

**UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES
ÓSSEOS EM PACIENTES COM PERIODONTITE
AGRESSIVA GENERALIZADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista - UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

DANIEL FREIRE GALLAFASSI

SÃO PAULO

2017

UNIVERSIDADE PAULISTA - UNIP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES
ÓSSEOS EM PACIENTES COM PERIODONTITE
AGRESSIVA GENERALIZADA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista - UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia, sob orientação da Profa. Dra. Suzana Peres Pimentel

DANIEL FREIRE GALLAFASSI

SÃO PAULO
2017

Gallafassi, Daniel Freire.

Avaliação da expressão gênica de marcadores ósseos em pacientes com periodontite agressiva generalizada / Daniel Freire Gallafassi. - 2017.
16 f. : il.

Dissertação de Mestrado Apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista, São Paulo, 2017.

Área de Concentração: Cirurgia Bucomaxilofacial.

Orientadora: Prof.^a Dra. Suzana Peres Pimentel.

1. Periodontite Agressiva Generalizada. 2. Expressão Gênica. 3. Enxerto Ósseo. I. Pimentel, Suzana Peres (orientadora). II. Título.

DANIEL FREIRE GALLAFASSI

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES
ÓSSEOS EM PACIENTES COM PERIODONTITE
AGRESSIVA GENERALIZADA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista - UNIP, para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

_____/____/____

Profa. Dra. Suzana Peres Pimentel

Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____

Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro

Universidade Paulista – UNIP

_____/____/____

Profa. Dra. Karina Teixeira Villalpando

Pontifícia Universidade Católica - PUC

Agradecimento à Coordenação De Aperfeiçoamento De Pessoal De Nível Superior (CPES)

Agradeço à esta fundação do Ministério da Educação (MEC) pelo apoio concedido através do Programa de Suporte à Pós-Graduação de Instituições de Ensino Particulares/ PROSUP, contribuindo para a minha formação e para a manutenção de padrões de excelência do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Paulista – UNIP.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao *Prof. Dr. Márcio Zaffalon Casati* pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa junto à disciplina de Periodontia e o apoio da exemplar equipe de professores e pesquisadores, cuja excelência em didática e pesquisa, destacada pela sintonia e sincronismo em suas atividades, é sempre voltada para o nobre desafio de pesquisar o inédito:

- *Prof. Dra. Ana Paula Giorgetti*
- *Prof. Dr. Fabiano Ribeiro Cirano*
- *Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro*
- *Profa. Dra. Mônica Grazieli Corrêa*
- *Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin*
- *Profa. Dra. Suzana Peres Pimentel*

Um agradecimento especial à *Profa. Dra. Suzana Peres Pimentel* pelos ensinamentos, paciência e carinho com que me orientou ao longo destes dois anos.

Às colegas de pós-graduação *Denise, Vanessa e Ana Paula* pelo apoio fundamental no desenvolvimento clínico deste trabalho.

Ao *Prof. Dr. Renato Corrêa Viana Casarin, Profa. Dra. Fernanda Vieira Ribeiro e Profa. Dra. Mônica Grazieli Corrêa* pela participação fundamental no delineamento do projeto, bem como na árdua fase laboratorial.

Agradeço ainda ao *Prof. Dr. Gabriel Pires Pastore* por me acolher e apresentar esta universidade, proporcionando junto à sua equipe de Cirurgia, experiência completa nos programas de Graduação, Especialização em Implante, Especialização em Cirurgia e Residência e Cirurgia Bucomaxilofacial

- *Dra. Patrícia Radaic Pastore*

- *Dr. Luciano Mauro Del Santo*

- *Dr. Alexandre Javaroni Parti*

- *Dra. Juliana Campos*

- *Dr. Marcelo Carneiro*

Por último e não menos importante agradeço à minha família, minha namorada e meus amigos pelo apoio constante, companhia e suporte essenciais para atingir meus objetivos.

