Osteopontin and inflammatory cytokines in human dental pulp ex-vivo. *BMC Oral Health*. 2022 Dec 3;22(1):563.
- Hirsch V, Wolgin M, Mitronin AV, Kielbassa AM. Inflammatory cytokines in normal and irreversibly inflamed pulps: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2017; 82:38-46.
- Holbrook J, Lara-Reyna S, Jarosz-Griffiths H, McDermott M. Tumour necrosis factor signalling in health and disease. *F1000Res*. 2019 Jan 28;8:F1000 Faculty Rev-111.
- Horst OV, Horst JA, Samudrala R, Dale BA. Caries induced cytokine network in the odontoblast layer of human teeth. *BMC Immunol*. 2011 Jan 24;12:9.
- Icer MA, Gezmen-Karadag M. The multiple functions and mechanisms of osteopontin. *Clin Biochem*. 2018 Sep;59:17-24.

Idriss HT, Naismith JH. TNF alpha and the TNF receptor superfamily: structure-function relationship(s). *Microsc Res Tech*. 2000;50(3):184-195.

Jakovljevic A, Nikolic N, Carkic J, Beljic-Ivanovic K, Soldatovic I, Miletic M, Andric M, Milasin J. Association of polymorphisms in TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , GSTM and GSTT genes with apical periodontitis: is there a link with herpesviral infection? *Int Endod J*. 2020 Jul;53(7):895-904.

Jang DI, Lee AH, Shin HY, Song HR, Park JH, Kang TB, Lee SR, Yang SH. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- $\alpha$ ) in Autoimmune Disease and Current TNF- $\alpha$  Inhibitors in Therapeutics. *Int J Mol Sci*. 2021 Mar 8;22(5):2719.

Kabak SL, Kabak YS, Anischenko SL. Light microscopic study of periapical lesions associated with asymptomatic apical periodontitis. *Ann Anat*. 2005 Apr;187(2):185-94.

Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nat Rev Rheumatol*. 2016 Jan;12(1):49-62.

Kang JH, Ko HM, Moon JS, Yoo HI, Jung JY, Kim MS, Koh JT, Kim WJ, Kim SH. Osteoprotegerin expressed by osteoclasts: an autoregulator of osteoclastogenesis. *J Dent Res*. 2014;93(11):1116-23.

Kawashima N, Stashenko P. Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapical inflammation. *Arch Oral Biol*. 1999;44(1):55-66.

Khalighinejad N, Aminoshariae MR, Aminoshariae A, Kulild JC, Mickel A, Fouad AF. Association between Systemic Diseases and Apical Periodontitis. *J Endod*. 2016 Oct;42(10):1427-34.

Kitaura H, Marahleh A, Otori F, Noguchi T, Nara Y, Pramusita A, Kinjo R, Ma J, Kanou K, Mizoguchi I. Role of the Interaction of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Tumor Necrosis Factor Receptors 1 and 2 in Bone-Related Cells. *Int J Mol Sci*. 2022 Jan 27;23(3):1481.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, Nakagawa N, Kinoshita 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;191:275-86.

Kollias G, Kontoyiannis D, Douni E, Kassiotis G. The role of TNF/TNFR in organ-specific and systemic autoimmunity: implications for the design of optimized 'anti-TNF' therapies. *Curr Dir Autoimmun*. 2002;5:30-50.

Komine M, Kukita A, Kukita T, Ogata Y, Hotokebuchi T, Kohashi O. Tumor necrosis factor- $\alpha$  cooperates with receptor activator of nuclear factor kappaB ligand in generation of osteoclasts in stromal cell-depleted rat bone marrow cell culture. *Bone*. 2001 May;28(5):474-83.

Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- $\alpha$  induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest*. 2000 Dec;106(12):1481-8.

Lamarque GCC. Influência do fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) na diferenciação e mineralização de células pré-osteoblásticas e da polpa dentária [tese]. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto; 2022.

- Landini G, Martinelli G, Piccinini F. Colour deconvolution: stain unmixing in histological imaging. *Bioinformatics*. 2021 Jun 16;37(10):1485-1487.
- Leibbrandt A, Penninger JM. RANK/RANKL: regulators of immune responses and bone physiology. *Ann N Y Acad Sci*. 2008 Nov;1143:123-50.
- Lener UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Jan 1;15(2):64-81.
- Lim D, Wu KC, Lee A, Saunders TL, Ritchie HH. DSPP dosage affects tooth development and dentin mineralization. *PLoS One*. 2021 May 26;16(5):e0250429.
- Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis*. 2014 Jan;20(1):25-34.
- Li W, Chen L, Chen Z, Wu L, Feng J, Wang F, Shoff L, Li X, Donly KJ, MacDougall M, Chen S. Dentin sialoprotein facilitates dental mesenchymal cell differentiation and dentin formation. *Sci Rep*. 2017 Mar 22;7(1):300.
- Liu J, Que K, Liu Y, Zang C, Wen J. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Regulates the TRPA1 Expression in Human Odontoblast-Like Cells. *J Pain Res*. 2020 Jul 6;13:1655-1664.
- Lorencetti-Silva F, Arnez MFM, Thomé JPQ, Carvalho MS, Carvalho FK, Queiroz AM, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Leukotriene B4 Loaded in Microspheres Inhibits Osteoclast Differentiation and Activation. *Braz Dent J*. 2022 Sep-Oct;33(5):35-45.
- Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol*. 2011 Feb;163(2):207-14.
- Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod*. 2014 Feb; 40(2):155-63.
- Medler J, Wajant H. Tumor necrosis factor receptor-2 (TNFR2): an overview of an emerging drug target. *Expert Opin Ther Targets*. 2019 Apr;23(4):295-307.
- Mezey É, Nemeth K. Mesenchymal stem cells and infectious diseases: Smarter than drugs. *Immunol Lett*. 2015;168(2): 208-14.
- Min KS, Kwon YY, Lee HJ, Lee SK, Kang KH, Lee SK, Kim EC. Effects of proinflammatory cytokines on the expression of mineralization markers and heme oxygenase-1 in human pulp cells. *J Endod*. 2006 Jan;32(1):39-43.
- Minic S, Florimond M, Sadoine J, Valot-Salengro A, Chaussain C, Renard E, Boukpepsi T. Evaluation of Pulp Repair after Biodentine™ Full Pulpotomy in a Rat Molar Model of Pulpitis. *Biomedicines*. 2021 Jul 6;9(7):784.
- 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 Jun;54(6):848-857.

- Nair PN. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol 2000*. 1997 Feb;13:121-48.
- Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov 1;15(6): 348-81.
- Nakayama K, Hirata-Tsuchiya S, Okamoto K, Morotomi T, Jimi E, Kitamura C. The Novel NF- $\kappa$ B Inhibitor, MTI-II Peptide Anti-Inflammatory Drug, Suppresses Inflammatory Responses in Odontoblast-Like Cells. *J Cell Biochem*. 2016 Nov;117(11):2552-8.
- Nikolic N, Jakovljevic A, Carkic J, Beljic-Ivanovic K, Miletic M, Soldatovic I, Andric M, Ivanovic V, Milasin J. Notch Signaling Pathway in Apical Periodontitis: Correlation with Bone Resorption Regulators and Proinflammatory Cytokines. *J Endod*. 2019 Feb;45(2):123-128.
- Novinec M, Lenarčič B. Cathepsin K: a unique collagenolytic cysteine peptidase. *Biol Chem*. 2013 Sep;394(9):1163-79.
- Nozu A, Hamano S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Sugii H, Yoshida S, Mitarai H, Taniguchi S, Wada N, Maeda H. Senescence and odontoblastic differentiation of dental pulp cells. *J Cell Physiol*. 2018 Jan;234(1):849-859.
- Nurnberger W , Platonov A , Stannigel H , Beloborodov VB , Michelmann I , von Kries R , et al. Definição de um novo escore para gravidade da infecção generalizada por *Neisseria meningitidis* . *Eur J Pediatr* 1995;154(11): 896 – 900 .
- Omidi S, Bagheri M, Fazli M, Ahmadiankia N. The effect of different pulp-capping materials on proliferation, migration and cytokine secretion of human dental pulp stem cells. *Iran J Basic Med Sci*. 2020 Jun;23(6):768-775.
- Pagliari D, Ciro Tamburrelli F, Zirio G, Newton EE, Cianci R. The role of "bone immunological niche" for a new pathogenetic paradigm of osteoporosis. *Anal Cell Pathol (Amst)*. 2015;2015:434389.
- Paula AB, Laranjo M, Marto CM, Paulo S, Abrantes AM, Fernandes B, Casalta-Lopes J, Marques-Ferreira M, Botelho MF, Carrilho E. Evaluation of dentinogenesis inducer biomaterials: an in vivo study. *J Appl Oral Sci*. 2019 Nov 28;28:e20190023.
- Paula-Silva FWG, Ribeiro-Santos FR, Petean IBF, Manfrin Arnez MF, Almeida-Junior LA, Carvalho FK, Silva LABD, Faccioli LH. Root canal contamination or exposure to lipopolysaccharide differentially modulate prostaglandin E 2 and leukotriene B 4 signaling in apical periodontitis. *J Appl Oral Sci*. 2020a;28:e20190699.
- 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*. 2020b Apr;112:104670.
- Paula-Silva FWG, Ghosh A, Silva LA, Kapila YL. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. *J Dent Res*. 2009a;88(4):339-44.
- Paula-Silva FWG, Santamaria-Junior M, Leonardo MR, Consolaro A, Silva LAB. Cone-beam computerized tomographic, radiographic, and histologic evaluation of periapical repair in dogs' post-endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009b;108(5): 796-805.

Paula-Silva FWG, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod.* 2009c;35(9):1234-42.

Paula-Silva FWG, Wu M-K, Silva LAB, Leonardo MR, Wesselink PR. Accuracy of periapical radiography and conebeam computed tomography in diagnosing apical periodontitis using histopathological findings as a gold standard. *J Endod.* 2009d; 35(7):1009-12.

Paula-Silva FWG, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod.* 2010a;36(2):231-7.

Paula-Silva FWG, Petean IB, da Silva LA, Faccioli LH. Dual Role of 5-Lipoxygenase in Osteoclastogenesis in Bacterialinduced Apical Periodontitis. *J Endod.* 2016;42(3):447-54.

Percie du Sert N, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Browne WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Hurst V, 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. Reporting animal research: Explanation and elaboration for the ARRIVE guidelines 2.0. *PLoS Biol.* 2020 Jul 14;18(7):e3000411.

Peschon JJ, Torrance DS, Stocking KL, Glaccum MB, Otten C, Willis CR, Charrier K, Morrissey PJ, Ware CB, Mohler KM. TNF receptor-deficient mice reveal divergent roles for p55 and p75 in several models of inflammation. *J Immunol.* 1998;160(2):943-52.

Petean IBF, Almeida-Junior LA, Arnez MFM, Queiroz AM, Silva RAB, Silva LAB, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Celecoxib treatment dampens LPS-induced periapical bone resorption in a mouse model. *Int Endod J.* 2021 Aug;54(8):1289-1299.

Pezelj-Ribarić S, Magasić K, Prpić J, Miletić I, Karlović Z. Tumor necrosis factor-alpha in peripical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:69416.

Prso IB, Kocjan W, Simić H, Brumini G, Pezelj-Ribarić S, Borčić J, Ferreri S, Karlović IM. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:38210.

Pushpalatha C, Dhareshwar V, Sowmya SV, Augustine D, Vinothkumar TS, Renugalakshmi A, Shaiban A, Kakti A, Bhandi SH, Dubey A, Rai AV, Patil S. Modified Mineral Trioxide Aggregate-A Versatile Dental Material: An Insight on Applications and Newer Advancements. *Front Bioeng Biotechnol.* 2022 Aug 9;10:941826.

Qin Z, Fang Z, Zhao L, Chen J, Li Y, Liu G. High dose of TNF $\alpha$  suppressed osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Mol Histol.* 2015 Oct;46(4-5):409-20.

Queiroz AM, Amaral THA, Mira PCS, Paula-Silva FWG, Nelson-Filho P, Silva RAB, Silva LAB. In vivo evaluation of inflammation and matrix metalloproteinase expression in dental pulp induced by luting agents. *Rio de Janeiro Dental Journal.* 2019; 4(1):61-72.

Rechenberg DK, Galicia JC, Peters OA. Biological Markers for Pulpal Inflammation: A Systematic Review. *PLoS One.* 2016;11(11):e0167289.

Ribeiro-Santos FR, Arnez MFM, de Carvalho MS, da Silva RAB, Politi MPL, de Queiroz AM, Nelson-Filho P, da Silva LAB, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Effect of non-steroidal anti-inflammatory drugs on pulpal and periapical inflammation induced by lipopolysaccharide. *Clin Oral Investig*. 2021 Nov;25(11):6201-6209.

Ribeiro-Santos FR, Silva GGD, Petean IBF, Arnez MFM, Silva LABD, Faccioli LH, Paula-Silva FWG. Periapical bone response to bacterial lipopolysaccharide is shifted upon cyclooxygenase blockage. *J Appl Oral Sci*. 2019;Jun 3;27:e20180641.

Ritchie H. The functional significance of dentin sialoprotein-phosphophoryn and dentin sialoprotein. *Int J Oral Sci*. 2018 Nov 5;10(4):31.

Robak T, Gladalska A, Stepien H. A família de receptores/ligantes do fator de necrose tumoral no soro de pacientes com artrite reumatóide. *Eur Cytokine Netw* 1998;9(2):145 – 154.

Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB, Silva LAB, Nelson-Filho P. Ovariectomy Exacerbates Apical Periodontitis in Rats with an Increase in Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *J Endod*. 2018;44(5):780-785.

Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 1991;Jan;17(1):12-4.

Salles AG, Antunes LAA, Carvalho PA, Küchler EC, Antunes LS. Association Between Apical Periodontitis and TNF- $\alpha$  -308 G>A Gene Polymorphism: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Braz Dent J*. 2017 Sep-Oct;28(5):535-542.

Seerig LM, Nascimento GG, Peres MA, Horta BL, Demarco FF. Tooth loss in adults and income: Systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2015 Sep;43(9):1051-1059.

Shah D, Lynd T, Ho D, Chen J, Vines J, Jung HD, Kim JH, Zhang P, Wu H, Jun HW, Cheon K. Pulp-Dentin Tissue Healing Response: A Discussion of Current Biomedical Approaches. *J Clin Med*. 2020 Feb;5;9(2):434.

Shamdani S, Uzan G, Naserian S. TNF $\alpha$ -TNFR2 signaling pathway in control of the neural stem/progenitor cell immunosuppressive effect: Different experimental approaches to assess this hypothetical mechanism behind their immunological function. *Stem Cell Res Ther*. 2020 Jul; 22;11(1):307.

Shi L, Fu S, Fahim S, Pan S, Lina H, Mu X, Niu Y. TNF-alpha stimulation increases dental pulp stem cell migration in vitro through integrin alpha-6 subunit upregulation. *Arch Oral Biol*. 2017; 75:48-54.

Silva EJ, Senna PM, De-Deus G, Zaia AA. Cytocompatibility of Biodentine using a three-dimensional cell culture model. *Int Endod J*. 2016 Jun;49(6):574-80.

Silva LAB, Paula-Silva FWG, Leonardo MR, Assed S. Pulpal and periapical response of dogs' teeth after pulpotomy and use of recombinant human bone morphogenetic protein-7 as a capping agent. *J Dent Child*. 2007;74(2):79-84.

Silva LAB, Pieroni KAMG, Nelson-Filho P, Silva RAB, Hernández-Gatón P, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, de Queiroz AM. Furcation Perforation: Periradicular Tissue Response to Biodentine

as a Repair Material by Histopathologic and Indirect Immunofluorescence Analyses. *J Endod.* 2017; 43(7):1137-1142.

Silva LAB. Tratamento Endodôntico em Crianças: Protocolos Clínicos em Dentes Decíduos Permanentes Jovens. Santana da Parnaíba: Editora Manole, 2022.

Silva RAB, Gatón-Hernandez P, Pucinelli CM, Silva FWGPE, Lucisano MP, Consolaro A, Sá RC, Araujo LDC, Sousa-Neto MD, Silva LAB. Subcutaneous tissue reaction and gene expression of inflammatory markers after Biodentine and MTA implantation. *Braz Dent J.* 2022 Jan-Feb;33(1):41-56.

Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Ifi CN, Berdal A. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *Int Endod J.* 2008 Sep;41(9):781-90.

Skudutyte-Rysstad R, Eriksen HM. Endodontic status amongst 35-year-old Oslo citizens and changes over a 30-year period. *Int Endod J.* 2006 Aug;39(8):637-42.

Sorokin L. The impact of the extracellular matrix on inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2010 Oct;10(10):712-23.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol.* 1991 Aug;62(8):504-9.

Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1998;9(4):498-521.

Suzuki S, Sreenath T, Haruyama N, Honeycutt C, Terse A, Cho A, Kohler T, Müller R, Goldberg M, Kulkarni AB. Dentin sialoprotein and dentin phosphoprotein have distinct roles in dentin mineralization. *Matrix Biol.* 2009 May;28(4):221-9.

Tacchini-Cottier F, Vesin C, Redard M, Buurman W, Piguet PF. Role of TNFR1 and TNFR2 in TNF-induced platelet consumption in mice. *J Immunol.* 1998;160(12):6182-6186.

Tack CJ, Kleijwegt FS, Van Riel PL, Roep BO. Development of type 1 diabetes in a patient treated with anti-TNF-alpha therapy for active rheumatoid arthritis. *Diabetologia.* 2009 Jul;52(7):1442-4.

Teixeira QE, Ferreira DC, da Silva AMP, Gonçalves LS, Pires FR, Carrouel F, Bourgeois D, Sufiawati I, Armada L. Aging as a Risk Factor on the Immunoexpression of Pro-Inflammatory IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  Cytokines in Chronic Apical Periodontitis Lesions. *Biology (Basel).* 2021 Dec 23;11(1):14.

Thomson BM, Mundy GR, Chambers TJ. Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption. *J Immunol.* 1987 Feb 1;138(3):775-9.

Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2021 May;54(5):712-735.

Toida Y, Kawano S, Islam R, Jiale F, Chowdhury AA, Hoshika S, Shimada Y, Tagami J, Yoshiyama M, Inoue S, Carvalho RM, Yoshida Y, Sano H. Pulpal response to mineral trioxide aggregate containing phosphorylated pullulan-based capping material. *Dent Mater J.* 2022 Feb 1;41(1):126-133.

- Versiani MA, Ordinola-Zapata R, Keleş A, Alcin H, Bramante CM, Pécora JD, et al. Middle canals in mandibular first molars: a micro ct study in different populations. *Arch Oral Biol.* 2016 Jan; 61:130-7.
- Weber M, Schlittenbauer T, Moebius P, Büttner-Herold M, Ries J, Preidl R, Geppert CI, Neukam FW, Wehrhan F. Macrophage polarization differs between apical granulomas, radicular cysts, and dentigerous cysts. *Clin Oral Investig.* 2018 Jan;22(1): 385-394.
- Wroblewski R, Armaka M, Kondylis V, Pasparakis M, Walczak H, Mittrücker HW, Schramm C, Lohse AW, Kollias G, Ehlken H. Opposing role of tumor necrosis factor receptor 1 signaling in T cell-mediated hepatitis and bacterial infection in mice. *Hepatology.* 2016 Aug;64(2):508-21.
- Xu K, Xiao J, Zheng K, Feng X, Zhang J, Song D, Wang C, Shen X, Zhao X, Wei C, Huang D, Feng G. MiR-21/STAT3 Signal Is Involved in Odontoblast Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells Mediated by TNF- $\alpha$ . *Cell Reprogram.* 2018;20(2):107-116.
- Yang S, Wang J, Brand DD, Zheng SG. Role of TNF-TNF Receptor 2 Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications. *Front Immunol.* 2018 Apr 19;9:784.
- Yao Z, Lei W, Duan R, Li Y, Luo L, Boyce BF. RANKL cytokine enhances TNF-induced osteoclastogenesis independently of TNF receptor associated factor (TRAF) 6 by degrading TRAF3 in osteoclast precursors. *J Biol Chem.* 2017 Jun 16;292(24):10169-10179.
- Youssef AR, Emara R, Taher MM, Al-Allaf FA, Almalki M, Almasri MA, Siddiqui SS. Effects of mineral trioxide aggregate, calcium hydroxide, biodentine and Emdogain on osteogenesis, Odontogenesis, angiogenesis and cell viability of dental pulp stem cells. *BMC Oral Health.* 2019 Jul 2;19(1):133.
- Zhang N, Wang Z, Zhao Y. Selective inhibition of Tumor necrosis factor receptor-1 (TNFR1) for the treatment of autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2020 Oct;55:80-85.
- Zhang P, Yang W, Wang G, Li Y. miR-143 suppresses the osteogenic differentiation of dental pulp stem cells by inactivation of NF- $\kappa$ B signaling pathway via targeting TNF- $\alpha$ . *Arch Oral Biol.* 2018 Mar.; 87:172-179.



ANEXOS

---

**ANEXOS****ANEXO A - Comissão de Ética no Uso de Animais**

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO  
Comissão de Ética no Uso de Animais

Of. CEUA 029/2019

Ribeirão Preto, 20 de março de 2019.

**Ref. processo nº 2019.1.139.58.0**

Senhor(a) Pesquisador(a),

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 66ª Sessão, realizada em 20/03/2019, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentadas no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Papel do fator de necrose tumoral- $\alpha$  na inflamação e no reparo pulpar e periapical", emitindo o certificado anexo,

Informamos, também, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 31/01/2021**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

**Prof. Dra. Andriara De Rossi Daldegan**

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

Ilmo(a). Sr(a).

**Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva**Departamento de Clínica Infantil  
desta Faculdade

/sdfn

### CERTIFICADO CEUA – FORP/USP

Certificamos que o projeto intitulado “Papel do fator de necrose tumoral- $\alpha$  na inflamação e no reparo pulpar e periapical”, Protocolo nº 2019.1.139.58.0, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva – 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 20/03/2019.

Vigência do Projeto	01/04/2019 a 31/12/2021	
Espécie/Linhagem	Camundongo isogênico / C57BL-6	Camundongo <i>Knockout</i> / p55; 6-Tnfrsfatmi/mx
Nº de animais	100	100
Peso/Idade	20-22g / 6-8 semanas	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central – PUSP-RP / Biotério da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP	

Ribeirão Preto, 20 de março de 2019.



**Prof. Dra. Andjara De Rossi Daldegan**  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

**CERTIFICATE CEUA – FORP/USP**

We hereby certify that the project entitled "Role of tumor necrosis factor- $\alpha$  in pulpal and periapical inflammation and repair" Protocol n° 2019.1.139.58.0, under the responsibility of Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva – involving the production, maintenance and/or use of animals from the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for purposes of scientific research (or teaching) – is in accordance with the provisions of Law No. 11.794, of October 8th, 2008, Decree No. 6899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Board of Animal Experimentation Control (CONCEA), with the Ethical principles in animal research adopted by the Animal Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Brazil, and was approved in 20/03/2019.

Duration of the Project	01/04/2019 - 31/12/2021	
Species/Lineage	Isogenic Mouse / C57BL-6	Knockout Mouse / p55; 6-Tnfrsf1atm/mx
N° of animals	100	100
Weight / age	20-22g / 6-8 weeks-old	
Gender	Male	
Origin	Central Animal Research Facilities of Campus Ribeirão Preto – University of São Paulo / Animal Research Facilities of Ribeirão Preto Medical School – University of São Paulo	

Ribeirão Preto, March 20th, 2019.



**Profa. Dra. Andriara De Rossi Daldegan**  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais

## ANEXO B - Comissão Interna de Biossegurança



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão Interna de Biossegurança – CIBio – FORP/USP

OF.CIBio-FORP/USP.002.21

Ribeirão Preto, 22 de julho de 2021.

REF.: Projeto nº 0040/98.004-01.06/2020 (NB-1)

Título do Projeto: Papel do fator de necrose tumoral –  $\alpha$  na inflamação e no reparo pulpar e periapical

Requerente: Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva

Senhor Professor,

Encaminhamos “ad referendum” da Comissão Interna de Biossegurança – CIBio FORP/USP o projeto intitulado “Papel do fator de necrose tumoral –  $\alpha$  na inflamação e no reparo pulpar e periapical”, Classe de Risco 1, sob o número 0040/98.004-01.06/2020, tendo em vista que o relator da CIBio – FORP/USP emitiu parecer favorável.

Lembramos que, no final de cada ano, o responsável pelo projeto deve enviar à CIBio da FORP/USP relatório para que a CIBio possa submeter à CTBNI Relatório Anual, conforme Resolução Normativa Nº 1, de 20 de Junho de 2006 (Alterada pela Resolução Normativa Nº 11, de 22 de outubro de 2013 e pela Resolução Normativa Nº 14, de 05 de fevereiro de 2015).

Segue anexo roteiro para elaboração do Relatório Anual.

Atenciosamente,

  
Prof. Dr. Cleonice Maria de Silva Fossas Junior  
Presidente da Comissão Interna de Biossegurança  
CIBio-FORP/USP

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva