

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Guilherme Piedade Assed de Castro

**Associação entre polimorfismos no fator de necrose
tumoral-alfa e seus receptores e persistência da
periodontite apical pós-tratamento**

RIBEIRÃO PRETO

2021

GUILHERME PIEDADE ASSED DE CASTRO

**Associação entre polimorfismos no fator de necrose
tumoral-alfa e seus receptores e persistência da
periodontite apical pós-tratamento**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Fa-
culdade Odontologia de Ribeirão Preto da Universi-
dade de São Paulo, como requisito parcial para ob-
tenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Damião Sousa-Neto

RIBEIRÃO PRETO

2021

DEDICATÓRIA

Dedico, primeiramente à **Deus** que nunca me desampara.

Aos meus pais, **Rodrigo Assed de Castro e Gisele Rodrigues Piedade de Castro**, que sempre me apoiaram e me deram amor e carinho em todas as circunstâncias durante esse percurso.

Às minhas tias, **Léa Assed Bezerra da Silva e Raquel Assed Bezzera Segato**, as quais tenho como exemplo de profissionalismo e dedicação à odontologia.

Aos meus avós, **José Rodrigues Piedade, Juventino de Castro Aguado e Maria Lucia de Sousa Piedade**, por estarem sempre comigo desde pequeno.

À minha namorada, **Alexsandra Caroline Ferreira Thomaz**, por sempre estar presente nos momentos mais felizes e nos mais difíceis.

Ao meu tio e padrinho, **Rafael Assed de Castro**, que sempre me incentivou e incentiva a cada degrau que eu subo.

À minha tia e madrinha, **Vanessa Piedade Penha**, por todo carinho e amor de sempre.

À minha avó, **Odete Assed de Castro**, e à minha tia, **Sada Assed**, pelo tanto que me inspiraram no lado profissional e, principalmente, no lado humano.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Manoel D. Sousa Neto**, por todo aprendizado e por toda experiência compartilhada.

Às professoras, **Léa Assed Bezerra da Silva e Raquel Assed Bezzera Segato**, que tanto me ajudam nos meus primeiros passos da vida profissional.

Aos professores, **Francisco Wanderley Garcia de Paula Silva e Jardel Francisco Mazzi Chaves**, pela preciosa contribuição neste trabalho.

Aos doutorandos, **Alice Corrêa Silva Sousa e Igor Bassi Ferreira Petean**, que foram fundamentais para realização deste trabalho e para meu ensino.

À todos integrantes do laboratório de endodontia da FORP/USP, que contribuiram para meu conhecimento em pesquisa e em endodontia.

Aos meus amigos de faculdade, **André Luiz Piola e Gunther Ricardo Bertolini**, que foram verdadeiros companheiros nessa jornada.

À técnica do laboratório de biologia molecular da odontopediatria, **Nilza Letícia Magalhães**, por todo conhecimento compartilhado.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pelo apoio financeiro concedido por meio da bolsa de Iniciação Científica outorgada (2019/16038-3).

“A minha alma espera somente em
Deus; dele vem minha salvação”
(Salmo 62:1)

RESUMO

CASTRO, G. P. A. **Associação entre polimorfismos no fator de necrose tumoral-alfa e seus receptores e persistência da periodontite apical pós-tratamento.**

2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021).

Polimorfismos genéticos são diferenças na sequência do DNA humano que podem alterar a expressão gênica e influenciar na susceptibilidade do organismo frente a doenças bem como nas suas respostas ao meio ambiente. Desta forma, além de fatores microbianos e mecânicos relacionados ao canal radicular propriamente dito, fatores intrínsecos ao hospedeiro podem interferir no sucesso do tratamento endodôntico e na necessidade de reintervenção. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar aspectos moleculares envolvidos na persistência de lesões periapicais pós- tratamento, por meio da coleta de amostras de saliva para compor um banco de DNA, extração do material genômico, avaliação clínica, radiográfica, e genotipagem por análise de discriminação alélica. Pacientes que apresentaram necrose pulpar e lesão periapical instalada no momento do tratamento endodôntico foram chamados para consulta de acompanhamento. Até o momento, foram incluídos no presente estudo 212 pacientes, que apresentaram tratamento concluído há no mínimo um ano antes da consulta de acompanhamento. Desse total, 101 pacientes apresentaram sinais e sintomas clínicos/radiográficos indicativos de lesões periapicais persistentes e 111 indivíduos apresentaram reparo da lesão. Amostras de saliva recém-coletadas no momento do acompanhamento, bem como aquelas que já armazenadas no banco, foram utilizadas como fonte de DNA genômico, o qual foi genotipado para o mediador solúvel fator de necrose tumoral-alfa (*TNF* - rs1800629) e dos receptores alfa e beta do *TNF-α* (rs1800693 e rs1061622 respectivamente), por PCR em tempo real. A frequência dos genótipos e alelos foi avaliada por meio da razão de chance (odds ratio), teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, utilizando o software Graphpad Prism. O nível de significância estabelecido foi de 5%. O polimorfismo genético rs1800629 em *TNF-α* esteve associado como fator de proteção ao desenvolvimento de lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico, enquanto os polimorfismos genéticos nos receptores de *TNF* (*TNFRSF1A* e *TNFRSF1B*), rs1800693 e rs1061622 respectivamente, não estiveram associados ao desenvolvimento de lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico.

Palavras-chaves: Lesão periapical, mediadores inflamatórios, remodelação óssea, polimorfismo genético.

ABSTRACT

CASTRO, G. P. A. **Association between tumor necrosis factor-alpha polymorphisms and their receptors and post-treatment apical periodontitis persistence.** 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Odontologia – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2021).

Genetic polymorphisms are differences in the sequence of human DNA that can alter gene expression and influence the organism's susceptibility to disease as well as its responses to the environment. Thus, in addition to microbial and mechanical factors related to the root canal itself, factors intrinsic to the host may interfere with the success of endodontic treatment and the need for reintervention. Thus, the aim of this study was to investigate molecular aspects involved in the persistence of post-treatment periapical lesions by collecting saliva samples to compose a DNA bank, extraction of genomic material, clinical and radiographic evaluation, and genotyping by allelic discrimination analysis. Patients who had pulpal necrosis and periapical lesion installed at the time of endodontic treatment were called for follow-up visits. To date, 212 patients, who had treatment completed at least one year prior to the follow-up visit, have been included in this study. Of this total, 101 patients had clinical/radiographic signs and symptoms indicative of persistent periapical lesions and 111 individuals had lesion repair. Freshly collected saliva samples at the time of follow-up, as well as those already stored in the bank, were used as a source of genomic DNA, which was genotyped for the soluble mediator tumor necrosis factor-alpha (TNF - rs1800629) and TNF- α alpha and beta receptors (rs1800693 and rs1061622 respectively) by real-time PCR. The frequency of genotypes and alleles was evaluated by odds ratio, chi-square test or Fisher's exact test, using Graphpad Prism software. The significance level was set at 5%. The genetic polymorphism rs1800629 in TNF- α was associated as a protective factor for the development of persistent periapical lesions after endodontic treatment, while the genetic polymorphisms in TNF receptors (TNFRSF1A and TNFRSF1B), rs1800693 and rs1061622 respectively, were not associated with the development of persistent periapical lesions after endodontic treatment.

Key words: apical periodontitis, inflammatory mediators, bone remodeling process, genetic polymorphism.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	19
3 MATERIAIS E MÉTODOS	21
3.1 Casuística e critérios de elegibilidade da amostra	22
3.2 Avaliação de parâmetros clínicos e radiográficos	23
3.3 Coleta de material biológico (saliva) como fonte de material genômico	24
3.4 Extração do DNA	24
3.5 Seleção dos Polimorfismos Genéticos e Genotipagem por PCR	25
3.6 Análise estatística	26
4 RESULTADOS	27
4.1 Análise das características observadas nos grupos de estudo	28
4.2 Análise dos polimorfismos genéticos	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÕES	36
7 REFERÊNCIAS	38

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A periodontite apical é uma condição inflamatória e infecciosa que resulta de uma reacção do hospedeiro de uma infecção polimicrobiana anaeróbica do sistema radicular, que leva à necrose do tecido pulpar (SILVA-SOUSA et al., 2020). Trata-se de uma lesão caracterizada por um infiltrado inflamatório misto, formado por neutrófilos, linfócitos T e B, plasmócitos, macrófagos e células dendríticas, com prevalência celular de acordo com estágio da doença (STASHENKO et al., 1998; LIAPATAS et al., 2003; MARTON et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2014; ROMUALDO et al., 2018; JESUS et al., 2019). Essa inflamação acomete e danifica os tecidos e resulta em destruição do ligamento periodontal, cimento e osso alveolar ao redor do ápice radicular (SIQUEIRA et al., 2009; MARTON et al., 2014; ÇALIŞKAN et al., 2016; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; HIRAI et al., 2018; HUANG et al., 2018; MAZZI-CHAVES et al., 2018) decorrente da atividade osteoclástica (LIU et al., 2017; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; DESSAUNE NETO et al., 2018; MAZZI-CHAVES et al., 2018). Uma vez diagnosticada a lesão periapical, se faz necessária a eliminação ou redução dos micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares, a qual é alcançada por meio do preparo biomecânico, uso de soluções irrigantes e medicação intracanal, obturação dos canais, seguido do processo restaurador, o qual permite o restabelecimento da função do elemento dental (SIQUEIRA et al., 2008; ITO et al., 2011; SILVA et al., 2012; VERSIANI et al., 2013; CRAVEIRO et al., 2015; DE DEUS et al., 2015; VENSKUTONIS et al., 2015; ALVES et al., 2016; KANG et al., 2016; PEDRO et al., 2016; LEONI et al., 2017).

Sendo a lesão periapical uma doença multifatorial (HE et al., 2017), outros fatores além dos relacionados ao tratamento endodôntico e restaurador, incluem uma abordagem acerca das características intrínsecas do hospedeiro, seja por sua capacidade de defesa em resposta ao agente contaminante ou por sua capacidade de reparo após a remoção do mesmo (STASHENKO et al., 1992; DE DEUS et al., 2015; VENSKUTONIS et al., 2015; KHALIGHINEJAD et al., 2016). Além disso, a periodontite apical tem etiologia heterogênea, onde diferentes combinações bacterianas podem resultar em resultados clínicos semelhantes e, a microbiota endodôntica varia entre indivíduos e cada indivíduo apresenta um perfil bacteriano único, relativamente ao tipo de espécies presentes e à sua abundância (DE SOUSA et al., 2019). Nesse sentido, a relação entre resistência do hospedeiro versus a contaminação microbiana tem impacto direto no desenvolvimento e no reparo das doenças (HUSSEIN et al.,

2016). A persistência da periodontite apical após a realização do tratamento endodôntico pode estar relacionada à presença de perfurações radiculares, fraturas de instrumentos e à qualidade da obturação (CHUGAL et al., 2001; ABBAS et al., 2008; KANG et al., 2016). Entretanto, destaca-se que além dos cuidados durante o preparo biomecânico, recentemente a resistência do hospedeiro contra o potencial patogênico dos micro-organismos e a susceptibilidade a antimicrobianos comumente utilizados na endodontia tem sido estudada como um dos fatores que definem o sucesso ou insucesso após o tratamento endodôntico (LIAPATAS et al., 2003; LIN et al., 2005; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; MAZZI-CHAVES et al., 2018; ROMUALDO et al., 2018).

Nas últimas décadas, o entendimento das contribuições genéticas para o risco de desenvolvimento da periodontite apical e o risco de apresentar a periodontite apical persistente tem sido explorado em alguns estudos (SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; MENEZES SILVA et al., 2012; AMAYA et al., 2013; RÔÇAS et al., 2014; DILL et al., 2015; ALGHOFAILY et al., 2018; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; MAZZI-CHAVES et al., 2018; ROMUALDO et al., 2018). Em uma revisão recente, AMINOSHARIAE & KULILD (MAHESHWARI et al., 2016) mostraram que os polimorfismos genéticos podem ser modificadores biológicos de alguma suscetibilidade individual. De fato, muitos desses estudos anteriores propuseram que alguns polimorfismos genéticos podem ser marcadores genéticos para o desenvolvimento e instalação da periodontite apical persistente (MORSANI et al., 2011; MENEZES SILVA et al., 2012; AMAYA et al., 2013; GOMES et al., 2013; RÔÇAS et al., 2014; SIQUEIRA et al., 2009; AMINOSHARIAE et al., 2015; MAHESHWARI et al., 2016; ALGHOFAILY et al., 2018; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; DESSAUNE NETO et al., 2018; HUANG et al., 2018; MAZZI-CHAVES et al., 2018; PARADOWSK GORYCKA et al., 2018).

A liberação de citocinas e mediadores pró e anti-inflamatórios são comprovadamente associadas à progressão da lesão periapical e à indução da osteoclastogênese (DA SILVA et al., 2012; BEZERRA DA SILVA et al., 2014; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; DESSAUNE NETO et al., 2018; MAZZI-CHAVES et al., 2018; SALLAS et al., 2018) e sinalizam as funções de defesa e reparo do organismo (STASHENKO et al., 1990; SILVA et al., 2007; HIRAI et al., 2018). As citocinas funcionam como mensageiros e representam uma família de glicoproteínas que coordenam processos biológicos, como desenvolvimento embrionário,

imunidade, hematopoiese e reparo (ALEXANDER, 2002; LARSEN, RÖPKE, 2002; ALEXANDER, HILTON, 2004). Na lesão periapical, as citocinas anti-inflamatórias são responsáveis por coordenar a atividade das células inflamatórias e de reparo, tais como macrófagos teciduais. Já as citocinas pró-inflamatórias estimulam o processo de reabsorção e inibem a neoformação óssea (STASHENKO et al., 1990; SILVA et al., 2007; GRAVES et al., 2011). Estudos *in vivo* com animais knockout confirmaram a relação entre o infiltrado inflamatório e a síntese de citocinas associadas à indução da osteoclastogênese e progressão da lesão periapical (LARSEN, RÖPKE, 2002; DA SILVA et al., 2012; DE OLIVEIRA et al., 2015).

Neste estudo, o foco será o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), uma citocina que é supra-regulada em lesões periapicais experimentais e em humanos, principalmente naquelas lesões que se apresentam mais ativas, com maior expressão do ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) do que de osteoprotegerina (OPG) (WANG, STASHENKO, 1991; WANG et al., 1997; KAWASHIMA et al., 1999; PRSO et al., 2007; GARLET et al., 2012; ARAUJO PIRES et al., 2014; ROMUALDO et al., 2018; JESUS et al., 2019; NIKOLIC et al., 2019). O TNF- α exerce sua função através dos receptores de superfície 1 e 2, sendo que a maior parte dos efeitos antimicrobianos e pró-inflamatórios do TNF- α é mediada pelo receptor 1 (TNFRSF1A) enquanto os efeitos anti-inflamatórios são mediados pelo receptor 2 (TNFRSF1B) (PESCHON et al., 1998).

Cabe salientar que nem todos os indivíduos apresentam a mesma resposta fenotípica frente a determinado estímulo e tratamento. Isso ocorre devido às diferenças na sequência do DNA humano, que influenciam na susceptibilidade do organismo frente a doenças e nas suas respostas ao meio ambiente, diferenças essas que são consideradas normais e que, quando encontradas em mais de 1% da população, recebem a denominação de polimorfismos genéticos (BROOKES et al., 1999; CARNEIRO et al., 2017). O tipo mais comum de polimorfismo é o que envolve um nucleotídeo, chamado de polimorfismo de nucleotídeo único, polimorfismo de transição ou SNPs (single nucleotide polymorphisms), onde ocorre a substituição de um nucleotídeo por outro ocorrendo a troca de um par de bases, podendo ainda assim afetar a expressão de proteínas, a estrutura e a função de um gene (SACHIDANANDAM et al., 2001). A maioria dos SNPs ocorre em espaços intergênicos ou em componentes não codificadores de genes, portanto não apresentam repercussão funcional. Porém, os SNPs também podem ocorrer em regiões promotoras, codificadoras ou regulatórias do genoma,

afetando assim a expressão gênica, bem como podem influenciar na estabilidade do RNAm e na eficiência do processo de tradução. Dessa forma, polimorfismos genéticos podem alterar a síntese de uma proteína e também a função celular, o que pode ter íntima relação com a patogênese das alterações periapicais uma vez que SNPs de alguns genes podem modificar o risco do paciente na expressão fenotípica da doença (SCHORK et al., 2000; CHASMAN, ADAMS, 2001; SACHIDANANDAM et al., 2001; WAN et al., 2001; TAKASHIBA, NARUISHI, 2006; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; DESSAUNE NETO et al., 2018).

A interação entre sinais moleculares, influência genética e sinais clínicos ainda não foi completamente elucidada. Nos últimos anos, têm sido evidenciadas interações entre polimorfismos genéticos e o desenvolvimento, progressão e reparo da lesão periapical em genes ligados aos processos de inflamação e do metabolismo ósseo, como IL1B, IL6, IL8, IL10, TNF, RANK, RANKL, OPG, MMP1, MMP2, MMP3, MMP8 e HIF1A (YOSHIE et al., 2007; SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; MENEZES SILVA et al., 2012; RÔÇAS et al., 2014; DILL et al., 2015; EVROSI-MOVSKA et al., 2015; ALGHOFAILY et al., 2018; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; DESSAUNE NETO et al., 2018; MAZZI-CHAVES et al., 2018). No entanto, estes estudos ainda são controversos em alguns pontos, sendo limitados por variáveis metodológicas e amostrais, do ponto de vista da doença, do tratamento e também de fatores étnicos e individuais (MAHESHWARI et al., 2016; TROMBONE et al., 2016). Além disso, poucos estudos relatam a associação entre polimorfismos genéticos e lesões periapicais persistentes (SIQUEIRA et al., 2009; AMAYA et al., 2013; ALGHOFAILY et al., 2018; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; DESSAUNE NETO et al., 2018; MAZZI-CHAVES et al., 2018).

Desta forma, tornam-se necessários mais estudos na área, visandose o entendimento sobre a influência de variações polimórficas na lesão periapical persistente (MAHESHWARI et al., 2016; BARREIROS et al., 2018a; BARREIROS et al., 2018b; DESSAUNE NETO et al., 2018; MAZZI-CHAVES et al., 2018). Considerando que os índices de insucesso endodôntico em casos de lesões periapicais persistentes possam estar associados a fatores microbianos, fatores do tratamento endodôntico e do protocolo restaurador, e possam também ter relação com as características do hospedeiro, torna-se necessário o conhecimento de fatores relacionados à genética do indivíduo. Portanto, com base na busca sistemática realizada na literatura, torna-

se oportuno investigar as relações e os impactos de polimorfismos genéticos no mediador solúvel TNF- α , bem como seus receptores TNFRSF1A e TNFRSF1B, na suscetibilidade do hospedeiro às lesões periapicais persistentes, uma vez que essas variações podem estar relacionadas ao desenvolvimento dessas lesões.

PROPOSIÇÃO

2 PROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo foi investigar aspectos relacionados às lesões peri-
apicais persistentes, por meio de avaliação clínica, radiográfica e da discriminação alélica
por PCR em tempo real em DNA obtido da saliva para identificação de polimorfismos
nos genes *TNF*, *TNFRSF1A* e *TNFRSF1B*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística e critérios de elegibilidade da amostra

O universo amostral foi constituído por 2366 pacientes que foram submetidos ao tratamento endodôntico na Clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto a partir de um banco de dados com as informações de saúde e do tratamento prestado, banco esse que permitiu o acompanhamento clínico e radiográfico desses pacientes a partir do ano de 2013 até a presente data. Com relação ao tratamento, o universo amostral incluía casos com ausência e casos com presença de lesão periapical instalada no momento do tratamento. A partir desse total foi realizada análise e seleção de pacientes candidatos à pesquisa, totalizando assim, um universo de 313 pacientes que foram chamados para acompanhamento clínico/ radiográfico e coleta de saliva, posteriormente submetidos aos critérios de inclusão e exclusão da pesquisa. Quando necessário, exames de tomografia computadorizada foram solicitados e analisados.

De acordo com os critérios de inclusão desse estudo foram selecionados pacientes que apresentavam necrose pulpar e lesão periapical instalada no momento do tratamento endodôntico, sendo esse tratamento finalizado a no mínimo um ano antes da consulta de acompanhamento, conforme metodologia previamente estabelecida (SIQUEIRA et al., 2009; MORSANI et al., 2011; SIQUEIRA et al., 2011; RÔÇAS et al., 2014). Já com relação aos critérios de exclusão, pacientes que apresentaram tratamento endodôntico e/ou restaurador insatisfatórios (obturação com mais de 2 mm aquém do ápice radiográfico; sobreobturação; instrumentos fraturados; porosidade; canais não obturados; ausência de selamento coronário ou restaurações com infiltração marginal), fratura do elemento dental, indivíduos portadores de alguma síndrome e/ou imunologicamente comprometidos, bem como pacientes que não assinaram o TCLE autorizando a participação na pesquisa ou não compareceram para acompanhamento do caso foram considerados inelegíveis para este estudo. Dessa forma, a população final avaliada nesse estudo foi composta por 212 indivíduos (151 mulheres e 61 homens), com idade variando entre 16 e 83 anos.

3.2 Avaliação de parâmetros clínicos e radiográficos

Com base nos sinais clínicos e radiográficos, iniciais e do momento da consulta de acompanhamento, foi realizada a seleção de pacientes com lesão periapical persistente, conforme a presença de uma ou mais condições descritas na Tabela 1, de acordo com os critérios previamente estabelecidos por MORSANI et al. 2011, MAZZI-CHAVES et al. 2018, PETEAN et al. 2018 e PETEAN et al. 2019. Foram avaliados ainda os aspectos do tratamento endodôntico relacionados à qualidade da obturação e à persistência da lesão como sub ou sobre obturação, extravasamento de material obturador (cimento endodôntico ou guta-percha) e presença de espaços vazios.

Tabela 1. Critérios utilizados para determinação da saúde periapical após o tratamento endodôntico.

Lesão periapical persistente	Reparo da lesão
Ausência de cura da lesão radiograficamente	Resolução completa da lesão em um intervalo mínimo de um ano após o tratamento
Lesão periapical radiograficamente preexistente, em tamanho próximo ou maior ao inicial	Ausência de destruição tecidual evidente
Tratamento completo há mais de um ano, com presença de sinais e/ou sintomas de doença	Ausência da perda de função
Presença de sinais e/ou sintomas clínicos de desordem periapical (Exemplo: dor, edema ou fistula)	Ausência de dor, edema e fistula

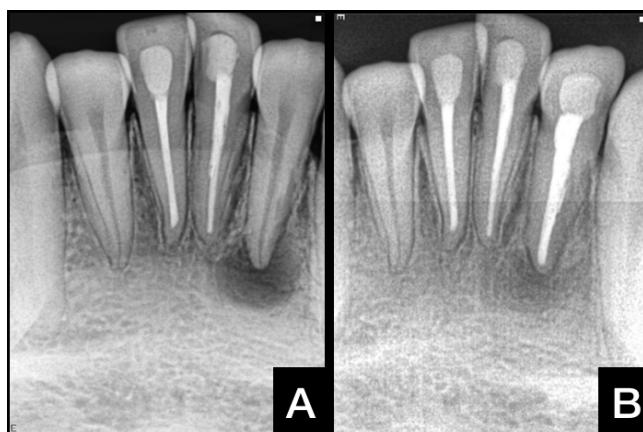


Figura 1. Radiografias periapicais utilizadas para avaliação e determinação da saúde periapical antes e após o tratamento endodôntico: (A) Radiografia inicial antes do tratamento endodôntico, em que observa-se dente 32 com rarefação óssea apical; (B) Radiografia de acompanhamento, 12 meses após o tratamento endodôntico, em que observa-se tratamento endodôntico realizado e encontra-se em processo de reparo da lesão periapical, em que é possível observar a neoformação do trabeculado ósseo e continuidade da lámina dura.

Dessa forma, após submissão aos critérios de elegibilidade e conforme as características observadas após o tratamento endodôntico, a população do estudo foi dividida em dois grupos: Lesão periapical persistente x Reparação da lesão, conforme ilustrado na Figura 2:

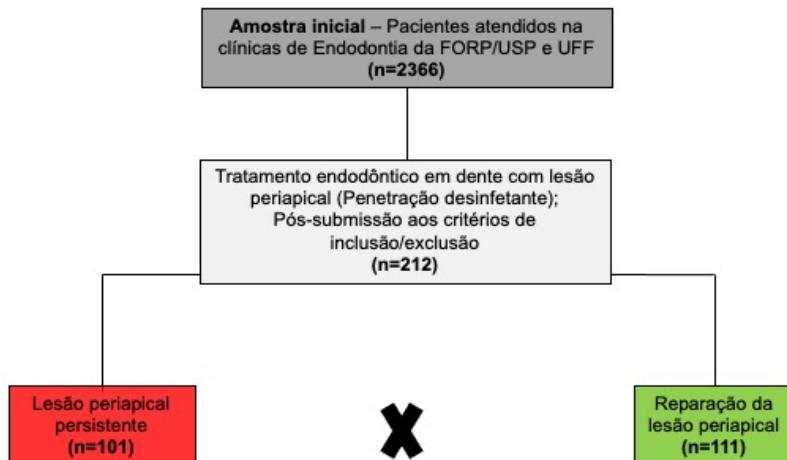


Figura 2. Fluxograma dos grupos experimentais, de acordo com os critérios clínicos e radiográficos para determinação da saúde periapical após o tratamento endodôntico.

3.3 Coleta de material biológico (saliva) como fonte de material genômico

Durante a consulta de acompanhamento, após autorização pelo paciente, amostras de saliva foram coletadas como fonte de DNA genômico. As amostras foram coletadas por meio de bochecho com 5 mL de solução salina 5% durante 1 minuto, e todo o volume do bochecho acondicionado em tubos falcon de 15 mL (Corning Inc., Corning, NY, EUA). Os tubos contendo amostras de saliva foram centrifugados a 550 rpm durante 10 minutos para sedimentação do *pellet* de células. O sobrenadante foi descartado em hipoclorito de sódio de 2,5% e o *pellet* ressuspensionado em 1mL de tampão de extração (Tris-HCl 10mM, pH 7.8; EDTA 5mM; SDS 0.5%). Posteriormente, as amostras foram transferidas para tubos *eppendorf* de 1,5 mL e congeladas a -20°C.

3.4 Extração do DNA

As amostras foram descongeladas e incubadas com 100 ng/mL [4 µL de Proteinase K (Fungal, Invitrogen Laboratories, Cat no25530-015) a 25 mg/mL] em banho-maria a 56°C *overnight* e então submetidas a processos de precipitação utilizando-se 400 µL de solução de acetato de amônio a 10 M. A seguir, os tubos agitados manualmente por 5

minutos; centrifugados por 15 minutos (12000 rpm) e o sobrenadante de cada amostra dividido em dois tubos *eppendorf* de 700 μ L cada. O mesmo volume de álcool isopropílico refrigerado (700 μ L) foi adicionado em cada tubo e agitado vigorosamente. A formação de "nuvem de DNA" foi observada em cada tubo de todas as alíquotas e então centrifugadas por 20 minutos com 12000 rpm a 40°C. E o sobrenadante descartado, com cuidado para não deslocar o *pellet* de DNA, e 1 mL de etanol 70% gelado adicionado para posterior centrifugação por 15 minutos com 12000 rpm a 40°C. Posteriormente o sobrenadante foi descartado e o tubo ficou aberto e embracado em papel para secar por pelo menos 30 minutos e evaporar o excesso de etanol 70%. O *pellet* de DNA foi ressuspensido em 50 μ L de tampão de extração (TE) e congelado a -20°C. A pureza e quantificação do DNA foram determinadas por meio de um espectrofotômetro (Nanodrop 1000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

3.5 Seleção dos Polimorfismos Genéticos e Genotipagem por PCR em tempo real

Para a avaliação das variações genéticas foram utilizados polimorfismos em genes reguladores do processo da resposta imuno-inflamatória (*TNF- α* , *TNFRSF1A* e *TNFRSF1B*), sendo selecionados polimorfismos baseados em estudos prévios de associação (SALLES et al., 2017), que se classificam como potencialmente funcionais, ou por influenciarem a expressão gênica. Foram utilizados os bancos de dados dbSNP do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>) e as variações polimórficas dos genes *TNF*, *TNFRSF1A* e *TNFRSF1B* foram selecionadas e avaliadas com auxílio do banco de dados da Universidade da Califórnia, Santa Cruz (USCS Genome Bioinformatics - <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>), em que foram verificadas a frequência de genótipos e alelos. Devido aos dados do HapMap Project e dbSNP serem derivados de populações não-brasileiras, os genótipos gerados nesse estudo puderam ser utilizados para uma análise da distribuição dos polimorfismos na nossa população. Os genes e polimorfismos genéticos selecionados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos genes e polimorfismos genéticos selecionados para a avaliação no presente estudo.

Gene	Polimorfismos	Trocas de bases	Consequência funcional	Global MAF
TNF-α	<i>rs1800629</i>	ATG[A/G]GGA	Intron variant	0.155316
TNFRSF1A	<i>rs1800693</i>	CAC[C/T]TCT	Intron variant	0.402034
TNFRSF2B	<i>rs1061622</i>	GCA[G/T]GGA	Initiator codon variant	0.234979

O ensaio de genotipagem dos polimorfismos selecionados foi executado segundo o método PCR utilizando ensaios *TaqMan*® de discriminação alélica adquiridos da empresa *Applied Biosystems* (Foster City, Califórnia, EUA), em conjunto com uma solução denominada *TaqManTM Genotyping Master Mix*®. Cada ensaio incluiu um par de *primers* flankeadores da região do polimorfismo bem como sondas específicas para a identificação dos alelos, compostas de dois oligonucleotídeos - desenhados um para cada sequência resultante da mudança de base - conjugados com fluoróforos que emitem fluorescência em comprimentos de ondas diferentes, denominados VICTM e FAMTM utilizando o aparelho *StepOnePlusTM Real-Time PCR System* (*Thermo Fisher Scientific*, Massachusetts, EUA), e a partir dela o *software* fornecido junto com o equipamento permitiu efetuar a discriminação alélica das amostras.

3.6 Análise estatística

Os grupos de análise foram categorizados como “Lesão periapical persistente” (LPP) e “Reparo da lesão” (RL) de acordo com a frequência genotípica e a distribuição dos alelos (MAZZI-CHAVES et al. 2018, PETEAN et al. 2018, e PETEAN et al. 2019). Todos os dados foram analisados por meio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, EUA). As diferenças de idade entre os grupos foram calculadas usando o teste T. O teste exato de Fisher e teste qui-quadrado de Pearson foram usados para comparações de gênero, raça, condição médica e hábitos entre os indivíduos dos grupos. Para avaliar se algum grupo esteve associado com algum perfil alélico e/ou genotípico no modelo convencional, dominante ou recessivo foram utilizados a razão de chance (odds ratio), o teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher. O equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliado usando o teste qui-quadrado dentro de cada polimorfismo. O nível de significância utilizado foi de 5% para todas as análises.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise das características observadas nos grupos de estudo

A população do estudo foi composta por 212 indivíduos, dos quais 101 foram incluídos como “Lesão periapical persistente” (LPP) e 111 como “Reparação da lesão” (RL). O tempo de acompanhamento dos casos foi de no mínimo 12 meses após a conclusão do tratamento endodôntico. As características sócio-demográficas, condições médicas e hábitos de saúde observadas em cada um dos grupos estão descritas na Tabela 3. A idade dos indivíduos variou de 16 a 83 anos, com média de $46,3 \pm 13,6$ anos.

Sessenta e sete pacientes apresentaram alguma alteração médica, incluindo diabetes, hipertensão e outras condições que podiam atuar como modificadores da doença. Quarenta reportaram ser fumantes. Nenhuma das características avaliadas apresentou diferença estatisticamente significante entre os grupos ($p>0,05$).

Tabela 3. Distribuição das características observadas entre os indivíduos dos grupos de estudo.

Característica	Total de indivíduos (n=212)	Lesão Periapical Persistente (n=101)	Reparação da lesão (n=111)	p
Média de idade \pm Desvio padrão	46,3 (13,6)	45,3(13,6)	47,3 (13,8)	0,29*
Gênero				
Homem (%)	61(28,8)	32(52,5)	29(47,5)	0,37**
Mulher (%)	151(71,2)	69(45,7)	82(54,3)	
Raça				
Branco (%)	114(53,8)	57(50,0)	57(50,0)	0,76**
Pardo (%)	67(31,6)	30(44,8)	37(55,2)	
Negro (%)	31(14,6)	14(45,2)	17(54,8)	
Alteração médica				
Sim (%)	67(31,6)	34(50,8)	33(49,2)	0,54**
Não (%)	145(68,4)	67(46,2)	78(53,8)	
Fumante				
Sim (%)	40(18,9)	21(52,5)	19(47,5)	0,49**
Não (%)	172(81,1)	80(46,5)	92(53,5)	

*Teste-T; **Teste do qui-quadrado.

4.2 Análise dos polimorfismos genéticos

A frequência genotípica e a distribuição dos alelos entre os grupos do estudo estão demonstradas nas Tabelas 4 e 5, respectivamente. Todos os polimorfismos genéticos estudados estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Em relação ao polimorfismo *rs1800629* em *TNF-α*, houve associação entre a distribuição genotípica entre os grupos estudados ($p=0,01$) e entre a distribuição alélica ($p=0,0006$). Em indivíduos que apresentaram o alelo A houve um menor risco a lesões periapicais persistentes ($p=0,0006$; OR 0,32, IC 0,16-0,64). Na análise do modelo dominante e recessivo, indivíduos que apresentaram pelo menos um alelo A (AA+AG X GG), no polimorfismo *rs1800629* em *TNF-α*, apresentaram maior chance ao reparo da lesão ($p= 0,0030$; OR 3,10; IC 1,40-6,90). Não houve associação entre os polimorfismos *rs1800693* e *rs1061622* e a lesão periapical persistente nos modelos aditivo, recessivo e dominante ($p>0,05$).

Tabela 4. Distribuição dos genótipos em *TNF-α*, *TNFRSF1A* e *TNFRSF1B*.

Gene (Polimorfismo)	Grupo	Genótipo n (%)			p*
		GG	AG	AA	
<i>TNF-α (rs1800629)</i>	LPP	87 (88,8)	9 (9,2)	2 (2,0)	0,01
	RL	72 (72,0)	20 (20,0)	8 (8,0)	
<i>TNFRSF1A (rs1800693)</i>	LPP	42 (42,4)	44 (44,4)	13 (13,2)	0,38
	RL	43 (41,3)	53 (51,0)	8 (7,7)	
<i>TNFRSF1B (rs1061622)</i>	LPP	69 (68,3)	27 (26,7)	5 (5,0)	0,23
	RL	70 (68,6)	31 (30,4)	1 (1,0)	

*Teste do qui-quadrado. Números em negrito representam diferença estatisticamente significante ($p\leq0,05$); OR indica a odds-ratio e IC representa o intervalo de confiança.

Tabela 5. Distribuição dos alelos em *TNF- α* , *TNFRSF1A* e *TNFRSF1B* entre os grupos de estudo.

Gene (Polimorfismo)	Grupo	Alelo n (%)		p*	OR (IC 95%)	
<i>TNF-α</i> (rs1800629)	A			0,0006	0,32 (0,16-0,64)	
	LPP	13 (6,6)	183 (93,4)			
	RL	36 (18,0)	164 (82,0)			
	T			0,64	0,91 (0,60-1,40)	
<i>TNFRSF1A</i> (rs1800693)	LPP	128 (64,7)	70 (35,3)			
	RL	139 (66,8)	69 (33,2)			
	G			0,57	1,62(0,69-1,90)	
	T					
<i>TNFRSF1B</i> (rs1061622)	LPP	37 (18,3)	165 (81,7)			
	RL	33 (16,2)	171 (83,8)			

*Teste do qui-quadrado. Números em negrito representam diferença estatisticamente significante (p≤0,05); OR indica a odds-ratio e IC representa o intervalo de confiança.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, têm sido propostas interações entre polimorfismos genéticos e a periodontite apical crônica em genes ligados aos processos de inflamação e do metabolismo ósseo, como *IL-1 β* , *IL-6*, *IL-8*, *IL-10*, *Fc γ RIIIa*, *TNF*, *RANK*, *RANKL*, *OPG*, *MMPS*, *TIMPS*, *DEFB1*, *BMP2*, *BMP4*, *SMAD6*, *RUNX2* e *WNT* (SIQUEIRA et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2011; MORSANI et al., 2011; MENEZES-SILVA et al., 2012; AMAYA et al., 2013; ROCAS et al., 2014; DILL et al., 2015; EVROSIMO-VSKA et al., 2015; MAHESHWARI et al., 2016; TROMBONE et al., 2016; MAZZI-CHAVES et al., 2018; SALLES et al., 2018; DE SOUSA et al., 2019; PETEAN et al., 2019; TORRES et al., 2020; ANTUNES et al., 2021; KUCHLER et al., 2021). Nesse sentido, a literatura evidencia a associação de componentes genéticos no estabelecimento, progressão, cronicificação e reparo da lesão periapical (SIQUEIRA & ROÇAS, 2009; MORSANI et al., 2011; MENEZES-SILVA et al., 2012; AMAYA et al., 2013; ROÇAS et al., 2014; DILL et al., 2015; ALGHOFAILY et al., 2018; BARREIRO et al., 2018a; BARREIRO et al., 2018b; MAZZI-CHAVES et al., 2018; ROMUALDO et al., 2018), uma vez que polimorfismos genéticos são modificadores biológicos de cada indivíduo que podem desencadear diferentes respostas imunes, quando desafiados por infestações microbianas, como no caso da lesão periapical (AMINOSHAIRE & KULILD, 2015).

No presente estudo, observou-se associação entre polimorfismos genéticos em *TNF- α* (rs1800629) com a persistência de lesões periapicais entre a distribuição genotípica entre os grupos estudados ($p=0,01$) e entre a distribuição alélica ($p=0,0006$), sendo que indivíduos que apresentaram o alelo A tiveram menor risco a lesões periapicais persistentes na análise do modelo aditivo ($p=0,0006$; OR 0,32, IC 0,16-0,64), o que também foi verificado na análise do modelo dominante e recessivo, uma vez que indivíduos que apresentaram pelo menos um alelo A (AA+AG X GG), no polimorfismo rs1800629 em *TNF- α* , apresentaram maior chance ao reparo da lesão ($p= 0,0030$; OR 3,10; IC 1,40-6,90). Por outro lado, não houve associação entre os polimorfismos rs1800693 em *TNFRSF1A* e rs1061622 em *TNFRSF1B*, e a lesão periapical persistente nos modelos aditivo, recessivo e dominante ($p>0,05$). Dessa forma, a hipótese nula do presente trabalho foi rejeitada para o polimorfismo rs1800629 em *TNF- α* e aceita para os polimorfismos em *TNFRSF1A* e *TNFRSF1B*, rs1800693 e rs1061622 respectivamente.

Com relação às metodologias de análise, nos últimos anos a avaliação da associação entre polimorfismos genéticos e a expressão de moléculas envolvidas nos processos de inflamação e de ativação celular tem sido realizada por meio de metodologias que

incluem a utilização de enzimas de restrição para detecção dos polimorfismos, DNA arrays, PCR (Reação em cadeia da polimerase) por eletroforese em gel de agarose, PCR em tempo real e PCR associado ao Sistema Taqman (RANADE et al., 2001; HIRATA et al., 2006), a qual foi selecionada para análise no presente estudo.

Os polimorfismos genéticos avaliados no presente estudo estão ligados a variações no gene que codifica o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), citocina supra-regulada em lesões periapicais experimentais e em humanos, principalmente em casos de lesões ativas com maior reabsorção óssea decorrente da maior expressão de RANKL (ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B) em relação a OPG (osteoprotegerina) (WANG & STASHENKO, 1991; WANG, TANI-ISHII & STASHENKO, 1997; KAWASHIMA & STASHENKO, 1999; PRSO et al., 2007; GARLET et al., 2012; ARAUJO-PIRES et al., 2014; NIKOLIC et al., 2019; ROMUALDO et al., 2018; JE-SUS et al., 2019). O polimorfismo genético rs1800629 já foi avaliado com relação a doenças ósseas, desordens temporo-mandibulares, doenças periodontais e doenças auto-imunes (MOFFETT et al., 2005; KOTRYCH et al., 2016; JIN, ZHOU & ZHANG, 2018; CHEN et al., 2019; LIAO et al., 2019; SHI et al., 2020). A literatura evidencia associação entre a o alelo A na variação rs1800629 em *TNF- α* como fator protetor a doenças relacionadas ao metabolismo ósseo, tais como osteoporose e risco de fraturas ósseas (MOFFETT et al., 2005; KOTRYCH et al., 2016; JIN, ZHOU & ZHANG, 2018), dados que corroboram com os resultados observados no presente estudo.

Por outro lado, dentre as variações em *TNF- α* , embora a substituição pelo alelo A tenha sido relacionado a maiores níveis de TNF- α (LOUIS et al., 1998), a variação rs1800629 em *TNF- α* não teve relação com as manifestações clínicas da periodontite apical crônica e aguda (SÁ et al., 2007; AMAYA et al., 2013). SHI et al., (2020) relataram em um artigo de revisão um maior risco ao desenvolvimento de doenças periodontais em pacientes diabéticos asiáticos relacionado a variação rs1800629 em *TNF- α* , o que pode ter relação com maiores níveis de TNF- α , apesar do estudo relatar que tais dados ainda são inconclusivos na literatura. Entretanto, embora a substituição pelo alelo A tenha sido relacionada a maiores níveis de TNF- α (LOUIS et al., 1998), a variação rs1800629 em *TNF- α* não teve relação com as manifestações clínicas da periodontite apical crônica e aguda (SÁ et al., 2007; AMAYA et al., 2013). Além disso, JAKOVLJEVIC et al., (2021) observaram, em um estudo de revisão sistemática e meta-análise, não haver associação entre a variação rs1800629 e o desenvolvimento de lesões periapicais, sendo que os

autores reforçam o baixo nível de evidencia científica nos estudos observados, reiterando a necessidade de estudos multicêntricos bem concebidos desde o nível Tais diferenças entre os resultados observados com os obtidos no presente estudo podem ser atribuídas a questões metodológicas e amostrais, principalmente devido ao perfil inflamatório de pacientes diabéticos, que apresentam uma tendência a maior expressão de citocinas inflamatórias, como TNF- α que consiste em um dos principais alvos terapêuticos da diabetes (KOULMANDA et al., 2012). Vale ressaltar que os estudos de associação genética realizados nas últimas duas décadas sugerem que a hereditariedade também pode afetar o curso clínico e desenvolvimento da lesão periapical, uma vez que polimorfismos em genes que codificam citocinas pró-inflamatórias são considerados potenciais marcadores genéticos de lesões periapicais (JAKOVLJEVIC et al., 2021). Além disso, cabe salientar que as diferenças podem ser também atribuídas a questões populacionais, uma vez que a população asiática pode apresentar frequência alélica diferente da população brasileira em relação a substituição entre os alelos A/G. Dessa forma, torna-se importante a realização de estudos multicêntricos compostos por diferentes populações e grupos étnicos, visando melhor entendimento acerca da associação ou não entre tais fatores genéticos e a etiopatogênese da lesão periapical (JAKOVLJEVIC et al., 2021).

A partir disso, tendo em vista que o TNF- α exerce sua função através dos receptores de superfície 1 e 2, sendo que a maior parte dos efeitos antimicrobianos e pró-inflamatórios do TNF- α é mediada pelo receptor 1 (*TNFRSF1A*) enquanto os efeitos anti-inflamatórios são mediados pelo receptor 2 (*TNFRSF1B*) (PESCHON et al., 1998), polimorfismos nesses genes também foram incluídos nesse estudo. A variação rs1800693 em *TNFRSF1A* já foi avaliada em relação a esclerose múltipla, doença celíaca, doenças autoimunes e câncer (DASHITI et al., 2020; SHAO et al., 2018; ROSSI et al., 2015; XU et al., 2014; COMABELLA et al., 2013), sendo que somente houve associação com a esclerose múltipla avaliada na população específica do Kwait (DASHITI et al., 2020) e câncer de mama em pacientes da China (XU et al., 2014). Dessa forma, a ausência de associação entre tal variação no gene *TNFRSF1A* com doenças autoimunes e esclerose múltipla em outras populações corroboram com os resultados observados no presente estudo, que também não evidenciou associação entre o polimorfismo rs1800693 em *TNFRSF1A* e o desenvolvimento de lesões periapicais persistentes ($p>0.05$).

Já com relação a variação rs1061622 em *TNFRSF1B*, tal polimorfismo foi avaliado em relação a doenças autoimunes, diabetes e artrite reumatoide (TOONEN et al., 2008; TABASSUM et al., 2009; VASILOPOULOS et al., 2011; CHEN et al., 2015; XIE

et al., 2016), não havendo associação em nenhuma das populações avaliadas assim como observado no presente estudo, no qual não houve relação entre o polimorfismo rs1061622 em *TNFRSF1B* e o desenvolvimento de lesões periapicais persistentes ($p>0,05$).

Entretanto, cabe salientar que o desenvolvimento de lesões periapicais persistentes está também relacionada com o tratamento endodôntico propriamente dito, uma vez que com relação às suas taxas de sucesso, os números variam entre 66 e 90% dos casos, sendo relacionados principalmente com fatores microbianos, fatores mecânicos e com a qualidade do tratamento endodôntico e do protocolo restaurador, os quais têm influência direta sobre o prognóstico do dente, sobretudo nos casos de alterações periapicais (WU et al., 2009; SETZER et al., 2011; ZUOLO et al., 2012; CRAVEIRO et al., 2015; EYUBOGLU et al., 2016; KANG et al., 2016; PEDRO et al., 2016; HE et al., 2017). Dessa forma, particularidades do tratamento como uso de medicação intracanal, seleção do cimento obturador e protocolo restaurador são aspectos que estão intimamente ligados aos resultados do tratamento e que podem influenciar no reparo de alterações periapicais (ROÇAS et al., 2014; CHUGAL et al., 2016; EYUBOGLU et al., 2016; HUSSEIN et al., 2016; PEDRO et al., 2016; KHALIGHINEJAD et al., 2017; BORGES-SILVA et al., 2017).

Portanto, considerando que os genes avaliados no presente estudo fazem parte da cascata inflamatória envolvida na formação e reparo das lesões periapicais, a associação entre a variação rs1800629 em *TNF- α* com o desenvolvimento de lesões periapicais persistentes sugere possíveis alvos terapêuticos interessantes para a prática clínica. Entretanto, novos estudos tornam-se necessários para replicação dos dados obtidos bem como análise da expressão genética, síntese e atividade proteica das citocinas pro e anti-inflamatórias envolvidas na etiopatogenia e reparo da periodontite apical crônica.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Assim, com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos neste estudo, é lícito concluir que:

1. Idade, gênero, raça, condição médica e hábitos de fumo não resultaram em diferenças com relação a resposta frente à terapia endodôntica.
2. O polimorfismo genético rs1800629 em *TNF-α* esteve associados como fator de proteção ao desenvolvimento de lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico.
3. Os polimorfismos genéticos nos receptores de TNF (*TNFRSF1A* e *TNFRSF1B*), rs 1800693 e 1061622 respectivamente, não estiveram associados ao desenvolvimento de lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico.
4. Polimorfismos genéticos em genes reguladores do processo inflamatório podem ser marcadores biológicos para lesões periapicais persistentes após o tratamento endodôntico.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

- AAE. Glossary of Endodontic Terms. Am Assoc Endodontists - AAE; 9 Ed. 2016.
- ALEXANDER, W. S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol.*, v. 2, p. 410–6, 2002.
- ALEXANDER, W. S.; HILTON, D. J. The Role of Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins in Regulation of the Immune Response. *Annu Rev Immunol.*, v. 22, p. 503–29, 2004.
- ALGHOFAILY, M.; TORDIK, P.; ROMBERG, E.; MARTINHO, F.; FOUAD, A. F. Healing of Apical Periodontitis after Nonsurgical Root Canal Treatment: The Role of Statin Intake. *J Endod.*, v. 44; p. 1355-60, 2018.
- AMAYA, M. P.; CRIADO, L.; BLANCO, B.; GÓMEZ, M.; TORRES, O.; FLÓREZ, L.; GONZALES, C. I.; FLÓREZ, O. Polymorphisms of pro-inflammatory cytokine genes and the risk for acute suppurative or chronic nonsuppurative apical periodontitis in a Colombian population. *Int Endod J.*, v. 46, p. 71-78, 2013.
- AMINOSHARIAE, A.; KULILD, J.C. Association of Functional Gene Polymorphism with Apical Periodontitis. *J Endod.*, v. 41, n. 7, p. 999-1007, 2015.
- ANTUNES, L. S.; CARVALHO, L.; PETEAN, I. B. F.; ANTUNES, L. A.; FREITAS, J. V.; SALLES, A. G.; OLEJ, B.; OLIVEIRA, D. S. B.; KÜCHLER, E. C.; SOUSA-NETO, M. D. Association between genetic polymorphisms in the promoter region of the defensin beta 1 gene and persistent apical periodontitis. *Int Endod J.*, v. 54, n. 1, p. 38-45, 2021.
- ARAUJO-PIRES, A. C.; FRANCISCONI, C. F.; BIGUETTI, C. C.; CAVALLA, F.; ARANHA, A. M.; LETRA, A.; TROMBONE, A. P.; FAVERI, M.; SILVA, R. M.; GARLET, G. P. 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.* b, v. 22, n. 4, p. 336-46, 2014.
- ARKO, B.; PREZELJ, J.; KOMEL, R.; KOIJANCIC, A.; HUDLER, P., MARC, J. Sequence variations in the osteoprotegerin gene promoter in patients with postmenopausal osteoporosis. *J Clin Endocrinol Metab.*, v. 87, n. 9, p. 4080-4084, 2002.
- BARREIROS, D.; NELSON, P.; PAULA-SILVA, F. W. G.; OLIVEIRA, K. M. H. DE.; LUCISANO, M. P.; ROSSI, A. DE.; SILVA, L. A. B.; KUCHLER, E. C.; SILVA, R. A. B. MMP2 and MMP9 are Associated with Apical Periodontitis Progression and Might be Modulated by TLR2 and MyD88. *Braz Dent J.*, v. 29, p. 43–7, 2018.a
- BARREIROS, D.; PUCINELLI, C.; OLIVEIRA, K. M. H. DE.; PAULA-SILVA, F. W. G.; NELSON FILHO, P.; SILVA, L. A. B.; KUCHLER, E. C.; SILVA, R. A. B. Immunohistochemical and mRNA expression of RANK, RANKL, OPG, TLR2 and MyD88 during apical periodontitis progression in mice. *J Appl Oral Sci.*, v. 26, p. e20170512, 2018. b
- BEZERRA DA SILVA, R. A.; NELSON-FILHO, P.; LUCISANO, M. P.; DE ROSSI, A.; DE QUEIROZ, A. M.; BEZERRA DA SILVA, L. A. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J.*, p. 4, p. 675–86, 2014.

BORGES SILVA, E. A.; GUIMARAES, L. S.; KUCHLER, E. C.; ANTUNES, L. A. A.; ANTUNES, L. S. Evaluation of Effect of Foraminal Enlargement of Necrotic Teeth on Postoperative Symptoms: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Endod.**, v. 43, n. 12, p. 1969-1977, 2017.

BORNSTEIN, M. M.; BINGISSER, A. C.; REICHART, P. A.; SENDI, P.; BOSSHARDT, D. D.; VON, A. R. X. T. Comparison between Radiographic (2-dimensional and 3-dimensional) and Histologic Findings of Periapical Lesions Treated with Apical Surgery. **J Endod.**, v. 41, p. 804-11, 2015.

BOSCHETTI, E.; SILVA-SOUSA, Y. T. C.; MAZZI-CHAVES, J. F.; LEONI, G. B.; VERSIANI, M. A.; PECORA, J. D.; SAQUY, P. C.; SOUSA-NETO, M. D. Micro-CT Evaluation of Root and Canal Morphology of Mandibular First Premolars with Radicular Grooves. **Braz Dent J.**, v. 28, p. 597-603, 2017.

CHEN, L.; HUANG, Z.; LIAO, Y.; YANG, B.; ZHANG, J. Association between tumor necrosis factor polymorphisms and rheumatoid arthritis as well as systemic lupus erythematosus: a meta-analysis. **Braz J Med Biol Res.**, v. 52, n. 3, p. e7927, 2019.

CHEN, W., XU, H.; WANG, X.; GU, J.; XIONG, H.; SHI, Y. The tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B polymorphisms predict response to anti-TNF therapy in patients with autoimmune disease: A meta-analysis. **Int Immunopharmacol.**, v. 1, p. 146-53, 2015.

CHUGAL, N.; MALLYA, S. M.; KAHLER, B.; LIN, L. M. Endodontic Treatment Outcomes. **Dent Clin North Am.**, v. 61, n. 1; p. 59-80, 2017.

COMABELLA, M.; CAMINERO, A. ; MALHOTRA, S.; AGULLÓ, L.; FERNÁNDEZ O.; REVERTER, F.; VANDENBROECK, K.; RODRÍGUEZ-ANTIGÜEDAD, A.; MATESANZ, F.; IZQUIERDO, G.; URCELAY, E.; LÓPEZ-LARIOS, A.; SÁNCHEZ, A.; OTERO, S.; TINTORÉ, M.; MONTALBAN, X. TNFRSF1A polymorphisms rs1800693 and rs4149584 in patients with multiple sclerosis. **Neurology**, v. 80, n. 22, p. 2010-6, 2013.

CRAVEIRO, M. A.; FONTANA, C. E.; DE MARTIN, A. S., BUENO, C. E. Influence of coronal restoration and root canal filling quality on periapical status: clinical and radiographic evaluation. **J Endod.**, v. 41, n. 6, p. 836-840, 2015.

DA SILVA, R. A. B.; FERREIRA, P. D. F.; DE ROSSI, A.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B. Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number. **J Endod.**, v. 38, p. 803-13, 2012.

DASHTI, M.; ATEYAH, K.; ALROUGHANI, R.; AL-TEMAIMI, R. Replication analysis of variants associated with multiple sclerosis risk. **Sci Rep.**, v. 10, n. 1, p. 7327, 2020.

DE OLIVEIRA, K. M. H.; DA SILVA, R. A. B.; DE ROSSI, A.; FUKADA, S. Y.; FERES, M.; NELSON-FILHO, P.; SILVA, L. A. B. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. **Int Endod J.**, v. 48, p. 46-59, 2015.

DE SOUZA, L. C.; CAVALLA, F.; MAILI, L.; GARLET, G. P.; VIEIRA, A. R.; SILVA, R. M.; LETRA, A. WNT gene polymorphisms and predisposition to apical periodontitis. **Sci Rep.**, v. 9, n. 1, p. 18980, 2019.

DESSAUNE NETO, N.; PORPINO, M. T. M.; ANTUNES, H. D. S.; RODRIGUES, R. C. V.; PEREZ, A.R.; PIRES, F. R.; SIQUEIRA JR, J. F.; ARMADA, L.

Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokine expression in post-treatment apical periodontitis. **J Appl Oral Sci.**, v. 26, p. e20170455, 2018.

DILL, A.; LETRA, A.; CHAVES DE SOUZA, L.; YADLAPATI, M.; BI-GUETTI, C.C.; GARLET, G.P., et al. Analysis of multiple cytokine polymorphisms in individuals with untreated deep carious lesions reveals IL1B (rs1143643) as a susceptibility factor for periapical lesion development. **J Endod.**, v. 41, n. 2, p. 197-200, 2015.

EVROSIMOVSKA, B.; DIMOVA, C.; POPOVSKA, L., ZABOKOVA-BILBLOVA, E. Matrix Metalloproteinase-8 Gene Polymorphism in Chronic Periapical Lesions. **Pril (Makedon Akad Nauk Umet Odd Med Nauki)**, v. 36, n. 2, p. 217-224, 2015.

EYUBOGLU, T.F.; OLCAY, K., OZCAN, M. A clinical study on single-visit root canal retreatments on consecutive 173 patients: frequency of periapical complications and clinical success rate. **Clin Oral Investig.**, v., n., p., 2016.

GAGLIARDI, J.; VERSIANI, M. A.; DE SOUSA-NETO, M. D.; PLAZAS-GARZON, A.; BASRANI, B. Evaluation of the Shaping Characteristics of ProTaper Gold, ProTaper NEXT, and ProTaper Universal in Curved Canals. **J Endod.**, v. 41, p. 1718-24, 2015.

Setzer et al., 2012;

GARLET, G. P.; HORWAT, R.; RAY, H. L. JR.; GARLET, T. P.; SILVEIRA, E. M.; CAMPANELLI, A. P.; TROMBONE, A. P.; LETRA, A.; SILVA, R. M. Expression analysis of wound healing genes in human periapical granulomas of progressive and stable nature. **J Endod.**, v. 38, n. 2, p. 185-90, 2012.

GRAVES, D. T.; OATES, T.; GARLET, G. P. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. **J Oral Microbiol.**, v. 8, p. 5304, 2011.

HE, J.; WHITE, R.K.; WHITE, C.A.; SCHWEITZER, J.L., WOODMANSEY, K.F. Clinical and Patient-centered Outcomes of Nonsurgical Root Canal Retreatment in First Molars Using Contemporary Techniques. **J Endod.**, v. 43, n. 2, p. 231-237, 2017.

HIRATA, M.H.; TAVARES, V.; HIRATA, R.D.C. From **Molecular Biology to Medicine: methods commonly used in pharmacogenetics**. Medicina (Ribeirão Preto); v. 39, n. 4, p.522-534, 2006.

HUSSEIN, F.E.; LIEW, A.K.; RAMLEE, R.A.; ABDULLAH, D., CHONG, B.S. Factors Associated with Apical Periodontitis: A Multilevel Analysis. **J Endod.**, v. 42, n. 10, p. 1441-1445, 2016.

JAKOVLJEVIC, A; NIKOLIC, N; JACIMOVIC, J; MILETIC, M; ANDRIC, M; MILASIN, J; AMINOSHARIAE, A; AZARPAZHOOH, A. Tumor Necrosis Factor Alpha -308 G/A Single-Nucleotide Polymorphism and Apical Periodontitis: An Updated Systematic Review and Meta-analysis. **J Endod.**, v. 47, n. 7, p. 1061-9, 2021.

JESUS, S. F.; COHENCA, N.; ROMUALDO, P. C.; NELSON-FILHO, P.; QUEIROZ, A. M.; SOUSA-NETO, M. D.; PAULA-SILVA, F. W. G.; SILVA, L. A. B. Radiographic and Immunohistochemical Evaluation of Root Canal Treatment Using Different Irrigation Systems. **Braz Dent J.**, v. 30, p. 123-132, 2019.

JIN, X.; ZHOU, B.; ZHANG, D. Replication Study Confirms the Association of the Common rs1800629 Variant of the TNF α Gene with Postmenopausal Osteoporosis Susceptibility in the Han Chinese Population. **Genet Test Mol Biomarkers**, v. 4, p. 246-251, 2018.

KANG, S. H.; KIM, B. S., KIM, Y. Cracked Teeth:

Distribution, Characteristics, and Survival after Root Canal Treatment. **J Endod.**, v. 42, n. 4, p. 557-562, 2016.

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

KHALIGHINEJAD, N.; AMINOSHARIAE, A.; KULILD, J. C.; WANG, J.; MICKEL, A. The Influence of Periodontal Status on Endodontically Treated Teeth: 9-year Survival Analysis. **J Endod.**, v. 43, n. 11, p. 1781-1785, 2017.

KIM, S., KRATCHMAN, S. Modern Endodontic Surgery Concepts and Practice: A Review. **J Endod.**, v. 32, p. 601-23, 2006.

KINANE, D. F.; HART, T. C. Genes and gene polymorphisms associated with periodontal disease. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v. 14, n. 6, p. 430-449, 2003.

KOTRYCH, D.; DZIEDZIEJKO, V.; SAFRANOW, K.; SROCYNSKI, T.; STANISZEWSKA, M.; JUZYSZYN, Z.; PAWLIK, A. TNF- α and IL10 gene polymorphisms in women with postmenopausal osteoporosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.**, v. 199, p. 92-5, 2016.

KOULMANDA, M.; BHASIN, M.; AWDEH, Z.; QIPO, A.; FAN, Z.; HANIDZIAR, D.; PUTHETI, P.; SHI, H.; CSIZUADIA, E.; LIBERMANN, T. A.; STROM, T. B. The role of TNF- α in mice with type 1- and 2- diabetes. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e33254, 2012.

KÜCHLER, E. C.; HANNEGraf, N. D.; LARA, R. M.; REIS, C. L. B.; OLIVEIRA, D. S. B.; MAZZI-CHAVES, J. F.; RIBEIRO ANDRADES, K. M.; LIMA, L. F.; SALLES, A. G.; ANTUNES, L. A. A.; SOUSA-NETO, M. D.; ANTUNES, L. S.; BARATTO-FILHO, F. Investigation of Genetic Polymorphisms in BMP2, BMP4, SMAD6, and RUNX2 and Persistent Apical Periodontitis. **J Endod.**, v. 47, n. 2, p. 278-285, 2021.

LARSEN, L.; RÖPKE, C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. **Front Biosci.**, v. 110, p. 833-44, 2002.

LIAO, L. N.; LI, C. I.; WU, F. Y.; YANG, C. W.; LIN, C. H.; LIU, C. S.; LIN, W. Y.; LI, T. C.; LIN, C. C. Important gene-gene interaction of TNF- α and VDR on osteoporosis in community-dwelling elders. **PLoS One**, v. 14, n. 12, p. e0226973, 2019.

LOUIS, E.; FRANCHIMONT, D.; PIRON, A.; GEVAERT, Y.; SCHAAF-LAFONTAINE, N.; ROLAND, S.; MAHIEU, P.; MALAISE, M.; DE GROOTE D.; LOUIS, R.; BELAICHE, J. Tumour necrosis factor (TNF) gene polymorphism influences TNF-alpha production in lipopolysaccharide (LPS)-stimulated whole blood cell culture in healthy humans. **Clin Exp Immunol.**, v. 113, n. 3., p. 401-6, 1998.

LOW, K. M. T.; DULA, K.; BÜRGIN, W.; VON, A. R. X. T. Comparison of periapical radiography and limited cone-beam tomography in posterior maxillary teeth referred for apical surgery. **J Endod.**, v. 34, p. 557-62, 2008.

MAZZI-CHAVES, J. F.; PETEAN, I. B. F.; SOARES, I. M. V.; SALLES, A. G.; ANTUNES, L. A. A.; SEGATO, R. A. B.; SILVA, L. A. B.; KÜCHLER, E. C.; ANTUNES, L. S.; SOUSA-NETO, M. D. Influence Of Genetic Polymorphisms In Genes Of Bone Remodeling And Angiogenesis Process In The Apical Periodontitis. **Braz Dent J.**, v. 29, p. 179-83, 2018.

MEHAFFEY, E.; MAJID, D. S. A. Tumor necrosis factor- α , kidney function, and hypertension. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 313, n. 4, p. 1005-1008, 2017.

MAHESHWARI, K.; SILVA, R.M.; GUAJARDO-MORALES, L.; GARLET, G.P.; VIEIRA, A.R., LETRA, A. Heat Shock 70 Protein Genes and Genetic Susceptibility to Apical Periodontitis. **J Endod.**, v. 42, n. 10, p. 1467-1471, 2016.

MENEZES-SILVA, R.; KHALIQ, S.; DEELEY, K.; LETRA, A., VIEIRA, A.R. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. **J Endod.**, v. 38, n. 5, p. 604-607, 2012.

MOFFETT, S. P.; ZMUDA, J. M.; OAKLEY, J. I.; BECK, T. J.; CAULEY, J.A.; STONE, K. L.; LUI, L. Y.; ENSRUD, K. E.; HILLIER, T. A.; HOCHBERG, M. C.; MORIN, P.; PELTZ, G.; GREENE, D.; CUMMINGS, S. R. Tumor necrosis factor-alpha polymorphism, bone strength phenotypes, and the risk of fracture in older women. **J Clin Endocrinol Metab.**, v. 90, n. 6, p. 3491-7, 2005.

MORSANI, J. M.; AMINOSHARIAE, A.; HAN, Y. W.; MONTAGNESE, T. A.; MICKEL, A. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. **J Endod.**, v. 37, p. 455-9, 2011.

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. In press.

PAULA-SILVA, F. W.; GHOSH, A.; SILVA, L. A.; KAPILA, Y. L. TNF-alpha promotes an odontoblastic phenotype in dental pulp cells. **J Dent Res.** v. 88, n. 4, p. 339-44, 2009.

PEDRO, F.M.; MARQUES, A.; PEREIRA, T.M.; BANDECA, M.C.; LIMA, S.; KUGA, M.C., et al. Status of Endodontic Treatment and the Correlations to the Quality of Root Canal Filling and Coronal Restoration. **J Contemp Dent Pract**, v. 17, n. 10, p. 830- 836, 2016.

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.**, v. 160, n. 2, p. 943-52, 1998.

PETEAN, I. B. F.; KÜCHLER, E. C.; SOARES, I. M. V.; SEGATO, R. A. B.; SILVA, L. A. B.; ANTUNES, L. A. A.; SALLES, A. G.; ANTUNES, L. S.; SOUSA-NETO, M. D. Genetic polymorphisms in RANK and RANKL are associated with persistent apical periodontitis. **J Endod.**, v. 45, n. 5, p. 526-531, 2019.

PETEAN, I. B. F. Influência de polimorfismos genéticos em genes do processo de remodelação óssea na lesão periapical. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, 2018.

PRSO, I. B.; KOCJAN, W.; SIMIĆ, H.; BRUMINI, G.; PEZELJ-RIBARIĆ, S.; BORCIĆ, J.; FERRERI, S.; KARLOVIĆ, I. M. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. **Mediators Inflamm.**, v. 2007, p. 38210, 2007.

RANADE, K.; CHANG, M.S.; TING, C.T.; PEI, D.; HSIAO, C.F.; OLIVIER, M., et al. High-throughput genotyping with single nucleotide polymorphisms. **Genome Res.**, v. 11, n. 7, p. 1262-1268, 2001.

RÔÇAS, I. N.; SIQUEIRA, J. F.; DEL AGUILA, C. A.; PROVENZANO, J. C.; GUILHERME, B. P. S.; GONÇALVES, L. S. Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. **J Endod.**, v. 40, p. 168–72, 2014.

ROMUALDO, P. C.; LUCISANO, M. P.; PAULA-SILVA, F. W. G.; LEONI, G. B.; SOUSA-NETO, M. D.; SILVA, R. A. B.; SILVA, L. A. B.; NELSON-FILHO, P. Ovariectomy Exacerbates Apical Periodontitis in Rats with an Increase in Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. **J Endod.**, v. 44; n. 5, p. 780-5, 2018.

ROSSI, E.; BASSO, D.; ZAMBON, C. F.; NAVAGLIA, F.; GRECO, E.; PELLOSO, M.; ARTUSO, S.; PADOAN, A.; PESCARIN, M.; AITA, A.; BOZZATO, D.; MOZ, S.; CANANZI, M.; GUARISO, G.; PLEBANI, M. TNFA Haplotype Genetic Testing Improves HLA in Estimating the Risk of Celiac Disease in Children. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0123244, 2015.

SÁ, A. R.; MOREIRA, P. R.; XAVIER, G. M.; SAMPAIO, I.; KALAPOTHAKIS, E.; DUTRA, W. O.; GOMEZ, R. S. Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. **Int Endod J.**, v. 40, p. 563-572, 2007.

SALLES, A. G.; ANTUNES, L. A. A.; CARVALHO, P. A.; KÜCHLER, E. C.; ANTUNES, L. S. Association Between Apical Periodontitis and TNF- α -308 G>A Gene Polymorphism: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Braz Dent J.**, v. 28, n. 5, p. 535-542, 2017.

SALLES, A. G.; ANTUNES, L. A. A.; KÜCHLER, E. C.; ANTUNES, L. S. Association between Apical Periodontitis and Interleukin Gene Polymorphisms: A Systematic Review and Meta-analysis. **J Endod.**, v. 44, n. 3, p. 355-362, 2018.

SETZER, F.C.; BOYER, K.R.; JEPSSON, J.R.; KARABUCAK, B., KIM, S. Long-term prognosis of endodontically treated teeth: a retrospective analysis of preoperative factors in molars. **J Endod.**, v. 37, n. 1, p. 21-25, 2011.

SETZER, F. C.; KOHLI, M. R.; SHAH, S. B.; KARABUCAK, B.; KIM, S. Outcome of Endodontic Surgery: A Meta-analysis of the Literature—Part 2: Comparison of Endodontic Microsurgical Techniques with and without the Use of Higher Magnification. **J Endod.**, v. 38, p. 1–10, 2012.

SHAO, X. Q.; DING, X. L.; MU, K.; WANG, X.; AN, X. F.; YAO, Q. M.; LI, L.; LI, Q.; SONG, R. H.; HE, S. T.; XU, J.; ZHANG, J. A. Associations of TNFRSF1A Polymorphisms with Autoimmune Thyroid Diseases: A Case-Control Study. **Horm Metab Res.**, v. 50, n. 2, p. 117-123, 2018.

SHI, L. X.; ZHANG, L.; ZHANG, D. L.; ZHOU, J. P.; JIANG, X. J.; JIN, Y. L.; CHANG, W. W. Association between TNF- α G-308A (rs1800629) polymorphism and susceptibility to chronic periodontitis and type 2 diabetes mellitus: A meta-analysis. **J Periodontal Res.**, Epub ahead of print, 2020.

SILVA, T. A.; GARLET, G. P.; FUKADA, S. Y.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. Q. Chemokines in Oral Inflammatory Diseases: Apical Periodontitis and Periodontal Disease. **J Dent Res.**, v. 86, p. 306–19, 2007.

SILVA-SOUZA AC, MAZZI-CHAVES JF, FREITAS JV, SALLES AG, SEGATO RABDS, SILVA LABD, ANTUNES LAA, ANTUNES LS, BARATTO-FILHO F, SOUSA-NETO MD, KÜCHLER EC. Association between Estrogen, Vitamin D and

Microrna17 Gene Polymorphisms and Periapical Lesions, **Braz Dent J**, v. 31, n. 1, p. 19-24, 2020.

SIQUEIRA, J. F.; RÔCAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J Dent Res.**, v. 88, p. 969-81, 2009.

SIQUEIRA, J.F., JR.; ROCAS, I.N.; PROVENZANO, J.C., GUILHERME, B.P. Polymorphism of the FcgammaRIIIa gene and post-treatment apical periodontitis. **J Endod.**, v. 37, n. 10, p. 1345-1348, 2011.

STASHENKO, P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. **Endod Dent Traumatol.**, v. 6, p. 89-96, 1990.

TABASSUM, R.; CHAVALI, S.; MAHAJAN, A.; GHOSH, S.; MADHU, S. V.; TANDON, N.; BHARADWAJ, D. Association analysis of TNFRSF1B polymorphisms with type 2 diabetes and its related traits in North India. **Genomic Med.**, v. 2, n. 3-4, p. 93-100, 2008.

TAKASHIBA, S., NARUISHI, K. Gene polymorphisms in periodontal health and disease. **Periodontol 2000**, v. 40, n., p. 94-106, 2006.

TOONEN, E. J.; COENEN, M. J.; KIEVIT, W.; FRANSEN, J.; EIJSBOUTS, A. M.; SCHEFFER, H.; RADSTAKE, T. R.; CREEMERS, M. C.; DE ROOIJ, D. J.; VAN RIEL, P. L.; FRANKE, B.; BARRERA, P. The tumour necrosis factor receptor superfamily member 1b 676T>G polymorphism in relation to response to infliximab and adalimumab treatment and disease severity in rheumatoid arthritis. **Ann Rheum Dis.**, v. 67, n. 8, p. 1174-7, 2008.

TORRES, A. F. C.; ANTUNES, L. S.; OLIVEIRA, N. F.; KÜCHLER EC, GOMES CC, ANTUNES LAA. Genetic Polymorphism and Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases in Periapical Lesions: Systematic Review. **J Endod.**, v. 46, n. 1; p. 3-11.e1, 2020.

TROMBONE, A.P.; CAVALLA, F.; SILVEIRA, E.M.; ANDREO, C.B.; FRANCISCONI, C.F.; FONSECA, A.C., et al. MMP1-1607 polymorphism increases the risk for periapical lesion development through the upregulation MMP-1 expression in association with pro-inflammatory milieu elements. **J Appl Oral Sci.**, v. 24, n. 4, p. 366- 375, 2016.

VASILOPOULOS, Y.; BAGIATIS, V.; STAMATOPOULOU, D.; ZISOPoulos, D.; ALEXIOU, I.; SARAFIDOU, T.; SETTAS, L.; SAKKAS, L.; MAMOURIS, Z. Association of anti-CCP positivity and carriage of TNFRII susceptibility variant with anti-TNF- α response in rheumatoid arthritis. **Clin Exp Rheumatol.**, v. 29, n. 4, p. 701-4, 2011.

VENSKUTONIS, T.; PLOTINO, G.; TOCCI, L.; GAMBARINI, G.; MAMINSKAS, J.; JUODZBALYS, G. Periapical and Endodontic Status Scale Based on Periapical Bone Lesions and Endodontic Treatment Quality Evaluation Using Cone-beam Computed Tomography. **J Endod.**, v. 41, p. 190-6, 2015.

VERSIANI, M. A.; PÉCORA, J. D.; SOUSA-NETO, M. D. Microcomputed tomography analysis of the root canal morphology of single-rooted mandibular canines. **Int Endod J.**, v. 46, p. 800-7, 2013.

VON, A. R. X. T.; ALSAEEED, M. The use of regenerative techniques in apical surgery: A literature review. **Saudi Dent J.**, v. 23, p. 113-27, 2011.

VON, A. R. X. T.; MONTAGNE, D.; ZWINGGI, C.; LUSSI, A. Diagnostic accuracy of endoscopy in periradicular surgery - a comparison with scanning electron microscopy. **Int Endod J.**, v. 36, p. 691-9, 2003.

WAN, M.; SHI, X.; FENG, X., CAO, X. Transcriptional mechanisms of bone morphogenetic protein-induced osteoprotegerin gene expression. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 13, p. 10119-10125, 2001.

WANG, C. Y.; STASHENKO, P. Kinetics of bone-resorbing activity in developing periapical lesions. **J Dent Res.**, v. 70, n. 10, p. 1362-6, 1991.

WANG, C. Y.; TANI-ISHII, N.; STASHENKO, P. Bone-resorptive cytokine gene expression in periapical lesions in the rat. **Oral Microbiol Immunol.**, v. 12, n. 2, p. 65-71, 1997.

WU, M.K.; SHEMESH, H., WESSELINK, P.R. Limitations of previously published systematic reviews evaluating the outcome of endodontic treatment. **Int Endod J**, v. 42, n. 8, p. 656-666, 2009.

XIE, X.; LI, F.; CHEN, J.; GAO, J.; LU, F. Association of TNFRSF1B +676 gene polymorphism with the risk of rheumatoid arthritis in Han Chinese population in Hunan. **Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban.**, v. 41, n. 9, p. 891-7, 2016. doi: 10.11817/j.issn.1672-7347.2016.09.002. PMID: 27640805.

XU, F.; ZHOU, G.; HAN, S.; YUAN, W.; CHEN, S.; FU, Z.; LI, D.; ZHANG, H.; LI, D.; PANG, D. Association of TNF- α , TNFRSF1A and TNFRSF1B gene polymorphisms with the risk of sporadic breast cancer in northeast Chinese Han women. **PLoS One**. v. 9, n. 7, p. e101138, 2014.

YOSHIE, H.; KOBAYASHI, T.; TAI, H., GALICIA, J.C. The role of genetic polymorphisms in periodontitis. **Periodontol 2000**, v. 43, n., p. 102-132, 2007.

ZUOLO, ML; KHERLAKIAN, D; MELLO-JR, JE; CARVALHO, MCC; FAGUNDES, MIRC. **Reintervenção em Endodontia**. 2 ed. Editora Santos, 2012.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE RIBEIRÃO PRETO

Comissão de Graduação

Folha de Informação

Em consonância com a Resolução CoCEx-CoG nº 7.497/2018, informamos que a Comissão de Graduação da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FORP/USP) em sua 509ª Reunião Ordinária, realizada em 02 de maio de 2022, **aprovou**, fundamentando-se na sugestão da Subcomissão para Avaliação dos Trabalhos de Conclusão de Curso (TCCs) da Unidade, **a inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital de Trabalhos Acadêmicos da USP (BDTA)**.

Cumpre-nos destacar que a disponibilização deste trabalho na BDTA foi autorizada pelos autores (estudante e docente orientador) no formulário de indicação de orientador (conforme anexo).

Ribeirão Preto, 22 de junho de 2022.

Prof. Dr. Michel Reis Messora
Presidente da Comissão de Graduação
FORP/USP

Ilma. Sra.

Profa. Dra. Maria Cristina Borsato

Presidente da Subcomissão para Avaliação dos TCCs da FORP

FORMULÁRIO DE INDICAÇÃO DE ORIENTADOR(A)

DADOS PESSOAIS

Nome: Guilherme Piedade Assed de Castro

Nº USP: 4117074

Período: 9º

Telefone de contato:(16) 99285-9239

E-mail USP: guilherme.assed@usp.br

INFORMAÇÕES SOBRE O TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Nome do Orientador(a): Manoel Damião de Sousa Neto

Departamento: Odontologia Restauradora

Área de conhecimento: Endodontia

Subárea: Polimorfismos genéticos

MODALIDADE

Modalidade: Pesquisa Científica, Tecnológica e Educacional

ACEITE DO(A) ORIENTADOR(A)

Eu, Prof(a). Dr(a). Manoel Damião de Sousa Neto, aceito ser orientador(a) do(a) aluno(a) supracitado(a), comprometendo-me a orientar, acompanhar e avaliar o desenvolvimento de seu Trabalho de Conclusão de Curso em todas as suas etapas.

Declaramos ter pleno conhecimento do Regulamento dos Trabalhos de Conclusão de Curso da FORP, estando, portanto, cientes de que este TCC poderá ser incluído na Biblioteca Digital de trabalhos Acadêmicos (BDTA) da USP.



Guilherme Piedade Assed de Castro



Manoel Damião de Sousa Neto