AValiação DA EXPRESSÃO GÊNICA DE MARCADORES ÓSSEOS EM PACIENTES COM PERIODONTITE AGRESSIVA GENERALIZADA

Resumo

A periodontite agressiva generalizada (PAG) é uma doença multifatorial que se caracteriza pela rápida destruição dos tecidos periodontais em pessoas mais jovens e sistemicamente saudáveis; além disso, a presença dessa doença é um fator de risco para falha de implantes osseointegrados. Embora haja muito conhecimento na literatura, ainda não é claro o efeito da PAG no osso alveolar em relação à expressão gênica de marcadores ósseos. Desta forma, o objetivo do presente estudo clínico, laboratorial, controlado e aleatorizado é avaliar a expressão gênica de marcadores ósseos no tecido ósseo de indivíduos com periodontite agressiva generalizada. Foram selecionados 16 indivíduos com periodontite agressiva generalizada, em fase de terapia periodontal de suporte (GAP), e 17 indivíduos com saúde periodontal (PH). Nesses pacientes, foram coletadas amostras de tecido ósseo da região posterior da mandíbula. Esses tecidos foram armazenados e submetidos à análise da expressão gênica de TNF- α , TGF- β , RANKL, OPG, OC, BSP e colágeno tipo I, importantes marcadores de osteogênese e osteoclasia, e avaliados por meio de PCR Tempo Real. Foram observados maiores níveis de mRNA para TGF- β e OPG no grupo PH quando comparado ao grupo GAP ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à expressão de TNF- α , BSP, RANKL, OC e COL-I. Estes resultados corroboram com a hipótese de que a PAG possa modular a expressão gênica dos marcadores relacionados ao osso.

Palavras-chave: Periodontite Agressiva Generalizada, Expressão Gênica, Enxerto Ósseo.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	8
CONCLUSÃO.....	11
REFERÊNCIAS	12

INTRODUÇÃO

A periodontite agressiva generalizada (PAG) é uma doença multifatorial que se caracteriza pela rápida destruição dos tecidos periodontais, pelo acometimento em pessoas sistemicamente saudáveis e, normalmente, pelo início antes dos 30 anos de idade¹.

A rápida progressão da PAG está intimamente relacionada com uma microbiota virulenta (elevadas proporções de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) e *Porphyromonas gingivalis* (Pg))²⁻⁴, anormalidades fagocíticas e hiper-responsividade de macrófagos⁵.

Um estudo comparando indivíduos portadores de periodontite crônica e agressiva generalizada mostrou que os indivíduos com PAG apresentaram menores níveis de IL-10 em bolsas periodontais e níveis semelhantes de IL-1 β , PGE2 e IFN γ . Nesse estudo, também foram encontrados menores níveis de anticorpos específicos para Aa e Pg nos pacientes com PAG. Isso explicaria a maior destruição tecidual, já que a IL-10 é uma citocina anti-inflamatória e influencia a maturação de células B plasmáticas, produtoras de anticorpos⁴.

Na PAG existe, frequentemente, elevado número de polimorfonucleares (PMNs) e algumas disfunções neutrofílicas, como anormalidades na adesão, quimiotaxia, geração de superóxidos, fagocitose e atividade bactericida^{6,7}. Ertugrul *et al.*⁸ e Bastos *et al.*⁹ observaram maior produção de citocinas pró-inflamatórias, como CCL28, IL-8, IL-1 β e TNF- α . Kanaparthi *et al.*¹⁰, Chopra *et al.*¹¹ e Wohlfeil *et al.*¹² observaram maiores níveis de proteína C reativa quando comparada a PAG com a periodontite crônica e com saúde, resultados também encontrados por Sun *et al.*¹³ e Salzberg *et al.*¹⁴.

Além desses achados, tem sido demonstrado que fatores genéticos regulam o sistema imune inato¹⁵ e que certos polimorfismos genéticos podem gerar um sistema imune defeituoso, alterando a defesa contra os microrganismos, o que leva à conclusão de que a PAG é causada pela combinação dos efeitos do ambiente e dos fatores genéticos¹⁶.

Como consequência desse conjunto de alterações, a PAG leva a altas taxas de perda dental¹⁷, e, para esses pacientes tão jovens, a reabilitação oral utilizando implantes dentais tem sido considerada uma importante ferramenta. Porém, diversos artigos mostram que a história progressiva de periodontite é um fator de risco importante para sobrevivência de implantes ao longo do tempo^{18,19}, com taxas ainda menores e mais graves quando se trata de periodontite agressiva²⁰⁻²⁵. Um estudo feito por Swierkot *et al.*²⁶ concluiu que pacientes com PAG tiveram 5 vezes mais risco de falha do implante, 3 vezes mais risco de ocorrência de mucosite e 14

vezes mais risco de desenvolvimento de peri-implantite, quando comparados a pacientes saudáveis.

O alto risco de infecção peri-implantar em pacientes com periodontite pode ser explicado microbiologicamente, por meio de estudos que mostraram uma associação entre bactérias periodontopatogênicas (*Aa*, *Pg*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Prevotella intermedia*) e doenças peri-implantares^{27,28}. A presença desses periodontopatógenos que colonizam a cavidade oral, mesmo após perdas dentais, foi demonstrada por Fernandes *et al.*²⁹. Sendo assim, sítios periodontais adjacentes a sítios com doença, língua, tonsilas e saliva podem ser reservatórios de micro-organismos patogênicos³⁰⁻³², funcionando como sítios de transfecção, possibilitando a colonização dos sítios peri-implantares. No entanto, como os periodontopatógenos também podem ser encontrados em tecidos peri-implantares saudáveis, somente a presença bacteriana não é suficiente para a aquisição da doença^{27,28}. Portanto, para a instalação da peri-implantite e, posteriormente, possível perda dos implantes, outros fatores, como suscetibilidade do hospedeiro e resposta inflamatória alterada, também devem estar associados, o que pode influenciar a homeostasia dos implantes dentais inseridos em pacientes com doenças periodontais.

Alguns mediadores têm importante função na reparação do tecido ósseo, bem como no processo de osseointegração, como a OPG, que se liga a ativadores do receptor do ligante kB do fator nuclear (RANKL) e evita a reabsorção óssea, e a BSP, que está relacionada à ligação de elementos básicos à matriz óssea extracelular e à mineralização óssea^{33,34}. A família TGF está ligada a proliferação osteoblástica, diferenciação e síntese de COL-I, que também está relacionada à atividade de formação óssea^{33,35}. Outros biomarcadores ósseos essenciais são a OCN, proteína da matriz óssea fabricada por osteoblastos que tem impacto importante sobre o metabolismo ósseo, e a ALP, enzima produzida por osteoblastos ativados que contribuem para a deposição de hidroxapatita de cálcio no osso^{33,35}. Já a TNF- α é uma citocina pró-inflamatória que atua como potente ativador da reabsorção óssea e inibidor da formação óssea por estimulação da diferenciação dos osteoclastos^{8,36-38}, na prevenção do apoptose dos osteoclastos³⁹, no aumento da ativação dos osteoclastos⁴⁰ e na inibição da diferenciação osteoblástica⁴¹.

Um melhor entendimento do perfil desses fatores relacionados ao osso, que é o objetivo desta investigação, talvez possa elucidar os possíveis mecanismos através dos quais a presença da PAG interfere no osso remanescente após a perda dental. A hipótese adotada

neste trabalho é a de que a presença da PAG possa modular a expressão gênica dos marcadores relacionados ao osso.

CONCLUSÃO

Foram observados maiores níveis de mRNA para TGF- β e OPG no grupo PH quando comparado ao grupo GAP ($p < 0.05$). Não houve diferença estatística entre os grupos em relação à expressão de TNF- α , BSP, RANKL, OC e COL-I. Estes resultados corroboram com a hipótese de que a PAG possa modular a expressão genica destes marcadores relacionados ao osso.

REFERÊNCIAS

1. Lang Niklaus P, Bartold P Mark, Cullinan MP, Jeffcoat Marjorie, Mombelli Andrea, Murakami Shinya, *et al.* Consensus Report: Aggressive Periodontitis. *Ann Periodontol* [Internet]. 1999;4(1):53–53. Available at: <http://www.joonline.org/doi/abs/10.1902/annals.1999.4.1.53>
2. Cortelli Jose R, Cortelli Sheila Cavalca, Jordan Shawn, Haraszthy VI, Zambon JJ. Prevalence of periodontal pathogens in Brazilians with aggressive or chronic periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2005;32(8):860–6.
3. Gajardo Marta, Silva Nora, Gómez Leyla, León Rubén, Parra Beatriz, Contreras Adolfo, *et al.* Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol.* 2005;76(2):289–94.
4. Casarin RC V, Del Peloso Ribeiro E, Mariano FS, Nociti FH, Casati MZ, Gonçalves RB. Levels of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, inflammatory cytokines and species-specific immunoglobulin G in generalized aggressive and chronic periodontitis. *J Periodontal Res.* 2010;45(5):635–42.
5. Tonetti Maurizio S, Mombelli Andrea. Early-Onset Periodontitis. *Ann Periodontol* [Internet]. 1999;4(1):39–52. Available at: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863374%5Cnfile:///Users/Liz/Documents/DC D PERIO/2 SEMINARS/Seminar 13 - Aggressive PDT/Extra reading/Tonetti and Mombelli 1999.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10863374%5Cnfile:///Users/Liz/Documents/DC%20PERIO/2%20SEMINARS/Seminar%2013%20-%20Aggressive%20PDT/Extra%20reading/Tonetti%20and%20Mombelli%201999.pdf)
6. Liu Rong Kun, Cao Cai Fang, Meng Huan Xin, Gao Yan. Polymorphonuclear neutrophils and their mediators in gingival tissues from generalized aggressive periodontitis. *J Periodontol* [Internet]. 2001 Nov;72(11):1545–53. Available at: <http://www.joonline.org/doi/10.1902/jop.2001.72.11.1545>
7. Meng Huanxin, Xu Li, Li Qiyang, Han Jie, Zhao Yibing. Determinants of host susceptibility in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000.* 2007;43(1):133–59.
8. Ertugrul AS, Sahin H, Dikilitas A, Alpaslan N, Bozoglan A. Comparison of CCL28, interleukin-8, interleukin-1 β and tumor necrosis factor-alpha in subjects with gingivitis, chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis. *J Periodontal Res.* 2013;48(1):44–51.
9. Bastos MF, Lima JA, Vieira PM, Mestnik MJ, Faveri M, Duarte PM. TNF- α and IL-4 levels in generalized aggressive periodontitis subjects. *Oral Dis.* 2009;15(1):82–7.

10. Kanaparthi Aruna, Kanaparthi Rosaiah, Niranjana Nandini. Evaluation of serum C-reactive protein levels in subjects with aggressive and chronic periodontitis and comparison with healthy controls. *Dent Res J (Isfahan)*. 2012;9(3):261–5.
11. Chopra Rahul, Patil Sudhir R, Kalburgi Nagaraj B, Mathur Shivani. Association between alveolar bone loss and serum C-reactive protein levels in aggressive and chronic periodontitis patients. *J Indian Soc Periodontol [Internet]*. 2012;16(1):28–31. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3357029&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
12. Wohlfeil Martin, Scharf Susanne, Siegelin Yasemin, Schacher Beate, Oremek Gerhard M, Sauer-Eppel Hildegund, *et al.* Increased systemic elastase and C-reactive protein in aggressive periodontitis (CLOI-D-00160R2). *Clin Oral Investig*. 2012;16(4):1199–207.
13. Sun XJ, Meng HX, Shi D, Xu L, Zhang L, Chen ZB, *et al.* Elevation of C-reactive protein and interleukin-6 in plasma of patients with aggressive periodontitis. *J Periodontol Res*. 2009;44(3):311–6.
14. Salzberg Trang N, Overstreet Benjamin T, Rogers Jeffrey D, Califano Joseph V., Best Al M, Schenkein Harvey a. C-Reactive Protein Levels in Patients With Aggressive Periodontitis. *J Periodontol*. 2006;77(6):933–9.
15. Alper Scott, Laws Rebecca, Lackford Brad, Boyd Windy a, Dunlap Paul, Freedman Jonathan H, *et al.* Identification of innate immunity genes and pathways using a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(19):7016–21.
16. Albandar J. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000*. 2014;65(1):13–26.
17. Nibali L, Farias BC, Vajgel a, Tu YK, Donos N. Tooth loss in aggressive periodontitis: a systematic review. *J Dent Res [Internet]*. 2013;92(10):868–75. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23955159>
18. Wen Xiujie, Liu DMD Rui, Li DMD Gang, Deng DMD Manjing. History of Periodontitis as a Risk Factor for Long-Term Survival of Dental Implants: A Meta-Analysis. 2014;1271–80.
19. Sgolastra F, Petrucci A, Severino M, Gatto R, Monaco A. Periodontitis, implant loss and peri-implantitis: A meta-analysis. *Clin Oral Implants Res*. 2015;26(4):e8–16.

20. Kim KK, Sung HM. Outcomes of dental implant treatment in patients with generalized aggressive periodontitis: a systematic review. *J Adv Prosthodont* [Internet]. 2012;4(4):210–7. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23236573>
21. Kehl Marcus, Swierkot Katrin, Mengel Reiner. Three-Dimensional Measurement of Bone Loss at Implants in Patients With Periodontal Disease. *J Periodontol*. 2011;82(May):689–99.
22. De Boever Annemarie L, Quirynen Marc, Coucke Wim, Theuniers Guy, De Boever Jan A. Clinical and radiographic study of implant treatment outcome in periodontally susceptible and non-susceptible patients: A prospective long-term study. *Clin Oral Implants Res*. 2009;20(12):1341–50.
23. Mengel Reiner, Behle Marion, Flores-de-Jacoby Lavin. Osseointegrated implants in subjects treated for generalized aggressive periodontitis: 10-year results of a prospective, long-term cohort study. *J Periodontol*. 2007;78(12):2229–37.
24. Mengel R, Schröder T, Flores-de-Jacoby L. Osseointegrated implants in patients treated for generalized chronic periodontitis and generalized aggressive periodontitis: 3- and 5-year results of a prospective long-term study. *J Periodontol* [Internet]. 2001;72(8):977–89. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11525449>
25. Hänggi Michael P, Hänggi Daniel C, Schoolfield John D, Meyer Jürg, Cochran David L, Hermann Joachim S. Crestal bone changes around titanium implants. Part I: A retrospective radiographic evaluation in humans comparing two non-submerged implant designs with different machined collar lengths. *J Periodontol*. 2005;76(5):791–802.
26. Swierkot Katrin, Lottholz Peer, Flores-de-Jacoby Lavin, Mengel Reiner. Mucositis, Peri-Implantitis, Implant Success, and Survival of Implants in Patients With Treated Generalized Aggressive Periodontitis: 3- to 16-Year Results of a Prospective Long-Term Cohort Study. *J Periodontol*. 2012;83(October):1213–25.
27. Casado Priscila Ladeira, Otazu Ivone Beatriz, Balduino Alex, de Mello Wallace, Barboza Eliane Porto, Duarte Maria Eugenia Leite. Identification of periodontal pathogens in healthy periimplant sites. *Implant Dent* [Internet]. 2011;20(3):226–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21613949>
28. Cortelli Sheila Cavalca, Cortelli José Roberto, Romeiro Rogério Lima, Costa Fernando Oliveira, Aquino Davi Romeiro, Orzechowski Paulo Roberto, *et al.* Frequency of periodontal pathogens in equivalent peri-implant and periodontal clinical statuses. *Arch Oral Biol*. 2013;58(1):67–74.

29. Fernandes Camila Borges, Aquino Davi Romeiro, Franco GCN, Cortelli Sheila Cavalca, Costa Fernando Oliveira, Cortelli José Roberto. Do elderly edentulous patients with a history of periodontitis harbor periodontal pathogens? *Clin Oral Implants Res.* 2010;21(6):618–23.
30. Quirynen Marc, Vogels Roel, Peeters Wouter, Van Steenberghe Daniel, Naert Ignace, Haffajee Anne. Dynamics of initial subgingival colonization of “pristine” peri-implant pockets. *Clin Oral Implants Res.* 2006;17(1):25–37.
31. Aoki Masanori, Takanashi Kiyotoshi, Matsukubo Takashi, Yajima Yasutomo, Okuda Katsuji, Sato Toru, *et al.*. Transmission of Periodontopathic Bacteria from Natural Teeth to Implants. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2012;14(3):406–11.
32. Sumida Shinichi, Ishihara Kazuyuki, Kishi Masataka, Okuda Katsuji. Transmission of periodontal disease-associated bacteria from teeth to osseointegrated implant regions. *Int J Oral Maxillofac Implants.* 2002;17(5):696–702.
33. Stein GS, Lian JB. Molecular mechanisms mediating proliferation/differentiation interrelationships during progressive development of the osteoblast phenotype. Vol. 14, *Endocrine Reviews.* 1993. p. 424–42.
34. Belibasakis Georgios N, Bostanci Nagihan. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. Vol. 39, *Journal of Clinical Periodontology.* 2012. p. 239–48.
35. Coulibaly Marlon O, Sietsema Debra L, Burgers Travis A, Mason Jim, Williams Bart O, Jones Clifford B. Recent advances in the use of serological bone formation markers to monitor callus development and fracture healing. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* [Internet]. 2010;20(2):105–27. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3070362&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
36. Lam J, Takeshita S, Barker JE, Kanagawa O, Ross FP, Teitelbaum SL. TNF- α induces osteoclastogenesis by direct stimulation of macrophages exposed to permissive levels of RANK ligand. *J Clin Invest.* 2000;106(12):1481–8.
37. Zhang Yan Hong, Heulsmann Antoinette, Tondravi M Mehrdad, Mukherjee Aditi, Abu-Amer Yousef. Tumor necrosis factor- α (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem.* 2001;276(1):563–8.
38. Lin Ho, Wang Shyi Wu, Wang Ray Yau, Wang Paulus S. Tumor necrosis factor- α mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism. *J Cell Biochem.* 2001;83(1):70–83.

39. Lee Shee Eun, Chung Woon Jae, Kwak Han Bok, Chung Chae Heon, Kwack KyumBum, Lee Zang Hee, *et al.* Tumor Necrosis Factor- α Supports the Survival of Osteoclasts through the Activation of Akt and ERK. *J Biol Chem.* 2001;276(52):49343–9.
40. Fuller Karen, Murphy Chiho, Kirstein Barrie, Fox Simon W, Chambers Timothy J. TNF α potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL. *Endocrinology.* 2002;143(3):1108–18.
41. Gilbert L, He X, Farmer P, Boden S, Kozlowski M, Rubin J, *et al.* Inhibition of osteoblast differentiation by tumor necrosis factor- α . *Endocrinology* [Internet]. 2000;141(11):3956–64. Available at: http://press.endocrine.org/doi/10.1210/endo.141.11.7739?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed