

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO**  
**PRETO**  
**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOMOLECULARES**

**JOÃO LUIZ GUILHERME NETO**

**As Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos estão envolvidas na  
reabsorção óssea durante periodontite apical experimental**

**RIBEIRÃO PRETO-SP**

**2023**

JOÃO LUIZ GUILHERME NETO

**As Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos estão envolvidas na reabsorção óssea durante periodontite apical experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

**Orientador:** Prof. Dr. Sandra Yasuyo Fukada  
Alves

RIBEIRÃO PRETO-SP

2023

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

### **Ficha Catalográfica**

Luiz Guilherme Neto, João.

As Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos estão envolvidas na reabsorção óssea durante periodontite apical experimental. Ribeirão Preto, 2023.

57p; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Fukada Alves, Sandra Yasuyo.

1. Lesão periapical.
2. Armadilhas Extracelulares.
3. Neutrófilos.
4. Osteoclastos.

**Nome:** Luiz Guilherme Neto, João.

**Título:** As Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos estão envolvidas na reabsorção óssea durante periodontite apical experimental

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Imunologia Básica e Aplicada.

**Aprovado (a) em:**

**Banca Examinadora**

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

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

Prof. Dr. \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

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

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

Trabalho realizado no Laboratório de Biologia Óssea, Departamento de Ciências BioMoleculares Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O trabalho recebeu auxílio financeiro do Núcleo de Apoio à Pesquisa em Doenças Inflamatórias, FAPESP, CAPES e CNPq.

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente para meus pais, João Cristóvão Guilherme e Maria de Lourdes Caretta Guilherme, que sempre me apoiaram durante toda minha vida estudantil, desde a pré-escola até, e principalmente, na conclusão dessa dissertação, lutando para que eu tivesse as melhores oportunidades e condições para alcançar meus sonhos. Se o mundo tivesse mais pais como vocês, seria um lugar muito melhor. Amo vocês incondicionalmente.

Aos meus irmãos, Bárbara Regina Caretta Guilherme, minha melhor amiga e demonstração de força que faz de tudo para me ver bem e feliz, e Hermes Henrique Caretta Guilherme que, com sua inteligência e aptidão, sempre me mostrava os caminhos para enfrentar a tecnologia e os percalços da vida.

Ao meu sobrinho, Pedro Guilherme Nunes, que é luz na minha vida, trazendo felicidade e encanto por onde passa.

Aos meus padrinhos, Nivaldo Guilherme e Maria de Fátima Guilherme, por serem pessoas sempre presentes, atuantes, apoiadores dos meus sonhos.

Aos meus professores do Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Campus Uberaba, em especial, Neide da Silveira, Marina Mineo e Gabriel Nascentes por serem os responsáveis pela minha paixão à ciência.

Aos meus amigos Raí Chaves, Juliana Jouannou e Flávio Ismerim, por suportarem minhas lamentações e sempre terem uma palavra para me confortar.

À minha amiga Elidianne Anibal por ser minha rocha, meu apoio e minha professora nas horas mais desesperadoras dessa trajetória.

A todos os meus familiares e amigos que sempre torceram pelas minhas conquistas.

Por fim, agradeço aos meus alunos que tiveram que aturar as histórias dos “ratinhos” e “explosões” do laboratório. A paixão pela educação é minha principal “doença”, e poder me tornar um professor com maior qualificação para retornar um pouco desse conhecimento para meus alunos é minha maior motivação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha orientadora Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Sandra Yasuyo Fukada Alves pelo apoio, ensinamentos, dedicação e paciência. Muito obrigado pela confiança e oportunidade depositados em mim. Sua simplicidade, honestidade e competência são de extrema importância para realizarmos um bom trabalho.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo e ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada pela oportunidade de conhecer e adentrar o maravilhoso mundo da pesquisa científica em alto nível.

Aos professores do Centro de Pesquisa em Doenças Inflamatórias (CRID), Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha, Prof. Dr. José Carlos Alves Filho e Prof. Dr. Thiago Mattar Cunha, pela cooperação para a realização desse trabalho.

Às professoras Dr<sup>ª</sup> Tarcília Aparecida da Silva e Dr<sup>ª</sup> Vilma de Lima pelas ideias e ensinamentos.

Aos professores da banca e suplentes por terem aceitado o convite e pela disposição em ler esta dissertação.

Aos pós-graduandos em Imunologia Básica e Aplicada da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em especial àqueles que se tornaram grandes amigos e companheiros nessa jornada, Conceição Elidiane Anibal e Alexsander de Moraes que foram essenciais para a realização dessa tese, sempre com suporte intelectual e alimentício.

Aos parceiros e amigos do Laboratório de Biologia Óssea, Lucas Gabriel Venturini, Thaise Mayumi Taira, Letícia Fernanda Duffles Rodrigues, Mariana Soares Pena Ribeiro e Ayda Henriques Schneider, pelos ensinamentos e momentos de descontração.

Às técnicas Mayara Santos Gomes e Juliana Aparecida Vercesi de Macedo por todo auxílio, ensinamento e descontração durante os experimentos e dia a dia no laboratório.

À psicóloga Vanessa Reis, que foi fundamental para a conclusão desse trabalho. O apoio à saúde mental dos alunos de pós-graduação deve estar cada vez mais presente nas discussões das diretorias das universidades.

Ao Centro Nacional de Pesquisas em Energia e Materiais (CNPEM) pelo escaneamento das microtomografias computadorizadas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil (CNPq) pelo suporte financeiro para que esse projeto fosse realizado.

Enfim, à todas as pessoas que me influenciaram a chegar até aqui, direta ou indiretamente, todas têm uma parcela de responsabilidade pela conclusão desse trabalho.



“Quando a educação não é libertadora, o sonho do oprimido é ser o opressor.”

**Paulo Freire**

NETO, J.L.G. **As Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos estão envolvidas na reabsorção óssea durante periodontite** experimental. 2023. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

## RESUMO

Periodontite apical é uma condição inflamatória/infecciosa da polpa dentária que resulta na destruição dos tecidos periapicais, incluindo osso alveolar. As Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) foram descritas como estruturas compostas de DNA e proteínas, como elastase e mieloperoxidase, que são capazes de matar bactérias extracelularmente. O envolvimento das NETs tem sido descrito em diferentes condições inflamatórias/infecciosas, mas seu papel no desenvolvimento de periodontite apical ainda não está claro. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar o papel das NETs na reabsorção óssea induzida pelo modelo de periodontite apical, induzido no primeiro molar mandibular de camundongos C57Bl/6. Para avaliar a participação das NETs na gênese da lesão, os camundongos foram tratados com DNase para inativação de NETs. Após a indução da lesão, observamos a redução do processo de reabsorção óssea alveolar em animais tratados. Além disso, demonstramos que animais submetidos a lesão periapical apresentaram aumento sérico de NETs se comparados a animais tratados com DNase. Em seguida, foi realizada a análise histológica para avaliar a extensão da lesão, assim como o infiltrado inflamatório e a presença de osteoclastos em animais tratados com DNase. Interessantemente, o tratamento dos animais resultou não apenas na redução da lesão, mas também na redução do infiltrado inflamatório local. Além disso, animais tratados apresentaram redução de osteoclastos no local da lesão, células envolvidas diretamente no processo de reabsorção óssea. Finalmente, analisamos a expressão gênica de marcadores de inflamação, formação e função de osteoclastos após a indução de lesão periapical e tratamento com DNase. Observamos que o tratamento após a lesão resultou em aumento na expressão dos genes Acid Phosphatase 5, Tartrate Resistant (*acp5*) e catepsina k (*ctsk*), diretamente relacionados à função e atividade de osteoclastos, respectivamente, em amostras de mandíbulas dos camundongos. No entanto, o gene peptidilarginina deiminase 4 (*pad4*), que é essencial para a liberação de NETs, não apresentou alteração no local da lesão mesmo com o tratamento, sugerindo que a degradação de NETs ocorreu apenas após a sua liberação pelos neutrófilos, e não durante a sua produção nas células. Em conclusão, os dados aqui apresentados contribuem para um maior entendimento da patogênese da periodontite apical no que diz respeito à contribuição da NETs na inflamação local e consequente reabsorção óssea após lesão tecidual.

**Palavras-chave:** Periodontite Apical. Lesão periapical. Armadilhas Extracelulares. Neutrófilos. Osteoclastos. Reabsorção Óssea.

NETO, J.L.G. **Neutrophil Extracellular Traps are involved in bone resorption during experimental apical periodontitis**. 2023. Master's dissertation. Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, SP, 2023.

## ABSTRACT

Apical periodontitis is an inflammatory/infectious condition of the dental pulp that results in the destruction of periapical tissues, including alveolar bone. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) have been described as structures composed of DNA and proteins, such as elastase and myeloperoxidase, that are capable of killing bacteria extracellularly. The involvement of NETs has been described in different inflammatory/infectious conditions, but their role in the development of apical periodontitis is still unclear. Thus, the aim of this study was to evaluate the role of NETs in bone resorption induced by the apical periodontitis model induced in the first mandibular molar of C57Bl/6 mice. To evaluate the participation of NETs in lesion genesis, the mice were treated with DNase for NET inactivation. After lesion induction, a reduction of the alveolar bone resorption process was observed in treated animals. Furthermore, it was demonstrated that animals submitted to periapical lesion showed an increase in serum NETs when compared to treated animals. Next, histological analysis was performed to evaluate the extent of the lesion, as well as the inflammatory infiltrate and the presence of osteoclasts in DNase treated animals. Interestingly, the treatment of the animals resulted not only in lesion reduction, but also in reduction of the local inflammatory infiltrate. Furthermore, treated animals showed a reduction of osteoclasts at the lesion site, cells directly involved in the bone resorption process. Finally, gene expression of inflammation markers, osteoclastogenesis and osteoclast function were analyzed after induction of periapical lesion and treatment with DNase. Thus, it was observed that treatment after injury resulted in increased expression of Acid Phosphatase 5, Tartrate Resistant (acp5) and cathepsin k (ctsk) genes, directly related to osteoclast function and activity, respectively, in mandible samples from the mice. However, the peptidylarginine deiminase 4 (pad4) gene, which is essential for NET release, showed no change at the lesion site even with treatment, suggesting that NET degradation occurred only after its release by neutrophils, and not during its production in the cells. In conclusion, the data presented here contribute to a better understanding of the pathogenesis of apical periodontitis with respect to the contribution of NETs in local inflammation and consequent bone resorption after tissue injury.

**Keywords:** Apical periodontitis. Periapical lesion. Extracellular traps. Neutrophils. Osteoclasts. Bone resorption.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ilustração da indução da lesão periapical.** Animais adultos com 8 semanas foram submetidos a lesão periapical mecânica. ....33
- Figura 2. Lesão induz forte infiltrado inflamatório.** (A) Imagem representativa de corte histológico corado com HE de mandíbulas de animais controles. (B) Imagem representativa de corte histológico de mandíbulas de animais com lesão periapical. Setas vermelhas indicam importante infiltrado inflamatório com a presença de neutrófilos. Imagens obtidas com aumento de 100x. ....37
- Figura 3. Tratamento com DNase inibe a reabsorção óssea induzida pela lesão periapical.** (A) Imagens de micro-CT da lesão periapical demonstrando grande área de reabsorção óssea (setas amarelas). (B) Imagens de micro-CT da lesão periapical de animais tratados com DNase demonstrando importante redução da área de reabsorção óssea (setas amarelas). ....39
- Figura 4. Tratamento com DNase diminui a área de reabsorção óssea.** Quantificação da área de reabsorção óssea em mm<sup>3</sup>. A análise estatística da comparação entre os grupos controle e tratado foi dada pelo teste T, \*\*\*p<0.001. ....40
- Figura 5. Diminuição de NETs na lesão periapical em animais tratados com DNase.** Quantificação de NETs em plasma de animais submetidos a lesão periapical. Análise estatística da comparação entre os grupos Controle e tratados com DNase foi dada pelo teste T, \*p<0.141
- Figura 6. Diminuição do infiltrado inflamatório e de células TRAP+ na lesão periapical.** (A) Imagem representativa de cortes histológicos da raiz do primeiro molar controle e com lesão apical de animais tratados ou não com DNase corados com HE. Linha pontilhada preta indica o local da lesão. (B) Quantificação da área do infiltrado inflamatório em mm<sup>2</sup> em animais não tratados e tratados com DNase. (C) Imagem representativa de cortes histológicos da raiz do primeiro molar controle e com lesão periapical de animais tratados ou não com DNase corados com TRAP+. Setas pretas indicam células TRAP+. (D) Número de células TRAP+ em animais não tratados e tratados com DNase. Imagens obtidas com aumento de 100x. Dados analisados por Student t test \*p<0.05 (n=5). ....42

**Figura 7. Expressão gênica de marcadores de NETs e de osteoclastos em amostras de mandíbulas.** Avaliação da expressão gênica de Pad4 (A), Acp5 (B), Ctsk (C), Cxcl1 (D) e Rankl (E) no local da lesão periapical de camundongos não tratados e tratados com DNase. Foi usado o método One-way ANOVA, \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparados com os respectivos controles e # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  e ###  $p < 0.001$  comparados com animais com lesão (n=5).....43

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b><i>acp5:</i></b>	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
<b>ANOVA:</b>	análise de variância
<b>CCL:</b>	quimiocina (motivo C-C) ligante
<b>CXCL:</b>	quimiocina (motivo C-X-C) ligante
<b>CD:</b>	cluster de diferenciação
<b>CT:</b>	controle
<b>Ct:</b>	Cycle Threshold
<b>DAMPs:</b>	padrões moleculares associados ao dano
<b>DNA:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DNase :</b>	Dornase alfa - Pulmozyme
<b>EDTA:</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético
<b>EPM:</b>	erro padrão da média
<b>H&amp;E:</b>	Hematoxilina e Eosina
<b>i.p:</b>	intraperitoneal
<b>IL:</b>	interleucina
<b>IFN<math>\gamma</math>:</b>	interferon gama
<b>kg:</b>	quilograma
<b>M-CSF:</b>	Fator estimulador de colônia de macrófagos
<b>mg:</b>	miligrama
<b>mL:</b>	mililitro
<b>mm<sup>2</sup>:</b>	milímetros quadrados
<b>mm<sup>3</sup>:</b>	milímetros cúbicos
<b>MPO:</b>	mieloperoxidase
<b>NE:</b>	elastase de neutrófilos
<b>NETs:</b>	neutrophil extracellular traps (armadilhas extracelulares de neutrófilos)
<b><i>pad-4:</i></b>	<i>peptidilarginina deminase 4</i>
<b>PAMPs:</b>	padrões moleculares associados a patógenos
<b>PBS:</b>	tampão de salina fosfato
<b>PCR:</b>	reação em cadeia da polimerase
<b>PFA:</b>	paraformaldeído
<b>PRRs:</b>	receptores de reconhecimento de padrões



<b>s.c:</b>	subcutânea
<b>TGF<math>\beta</math>:</b>	fator de transformação do crescimento beta
<b>TNF:</b>	fator de necrose tumoral
<b><math>\mu</math>g:</b>	micrograma
<b><math>\mu</math>m:</b>	micrômetro
<b>WT:</b>	<i>wild type</i>
<b><i>Ctsk:</i></b>	<i>Catepsina K</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>20</b>
1.1	Periodontite Apical	21
1.2	Osteoclastos e a reabsorção óssea	22
1.3	Tipos celulares que participam da Periodontite Apical	22
1.4	Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)	25
<b>2</b>	<b>HIPÓTESE</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>29</b>
3.1	Objetivo Geral	30
3.2	Objetivos Específicos	30
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>31</b>
4.1	Animais	32
4.2	Modelo de indução de lesão periapical por exposição da polpa do dente	32
4.3	Tratamento com DNase	33
4.4	Eutanásia e coleta de sangue periférico e tecidos	33
4.5	Extração de RNA e RT-qPCR	33
4.6	Inclusão de bloco de parafina e coloração HE e TRAP	33
4.7	Avaliação histomorfométrica da extensão da lesão periapical	34
4.8	Avaliação por microtomografia computadorizada (micro-CT)	34
4.9	Quantificação de NETs	35
4.10	Análise estatística	35
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>36</b>
5.1	Lesão periapical induz infiltrado inflamatório	37
5.2	Lesão Periapical induz reabsorção óssea local, mas tratamento com DNase inibe a reabsorção óssea	38
5.3	Tratamento com DNase reduz quantidade de NETs na lesão periapical em plasma de camundongos	40
5.4	Tratamento com DNase diminui infiltrado inflamatório e número de células TRAP+ na lesão periapical	41
5.5	Expressão de marcadores de NETs e da diferenciação e ativação de osteoclastos são alterados com o tratamento com DNase	42
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>

<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>50</b>
<b>9</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>56</b>

# **1 INTRODUÇÃO**

## 1.1 Periodontite Apical

Doenças periodontais englobam um amplo repertório de condições inflamatórias que podem afetar a estrutura de suporte dos dentes, tais como a gengiva, osso e ligamento periodontal (tecido conectivo de colágeno que ancora os dentes ao osso alveolar). A doença periodontal inicia-se com a gengivite induzida por bactérias presentes na placa dental, um biofilme microbiano que se forma sobre os dentes e gengiva, capaz de induzir lesão periodontal. A periodontite crônica geralmente ocorre devido a ausência de tratamento da gengivite progressiva, fenômeno que gera bolsas periodontais profundas e eventualmente ocasiona a perda dentária. Tanto a gengivite quanto a periodontite crônica sofrem influência direta de fatores genéticos e ambientais (KINANE *et al.*, 2017) e podem estar relacionadas a uma resposta imunológica desbalanceada que resulta em uma inflamação capaz de lesionar os tecidos periodontais (GRAVES, 2008).

Uma forma de periodontite crônica no ápice da raiz dos dentes são as lesões periapicais. Elas são induzidas por uma infecção bacteriana que percorre o canal radicular até atingir o ápice da raiz dos dentes, podendo levar a destruição dos tecidos mineralizados localizados nos arredores do ápice da raiz devido a uma resposta imunológica local (SILVA *et al.*, 2007). Diversos trabalhos descrevem que inúmeras citocinas contribuem para a patogênese da doença periapical, como as interleucinas (IL) IL-1 e IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (AKIRA *et al.*, 2006), IL-17 que leva a uma extensa atividade de osteoclastos, apresentando também degradação das fibras do ligamento e consequente formação de tecido de granulação, processos que juntos indicam uma alta atividade do sistema imune no local da lesão (KINANE *et al.*, 2017; ARANHA *et al.*, 2013).

Quando os mecanismos de defesa do hospedeiro são altamente ativados para conter os micro-organismos, eles podem não ficar restritos apenas à destruição das bactérias e causar danos ao próprio tecido adjacente ao dente, levando a reabsorção óssea apical (MÁRTON e KISS, 2000). Ou seja, se as infecções pulpares não forem tratadas ou o sistema imunológico do hospedeiro for incapaz de conter a infecção, pode ocorrer uma destruição progressiva do tecido ósseo e estruturas adjacentes no ápice da raiz do dente infeccionado (GAZIVODA *et al.*, 2009).

Sendo assim, o desenvolvimento da doença é controlado pela quantidade de bactérias no canal radicular e pela ação do sistema imunológico do hospedeiro em controlar a infecção e a inflamação sem causar danos em excesso ao tecido (ZEHNDER e BELIBASAKIS, 2015).

## 1.2 Osteoclastos e a reabsorção óssea

Os osteoclastos são células multinucleadas derivadas de células da linhagem de monócito/macrófagos que tem por principal função a reabsorção óssea, paralelamente, os osteoblastos têm como função a osteogênese (UDAGAWA *et al.*, 2021), e o equilíbrio entre a formação e a reabsorção óssea é essencial para o funcionamento correto do organismo. Situações patológicas podem levar a um desequilíbrio da atividade desses dois tipos celulares, o que é caracteristicamente observado em osteoporose, artrite reumatoide e periodontite apical (NOVACK *et al.*, 2008).

A diferenciação celular dos osteoclastos depende de estímulos específicos como a presença de fator estimulador de colônia de macrófago (M-CSF, do inglês *macrophage colony-stimulating factor*) e do ligante do receptor ativador de fator nuclear kappa  $\beta$  (RANKL, do inglês, *receptor activator of nuclear factor-kappa  $\beta$  ligand*) (UDAGAWA *et al.*, 2021), fenômenos que ocorrem de maneira contínua durante a vida do indivíduo. De fato, diversos trabalhos descrevem que essas células contribuem diretamente na patogênese e manutenção de doenças osteolíticas, tais como a diabetes, a osteoporose, a artrite reumatóide, a osteoartrite e a periodontite, alvo desse projeto. Diante do exposto, a investigação acerca da atividade dessas células é de extrema importância para o entendimento e desenvolvimento de futuros alvos terapêuticos para o controle e tratamento dessas patologias.

Além dos processos intrínsecos de osteoclastos e osteoblastos, destaca-se o papel da resposta imunológica no sítio da doença periodontal, onde a mesma é caracterizada por um amplo infiltrado neutrofílico e granulocítico, processos previamente induzidos devido ao gradiente quimiotático gerado por linfócitos e células dendríticas em resposta a infecção bacteriana prévia. Nesse cenário altamente pró-inflamatório, é descrita uma alta produção de citocinas, como fator de necrose tumoral (TNF, do inglês *tumour necrosis factor*), interleucinas, interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) assim como, fator de transformação do crescimento beta (TGF $\beta$ , do inglês *transforming growth factor- $\beta$* ) (CAVALLA *et al.* 2021).

## 1.3 Tipos celulares que participam da Periodontite Apical

Antígenos microbianos presentes em infecções da polpa dentária atuam por estimular o sistema imunológico causando importante resposta nos tecidos periapicais. Comumente, ocorre uma incapacidade dos mecanismos de defesa do indivíduo na erradicação dessas infecções, e como resultado desses processos ocorre a formação de granulomas periapicais. Interessantemente, estudos prévios demonstraram um amplo espectro de células imunes compõe

essas lesões (DRAZIC, et al., 2010, LEDESMA-MONTES, et al., 2006 e MARC, et al., 2010) e que esse infiltrado inflamatório periapical é composto, principalmente, de linfócitos, plasmócitos, macrófagos, entre outros tipos de células imunes.

Utilizando amostras clínicas de pacientes com granuloma periapicais, o estudo de LIMA e colaboradores (2011) revelou que ocorre uma correlação positiva de processos de angiogênese e presença de mastócitos, interessantemente há presença de mastócitos em todas as amostras analisadas. Essas células apresentavam uma alta expressão de marcadores clássicos como CD-34 e CD-105. Adicionalmente, é importante ressaltar que os mastócitos podem atuar para aumentar a vascularização e permeabilidade de pequenos vasos sanguíneos em lesões periapicais, mecanismo mediado principalmente através da liberação de histamina, processo que acaba contribuindo para desenvolvimento, expansão e recrutamento de outras células no local da lesão.

Outra população celular que participa ativamente na gênese e estabelecimento da lesão periapical, são os monócitos. Em um estudo pioneiro, Dezerega e colaboradores (2010) demonstraram a presença de CCL7 em biópsias, assim como em exsudatos periapicais. Sabe-se que CCL7 corresponde a uma potente quimiocina pleiotrópica envolvida principalmente na quimiotaxia de leucócitos, e sua expressão já tinha sido demonstrada em diferentes doenças inflamatórias caracterizadas principalmente pela destruição óssea, doenças tais como artrite reumatoide (HARINGMAN *et al.*, 2006) e periodontite crônica (DEZERECA *et al.*, 2010). A presença dessa quimiocina foi detectada através de western blot e imuno-histoquímica em amostras de pacientes com lesão periapical, mas não em pacientes saudáveis. É importante ressaltar que a CCL7 é produzida principalmente por monócitos, células endoteliais e fibroblastos e atua unindo seus receptores CCR-1, CCR-2, CCR-3 e CCR-5 presentes em um amplo e diverso espectro de leucócitos (MENTEN *et al.*, 2001) e um dos principais fenômenos no desenvolvimento da periodontite apical é a quimiotaxia.

Além da presença de diversas células que compõe o sistema imune inato, na lesão periapical ocorre, com uma significativa frequência e número, a presença de células da imunidade adaptativa, como os linfócitos T. Em uma revisão sistemática, Nael e colaboradores (2017) revelou que ocorre uma importante variação no tipo de lesão periapical avaliada na faixa etária dos individuais que apresentam a lesão. Além disso ao avaliar estudo que usavam modelos animais, o grupo também observou que ocorre o envolvimento de células T reguladoras (Treg) na modulação da resposta inflamatória em lesões radiculares cistos e granulomas periapicais, além disso em suas conclusões os mesmos destacam a importante relação entre Treg e Th17 que

acabam atuando em um equilíbrio sutil para inibir ou promover a progressão de lesões periapicais humanas.

Em consonância com os estudos citados acima, em um estudo pioneiro de FERREIRA e colaboradores (2016) foi demonstrado que ocorre uma importante associação entre a expressão de interleucina-17A (IL-17A) e infiltração de neutrófilos em abscessos periapicais, assim como granulomas periapicais. Adicionalmente, o grupo demonstrou que linfócito T efetor (CD4<sup>+</sup> ou CD8<sup>+</sup>) expressam IL-17A nessas lesões, e que essa citocina atua diretamente no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, contribuindo para a propagação da inflamação. As análises por imuno-histoquímica e imunofluorescência nas biópsias de lesões periapicais exibiram uma significativa área com marcação positiva para IL-17A e os níveis dessa citocina foram correlacionados positivamente com o número de neutrófilos nas lesões, dados que em conjunto sugerem participação dessa citocina principalmente nas fases agudas do processo inflamatório nas lesões periapicais (FERREIRA *et al.*, 2016)

Como citado acima, o início de um processo imunológico no tecido periapical, é desencadeado por antígenos microbianos e diferentes mediadores inflamatórios. A interleucina-8 (IL-8) é uma das primeiras citocinas secretadas no local da inflamação que causa migração de granulócitos neutrófilos (IIZASA *et al.*, 2001). Essa citocina é um importante mediador da inflamação e seu papel tem sido demonstrado nas lesões periapicais dentais crônicas (LUKÍĆ *et al.*, 2006). Ao utilizar amostras oriundas de pacientes com lesões periapicais, células inflamatórias foram previamente isoladas e analisadas morfo e fenotipicamente. Os resultados descritos demonstraram que uma produção relativamente alta de IL-8 em 19 das 21 lesões periapicais incluídas no estudo. Adicionalmente, os autores revelaram que o nível de IL-8 e a proporção de granulócitos, especificamente neutrófilos foram significativamente maiores no grupo de lesões sintomáticas, em comparação com as lesões assintomáticas, dados que em conjunto sugerem a participação de neutrófilos na iniciação da lesão periapical.

Ainda sobre o papel de citocinas na periodontite apical, IL-8 juntamente com CCL2 são as principais representantes funcionais da família de quimiocinas de proteínas reguladoras caracterizadas por efeitos bem estabelecidos na migração e ativação de células inflamatórias. De fato, além de seu efeito já bem descrito na condução de neutrófilos e migração, a IL-8 induz a proliferação de células epiteliais e endoteliais (KOCH *et al.*, 1992), a IL-8 contribui e é responsável por três características clássicas das lesões de granulomas periapicais: recrutamento de neutrófilos, expansão dos restos epiteliais e crescimento angiogênico dos vasos sanguíneos (MARTON *et al.*, 2000). Alguns trabalhos demonstraram que, no início de desenvolvimento de



lesões periapicais, antígenos bacterianos e endotoxinas do canal radicular, bem como IL-1 e fator de necrose tumoral (TNF) produzidos localmente podem fornecer o estímulo para a expressão de quimiocinas que, por sua vez, atrairiam mais células inflamatórias, estabelecendo a composição celular característica de granuloma periapical avançado (NAIR *et al.*, 1997 e SAFAVI *et al.*, 1991).

Em resumo, esses dados apontam que na periodontite apical crônica, as quimiocinas podem representar os principais agentes de uma cascata que aumenta a intensidade da inflamação local, contribuindo para o dano tecidual local e estimulando a liberação de mediadores inflamatórios, mecanismo que recruta ativamente granulócitos, especialmente neutrófilos para o local da lesão, fatores que, em conjunto, atuam comprometendo a saúde geral do indivíduo.

#### **1.4 Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)**

Durante o desenvolvimento da lesão, neutrófilos são ativados pela persistência do biofilme microbiano, e assim serem induzidos a morte por apoptose ou necrose, no interior da fenda gengival (KINANE *et al.*, 2017). Estudos têm demonstrado a importante influência de uma série de mecanismos imunológicos relacionados ao desenvolvimento da periodontite apical (MARTON e KISS, 2000; COLÍc *et al.*, 2009; TAIRA *et al.*, 2019), e especificamente com relação a respostas imunológicas de neutrófilos. Nesse sentido, diversos grupos têm estudado o possível papel de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*) no contexto de imunopatologias (PAPAYANNOPOULOS, 2018), tornando-as interessantes alvos no contexto de periodontite apical. Desenvolver mais esse parágrafo, falando dos outros tipos celulares presentes na lesão e falar do papel dos neutrófilos. Para pegar o gancho do próximo parágrafo.

NETs são estruturas extracelulares grandes em formato de teia, compostas por proteínas citosólicas e grânulos associados a cromatina descondensada dos neutrófilos (BRINKMANN *et al.*, 2004). A formação de NETs é desencadeada por ativação de receptores imune inatos, através de mediadores intracelulares tais como espécies reativas de oxigênio (ROS), produzidas pela NADPH oxidase ou pelo estresse mitocondrial, que ativam a mieloperoxidase (MPO), a elastase neutrofílica (NE) e a deiminase proteína-arginina tipo 4 (PAD4) para promover a descondensação da cromatina celular (PAPAYANNOPOULOS, 2018). Uma vez formada e secretada, as NETs podem neutralizar e matar uma série de patógenos, tais como bactérias, fungos, vírus e inclusive parasitos (BRINKMANN *et al.*, 2004; SAITOH *et al.*, 2012;

ABI ABDALLAH *et al.*, 2012) atuando num braço da resposta imunológica. Um estudo demonstrou previamente, o envolvimento de NETs com a infecção pelo periodontopatógeno *Porphyromonas gingivalis*, atuando em conjunto com a fagocitose para promover o controle da infecção (JAYAPRAKASH *et al.*, 2015).

Apesar de uma importante contribuição no controle e resolução de infecções, o papel das NETs pode ser dito como dual, haja visto que seu bloqueio foi capaz de reduzir o dano tecidual em um modelo murino de infecção da corrente sanguínea por *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina, sugerindo que essas podem induzir dano exacerbado ao tecido do hospedeiro (KOLACZKOWSKA *et al.*, 2015). Adicionalmente, essas proteínas expostas ao meio extracelular durante o processo de netose (liberação de NETs) colaboram para uma potencial apresentação de autoantígenos, assim como na liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (JORCH e KUBES, 2017), reforçando seu potencial pró-inflamatório e de contribuição para a autoimunidade.

Tendo em vista o papel de NETs em contribuir para lesão tecidual, e estudos que têm demonstrado que o uso de fármacos para depleção de NETs ou mesmo depleção de algum de seus constituintes, tais como PAD-4, tem resultado em maior sobrevivência e menor dano tecidual (CZAIKOSKI *et al.*, 2016; CÓLON *et al.*, 2019), faz-se interessante estudar o papel de NETs e um possível efeito positivo de sua depleção em um contexto de infecção. No presente projeto avaliamos o papel da NET na periodontite apical, haja visto o importante envolvimento de neutrófilos no sítio inflamatório gerado por essa patologia.

## **2 HIPÓTESE**

**Hipótese**

NETs influenciam no desenvolvimento da lesão periapical a partir da estimulação da osteoclastogênese.

### **3 OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o papel das NETs na inflamação e reabsorção óssea induzida em modelo de lesão periapical murino.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- 1 Avaliar os efeitos da degradação de NETs induzida por DNase sobre a inflamação ocasionada em modelo de lesão periapical induzida em camundongos.
- 2 Investigar o papel das NETs na atividade de reabsorção dos osteoclastos murinos *in vivo*.
- 3 Analisar a expressão de genes relacionados a inflamação, formação de NETs e osteoclastogênese no periodonto de camundongos submetidos a lesão periapical.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

## 4.1 Animais

Os animais utilizados foram obtidos no Biotério Central e Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto Campus de Ribeirão Preto da USP. Todos os experimentos seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, durante todo o curso do procedimento experimental. Número CEUA 22.1.545.60.4.

## 4.2 Modelo de indução de lesão periapical por exposição da polpa do dente

Para induzir o modelo de lesão, foram determinados os grupos de animais, doentes e naives (isto é, saudáveis). Os animais foram anestesiados por administração intraperitoneal de cloridrato de Cetamina (90 mg/kg) (Agener União Química Farmacêutica Nacional S/A. Embu-Guaçu, SP) e cloridrato de Xilazina (7,5 mg/kg) (Anasedan® 2 %, Ceva Santé Animale S/A. Paulínia, SP), e submetidos ao protocolo clássico de indução de lesão periapical (DE ROSSI et al., 2008; DA SILVA et al., 2012). Os animais foram então posicionados em uma mesa cirúrgica para realizar uma abertura coronária no primeiro molar inferior direito com uma broca esférica de aço inoxidável ¼ acoplada à caneta de baixa rotação e contra-ângulo. Após a abertura coronária, a entrada do canal distal foi explorada com uma lima endodôntica #08. O tamanho da abertura coronária foi padronizado de acordo com o diâmetro da broca e os canais foram expostos ao meio ambiente bucal. Os primeiros molares do lado esquerdo, sem exposição pulpar, constituíram o grupo controle. Após 7 dias de exposição pulpar, os animais foram submetidos à eutanásia com injeção intraperitoneal de ketamina (120 mg/kg) e xilasina (7,5 mg/kg). Ressalta-se que a eutanásia, seguida da coleta dos tecidos de interesse ocorreu em tempos distintos e será apontada em cada experimento.





**Figura 1. Ilustração da indução da lesão periapical.** Animais adultos com 8 semanas foram submetidos a lesão periapical.

### **4.3 Tratamento com DNase**

Os animais foram tratados com alfadornase, uma DNase utilizada experimentalmente para degradar NETs, com uma dosagem de 0,1 mg/kg, via injeção subcutânea, de 12 em 12 horas por 4 dias consecutivos, iniciado 24 horas após a indução da lesão periapical, totalizando 8 aplicações.

### **4.4 Eutanásia e coleta de sangue periférico e tecidos**

Os animais foram submetidos a eutanásia com injeção intravenosa de ketamina (120 mg/kg) e xilasina (7,5 mg/kg) e subsequente deslocamento cervical 7 dias após a indução da lesão. Após a certificação da morte do animal, o sangue foi coletado através de punção do plexo orbital utilizando capilar com 30 uL de EDTA. O plasma foi separado dos outros hemocomponentes através de centrifugação (1000 g, 10 minutos, 4°C), coletado e condicionado até análise à -70°C. Em seguida, os animais foram perfundidos com solução fosfato (pH 7,2) e terão os tecidos de interesse retirados e processados.

### **4.5 Extração de RNA e RT-qPCR**

Após a coleta dos tecidos de interesse, as amostras seguiram para extração de RNA seguindo o protocolo já estabelecido. A reação quantitativa do RT-PCR em tempo real foi realizada no ABI Prism 7500 Sequence Detection System, utilizando o sistema de fluorescência SYBR-green (Applied Biosystems, Warrington, UK) para a quantificação das amplificações. Os resultados foram analisados através do método comparativo de “cycle threshold” (CT).

### **4.6 Inclusão de bloco de parafina e coloração HE e TRAP**

Após o período experimental, as hemi-mandíbulas foram removidas e fixadas em formol tamponado a 10 % por 24 horas à temperatura ambiente, e posteriormente descalcificadas com uma solução à base de EDTA a 10 % (pH=7,4) por aproximadamente 30 dias. Para avaliar se o tecido foi descalcificado efetivamente, foi realizado um teste inserindo uma agulha de calibre 0,45 mm na região de incisivo. Caso a agulha penetre no incisivo sem nenhuma resistência, a amostra foi classificada como pronta para o processamento de inclusão em parafina. Então, as amostras foram desidratadas em ordem crescente de álcoois (Synth®) 70 %, 80 %, 95 % e 100

% e diafanizadas em xilol (Synth®). Subsequentemente, as mandíbulas foram imersas em parafina fundida (56 a 60°C), e incluídas em blocos de parafina com a face vestibular voltada para baixo utilizando uma central de inclusão (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os blocos de parafina contendo as mandíbulas foram cortados no sentido longitudinal em micrótopo (HistoCore AUTOCUT; Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) no sentido vestibulo-lingual. Lâminas de cortes semi-seriados de 5 µm foram obtidas em toda a extensão da amostra que incluía as raízes do primeiro molar com o ápice aberto. Alguns cortes semi-seriados de cada grupo experimental foram corados com hematoxilina e eosina (H&E) para análise histomorfométrica da reabsorção óssea alveolar apical, outros cortes semi-seriados de cada grupo experimental serão corados com TRAP para análise da quantidade de osteoclastos na lesão.

#### **4.7 Avaliação histomorfométrica da extensão da lesão periapical**

Após a coloração dos cortes histológicos, as lesões periapicais, ou as regiões de perda de estruturas ao redor do ápice dental envolvido, foram delineadas utilizando o programa de imagens ImageJ Software (U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, EUA) e suas áreas mensuradas em mm<sup>2</sup>. Os osteoclastos, os quais apresentarem uma coloração avermelhada (células TRAP-positivas) foram quantificados na região da lesão periapical da raiz distal do primeiro molar por meio de microscópio óptico (Nikon eclipse E200, Tóquio, Japão). Cortes representativos de HE e TRAcP foram fotografados com câmera AxioCam MRc5 acoplada ao microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha).

#### **4.8 Avaliação por microtomografia computadorizada (micro-CT)**

Para avaliação quantitativa tridimensional dos parâmetros ósseos dos fêmures (cortical e trabecular), os fêmures foram dissecados e fixados em formol tamponado a 10 % por 24 horas. Em seguida, as amostras foram escaneadas utilizando o aparelho de micro-tomografia computadorizada Micro-CT Sky Scan 1172 (Bruker Corporation, Billerica, EUA), com o tamanho de voxel de 8,7 µm, 49 kV, filtro de alumínio de 0.5 mm e 0.18° de rotação de ângulo. Para visualização, as imagens de projeção tridimensional (3D) foram reconstruídas utilizando o software NRecon (versão 1.7.4.2; Skyscan; Bruker Corporation, Billerica, EUA) e posteriormente cortes transversais de um segmento de 1 mm (209 secções) abaixo da diáfise média foram selecionadas para as análises de parâmetro ósseo trabecular como fração de volume ósseo trabecular (BV/TV, %), espessura trabecular (Tb.Th.) e densidade mineral óssea (g/cm<sup>3</sup>

), assim como análises da região cortical fração de volume ósseo cortical (BV/TV, %), espessura cortical (Co.Th.), bem como a porosidade cortical (Ct. Po) utilizando os programas de imagens Data Viewer e CTAn (Bruker micro-CT). A calibração foi dada a partir de um phantom com densidade de hidroxiapatita já conhecida (Skyscan, Aartselaar, Belgium).

#### **4.9 Quantificação de NETs**

Para avaliar a produção de NETs no tecido da lesão, foi utilizado o método MPO-DNA PicoGreen. Brevemente, foi utilizada uma placa Black Plate Clear Botton (Sigma-Aldrich) para realizar o coating com anti-MPO (1:100, ThermoFisher), overnight à 4°C. Em seguida, a placa foi lavada em solução de PBS-Tween 0,5% e incubada com as amostras, overnight à 4°C. Após nova lavagem., foi adicionado o reagente fluorescente Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA assay Kit (Invitrogen), conforme o protocolo do fabricante e, em seguida, foi realizada a leitura dos dados no aparelho FlexStation® 3, com excitação a 488nm e leitura a 525nm.

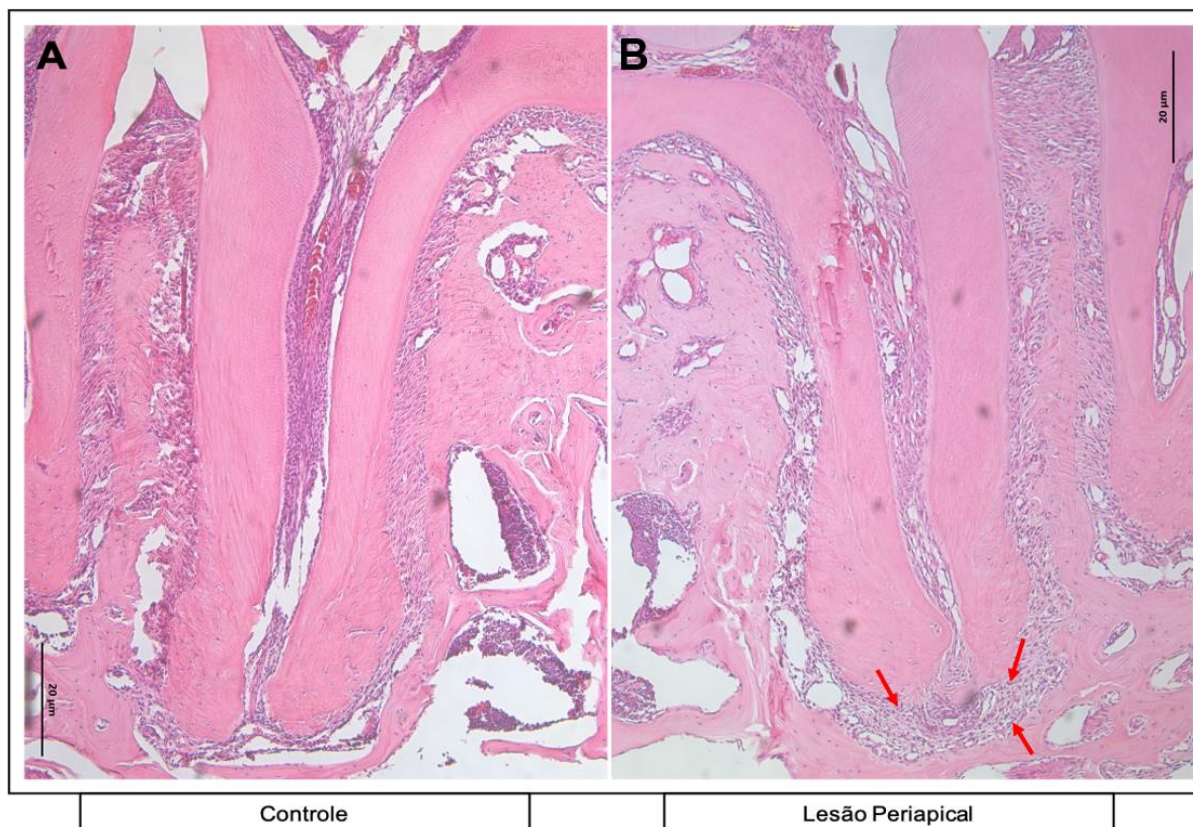
#### **4.10 Análise estatística**

Primeiramente, os dados foram avaliados quanto a sua distribuição pelos testes de D'Agostino's K-squared e Shapiro-Wilk utilizando GraphPad Software 7.0 (GraphPad Prism; GraphPad Software, San Diego). Em casos de distribuição normal dos dados, utilizamos o teste "t" de Student para comparar dois grupos e o teste de variância a um critério (One-way ANOVA) para comparar mais de dois grupos. Em caso de distribuição não normal, testes não-paramétricos de Mann-Whitney e Kruskal Wallis foram utilizados conforme os grupos a serem comparados. Em seguida, os pós-testes foram realizados conforme a necessidade. As diferenças das médias ou medianas serão consideradas significativas para valores de  $P < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS**

## 5.1 Lesão periapical induz infiltrado inflamatório

Inicialmente, foi investigado se NETs possuem participação no modelo de lesão periapical. Para isso, foram utilizados animais WT (C57/b6) e foi induzido a lesão periapical através de um modelo mecânico, previamente descrito na metodologia. Após 7 dias da indução da lesão, foram realizadas as coletas de mandíbulas de animais doentes e animais controles (não lesionados) e a partir destes foram realizadas análises histológicas em coloração de hematoxilina & eosina. Corte representativo selecionado na figura 2A mostra que o contudo pulpar do grupo controle está íntegro, bem como o tecido periodontal que mostram fibras do ligamento periodontal organizados. A figura 2B, mostra que em 7 dias, é possível observar uma discreta necrose do tecido pulpar, perda do ligamento periodontal e substituição por um importante infiltrado inflamatório local no ápice da raiz, quando comparado com animais controles. Como indicado na figura 2B, a presença dessas células infiltrantes ocorre predominantemente na base da lesão. Interessante notar que a maioria desse infiltrado possui núcleo polilobulado, forte indicativo de neutrófilos, setas vermelhas figura 2B. Dado que em geral demonstra que lesão periapical induz inflamação local com presença de neutrófilos.

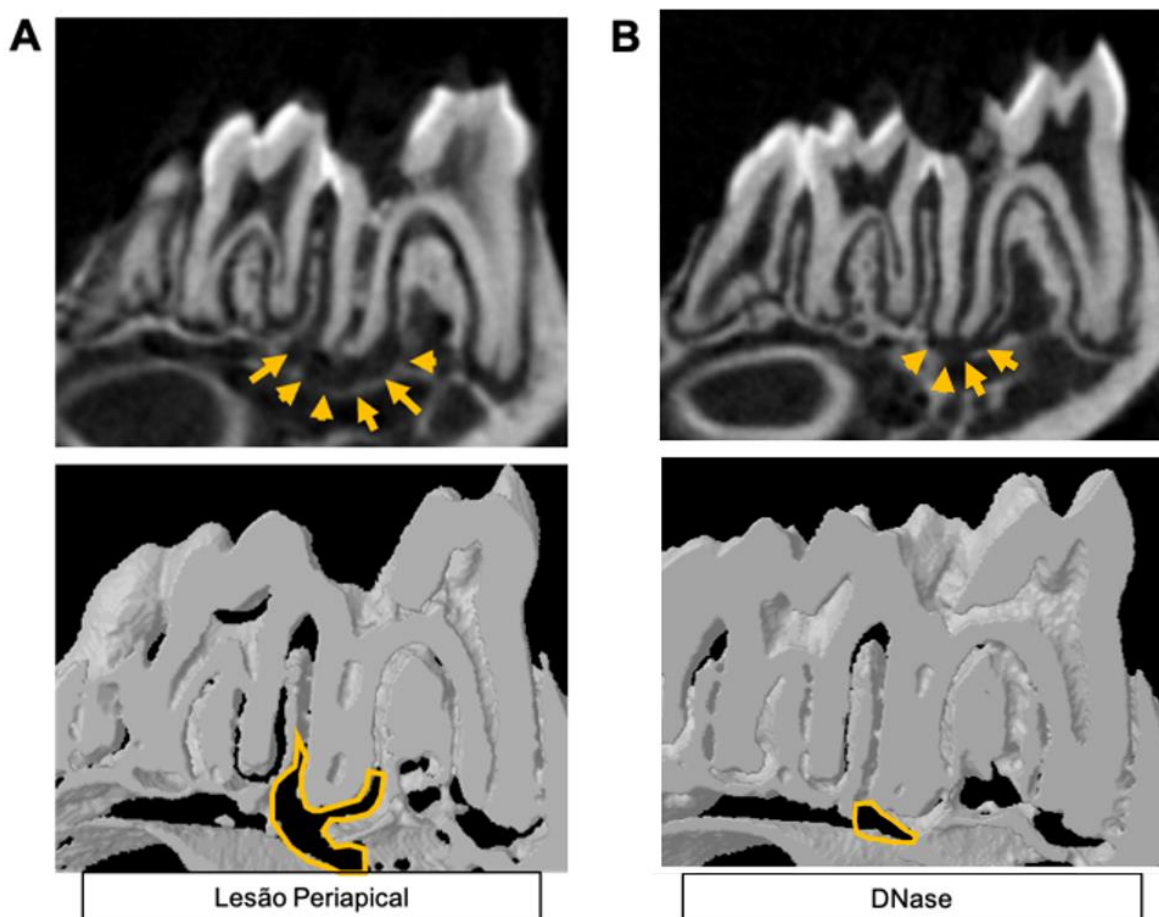


**Figura 2. Lesão induz intenso infiltrado inflamatório.** (A) Imagem representativa de corte histológico corado com HE de mandíbulas de animais controles. (B) Imagem representativa de corte histológico de mandíbulas de animais com lesão periapical. Setas vermelhas indicam importante infiltrado inflamatório com a presença de neutrófilos. Imagens obtidas com aumento de 100x.

## **5.2 Lesão Periapical induz reabsorção óssea local, mas tratamento com DNase inibe a reabsorção óssea**

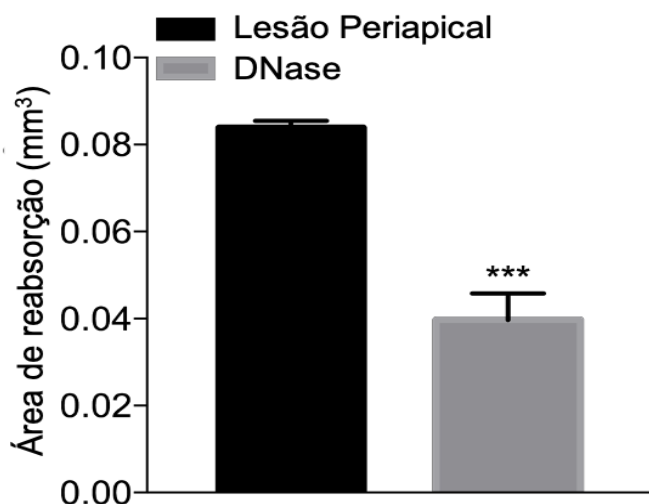
A reabsorção óssea é um processo altamente regulado e em condições fisiológicas, ocorre de maneira que não leva a dano tecidual. Sabe-se que os osteoclastos maduros são os principais responsáveis pelo processo de reabsorção óssea. Interessantemente, para que essas células possam reabsorver o tecido ósseo, é necessário que haja uma sincronia entre solubilização de minerais e a degradação de colágeno (TAKAHASHI et al., 2007). Dados prévios do grupo demonstram que a lesão periapical ocasiona uma intensa reabsorção óssea local, processo resultante de uma intensa inflamação e quebra de homeostase tecidual. A imagem obtida pela tomografia computadorizada e reconstruída em 3D demonstram que após 7 dias da lesão periapical é possível observar um processo de reabsorção óssea, setas indicativas da figura 3A.

Uma vez que a presença de neutrófilos no local atua amplificando e contribuindo para o processo inflamatório e degenerativo, foi sugerido que o tratamento com DNase poderia impactar de forma positiva o processo de reabsorção óssea alveolar. É importante citar que a DNase atua enzimaticamente quebrando as ligações da fita de DNA, mecanismo que está diretamente relacionado com a quebra (inativação das NETs). Para isso, os animais submetidos ao modelo de lesão apical receberam injeções subcutâneas de DNase (10mg/kg) duas vezes ao dia por 4 dias consecutivos. Interessantemente, foi demonstrado através das imagens de micro CT que o processo de reabsorção óssea local e consequente perda de função observado na figura 3A foi revertido no animal que recebeu a DNase. Ou seja, pode-se observar uma redução significativa do processo de reabsorção óssea alveolar quando comparados a animais tratados com DNase, figura 3B.



**Figura 3. Tratamento com DNase inibe a reabsorção óssea induzida pela lesão periapical.** (A) Imagens de micro-CT da lesão periapical demonstrando grande área de reabsorção óssea (setas amarelas). (B) Imagens de micro-CT da lesão periapical de animais tratados com DNase demonstrando importante redução da área de reabsorção óssea (setas amarelas).

Adicionalmente, foi realizada a quantificação da área de reabsorção óssea, comparando sempre os animais lesionados com os animais submetidos ao tratamento com DNase. Confirmando os dados da figura 3, a quantificação reforçou que o tratamento com DNase, o qual diminui a quantidade de NETs, inibe a patogênese da lesão apical, figura 4. Esses dados em conjunto revelam que a lesão periapical induz reabsorção do osso alveolar, e o tratamento com DNase inibe este processo e sustentam a hipótese que NETs podem atuar modulando o processo inflamatório no modelo de doença periapical.

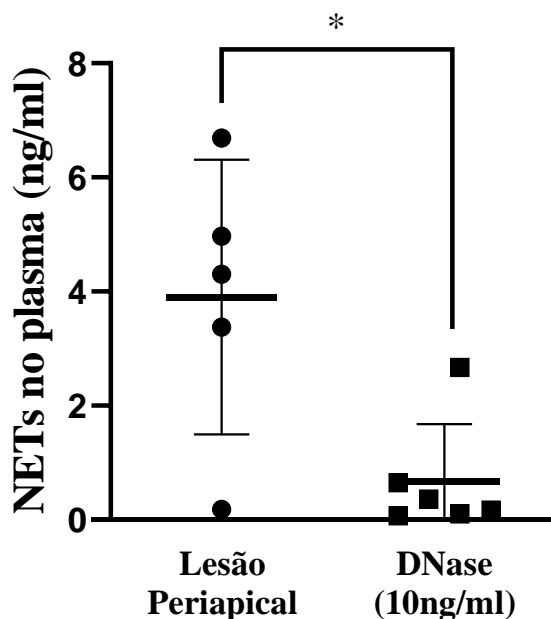


**Figura 4. Tratamento com DNase diminui a área de reabsorção óssea.** Quantificação da área de reabsorção óssea em mm<sup>3</sup>. A análise estatística da comparação entre os grupos controle e tratado foi dada pelo teste T, \*\*\*p<0.001.

### **5.3 Tratamento com DNase reduz quantidade de NETs na lesão periapical em plasma de camundongos**

Ao passo que foi demonstrado que o tratamento com DNase inibe o processo de reabsorção óssea na lesão periapical, o próximo passo foi investigar se as NETs têm participação no modelo de lesão periapical. Para isso, foram feitas coletas de plasma sanguíneo de dois grupos experimentais. O grupo controle consistiu no grupo com lesão periapical e o grupo tratado consistiu no grupo com lesão periapical tratado com DNase. A análise da quantificação de NETs no plasma, demonstrou que no grupo tratado com DNase há uma redução na concentração de NETs sérica, figura 5.





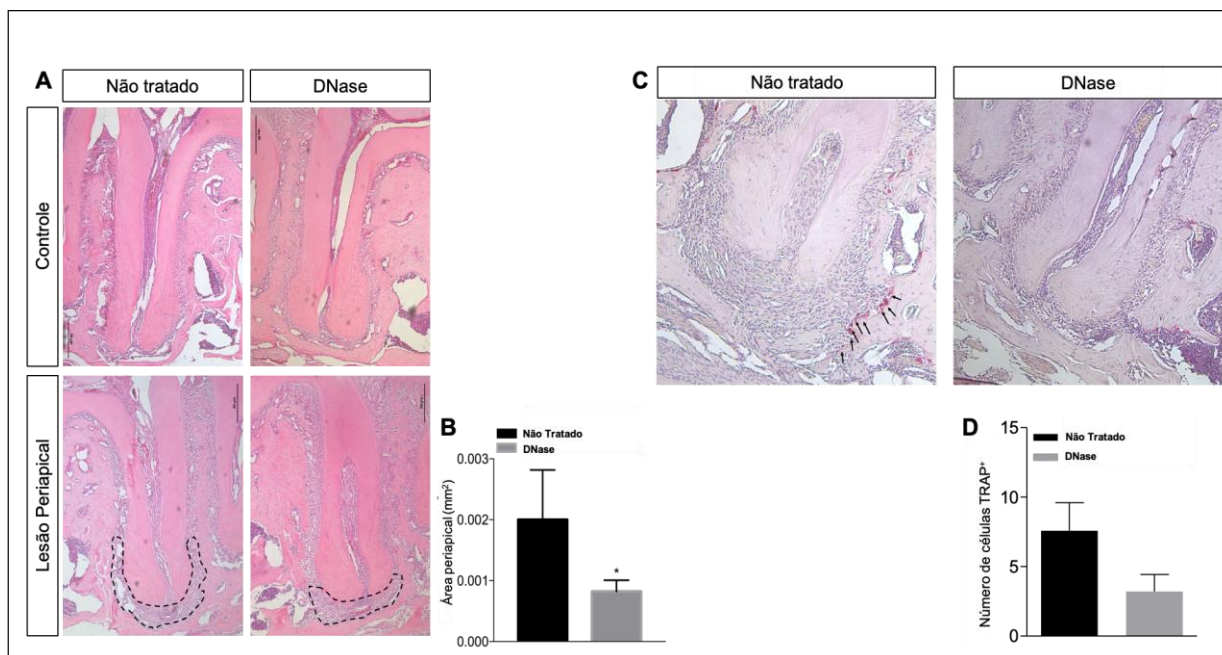
**Figura 5. Diminuição de NETs na lesão periapical em animais tratados com DNase.** Quantificação de NETs em plasma de animais submetidos a lesão periapical. Análise estatística da comparação entre os grupos Controle e tratados com DNase foi dada pelo teste T, \* $p < 0.1$

É importante citar que o aumento da produção de NETs a nível sistêmico em animais com lesão e sem tratamento pode indicar a importante participação dos neutrófilos na doença periapical, e lança luz sobre novas estratégias terapêuticas.

#### 5.4 Tratamento com DNase diminui infiltrado inflamatório e número de células TRAP+ na lesão periapical

Em seguida, foi investigado se o tratamento com DNase poderia impactar no infiltrado inflamatório no local da lesão. Através de análises histológicas, foi constatado que além da inibição da reabsorção óssea, o tratamento com DNase, e consequente degradação das NETs apresentou um importante impacto no infiltrado inflamatório. Como pode ser observado na figura 6A, os animais submetidos ao tratamento com DNase, apresentam uma importante redução no número de células infiltrantes no local da lesão e consequentemente, podemos perceber uma menor área de lesão 6B.

Além disso, o número de células TRAP+, que é um marcador de osteoclastos, diminuiu em animais tratados (Figuras 6C e 6D). Dados que em conjunto demonstram que NETs apresentam uma participação no estabelecimento da lesão periapical estimulando a infiltração de células inflamatórias e na diferenciação de células TRAP+, que são as responsáveis pela reabsorção óssea.

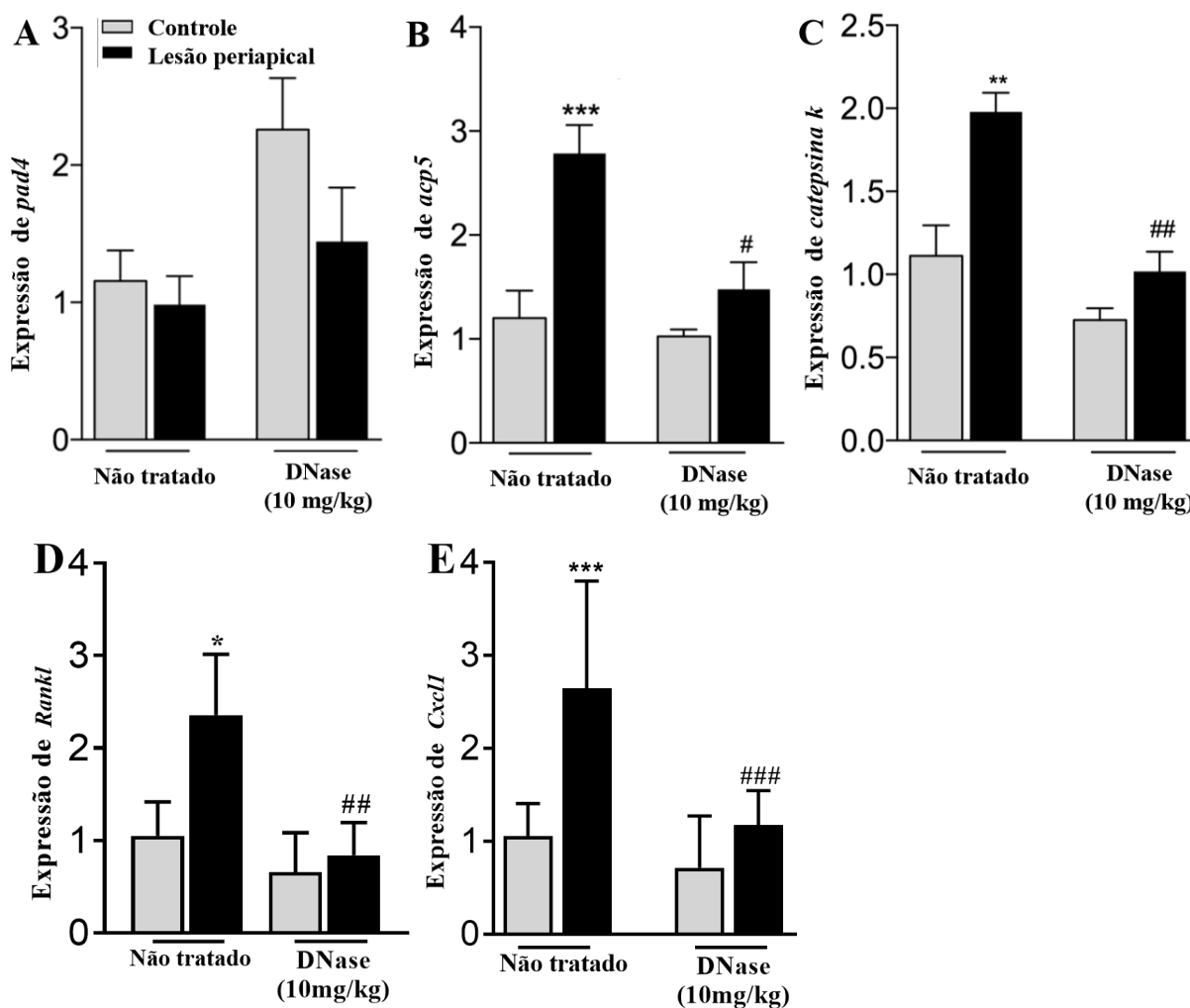


**Figura 6. Diminuição do infiltrado inflamatório e de células TRAP+ na lesão periapical.** (A) Imagem representativa de cortes histológicos da raiz do primeiro molar controle e com lesão apical de animais tratados ou não com DNase corados com HE. Linha pontilhada preta indica o local da lesão. (B) Quantificação da área do infiltrado inflamatório em mm<sup>2</sup> em animais não tratados e tratados com DNase. (C) Imagem representativa de cortes histológicos da raiz do primeiro molar controle e com lesão periapical de animais tratados ou não com DNase corados com TRAP+. Setas pretas indicam células TRAP+. (D) Número de células TRAP+ em animais não tratados e tratados com DNase. Imagens obtidas com aumento de 100x. Dados analisados por Student t test \*p<0.05 (n=5).

### 5.5 Expressão de marcadores de NETs e da diferenciação e ativação de osteoclastos são alterados com o tratamento com DNase

Por fim, para investigar a causa da diminuição de infiltrado inflamatório e de reabsorção óssea observados anteriormente, foi investigada a expressão gênica de alguns marcadores a partir de análise de RT-qPCR. A expressão de *peptidilarginina deiminase 4 (pad4)*, que é essencial para a liberação de NETs, no local da lesão não sofreu alteração significativa pelo tratamento com DNase (Figura 6A), sugerindo que a degradação de NETs se dá após a sua liberação pelos neutrófilos, não interferindo na sua produção, mas na manutenção de sua rede de cromatina, grânulos e enzimas. Já a expressão de *Acid Phosphatase 5, Tartrate Resistant (acp5)* (Figura 6B), um marcador de função de osteoclastos, de *catepsina k (ctsk)* (Figura 6C), o principal marcador de atividade dos osteoclastos e de *Rankl* (Figura 6D), importante marcador de diferenciação de osteoclastos, foi diminuída pelo tratamento com DNase. Também foi observado uma diminuição na expressão de *Cxcl1* (Figura 6E), quimiocina que atrai neutrófilos para o local da lesão. Esses dados indicam que o tratamento e a consequente diminuição de

presença de NETs alteram a formação de osteoclastos, o que leva a uma menor reabsorção óssea.



**Figura 7. Expressão gênica de marcadores de NETs e de osteoclastos em amostras de mandíbulas.** Avaliação da expressão gênica de *Pad4* (A), *Acp5* (B), *Ctsk* (C), *Cxcl1* (D) e *Rankl* (E) no local da lesão periapical de camundongos não tratados e tratados com DNase. Foi usado o método One-way ANOVA, \* $p < 0.1$ , \*\* $p < 0.01$  e \*\*\* $p < 0.001$  comparados com os respectivos controles e # $p < 0.05$ , ## $p < 0.01$  e ### $p < 0.001$  comparados com animais com lesão (n=5).

## **6 DISCUSSÃO**

Como o grupo de glóbulos brancos mais abundante em humanos, os neutrófilos desempenham um papel essencial na imunidade inata causada por uma infecção, seja ela restrita a um local ou em infecções sistêmicas. De fato, a ativação excessiva, assim como um forte recrutamento de neutrófilos pode levar ao desenvolvimento de um amplo espectro de disfunções locais ou sistêmicas. De modo geral, padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) podem ativar receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) localizados em neutrófilos (KOLACZKOWSKA e KUBES, et al 2013). Nessas células, essas moléculas estimularão a migração celular do sangue circulante para os tecidos infectados, iniciando dessa forma toda uma cascata de ativação celular e culminando numa série de processos biológicos. Interessantemente, demonstramos que no modelo de doença periapical, ocorre um importante recrutamento de neutrófilo para o local da lesão, dados que corroboram com achados discutidos por Cavalla et al. (2020). Embora seja evidente que os neutrófilos chegam no local e desempenham um papel clássico de liberação de grânulos e enzimas, nosso trabalho é genuíno ao demonstrar que NETs participam do processo de inflamação e de uma lesão mais intensa. É importante citar que NETs, classicamente, podem mediar o processo de morte de bactérias, vírus e fungos (NARASARAJU et al, 2011, SAITOH et al., 2012, URBAN et al., 2006), no entanto, a sua disfunção pode resultar na incapacidade de combater a infecção, como observado em síndromes sistêmicas como a sepse e quadro graves de COVID-19 (MIDDLETON et al., 2020, CHEN et al, 2021). Além disso, JORCH e KUBES et al (2017) demonstraram que os constituintes das redes extracelulares de neutrófilos presentes no meio extracelular têm potencial antigênico e podem atuar como DAMPs.

No presente trabalho demonstramos que o tratamento sistêmico com DNase pode inibir o desenvolvimento da doença periapical. Como descrito nos resultados, a DNase atua principalmente quebrando DNA, mecanismo que impede de maneira direta a atuação das NETs. Sugestivamente, podemos inferir que a produção de NETs ou exacerbação do seu papel, atua como um fator importante e negativo na patogênese da lesão periapical. Adicionalmente, podemos destacar que a formação excessiva de NETs pode danificar a microcirculação (MIDDLETON et al., 2012), processo que ocasiona uma dificuldade na irrigação sanguínea tecidual e que pode ser um importante fator para a amplificação do processo de injúria, uma vez que ocorre um acúmulo de células imunes no local da lesão.

Ainda no contexto de doença periapical, apesar do avanço na terapêutica farmacológica e intervenções clínicas, ainda há a necessidade pela busca de novas alternativas. Embora

houvesse um grande avanço na técnica que envolve o tratamento endodôntico principalmente pela adesão aos instrumentos rotatórios e técnicas de imagens (Rx e microtomografias) que possibilitam uma boa execução do tratamento, ainda há um número razoável de insucessos causados pela não regressão da lesão periapical ou ainda por casos de recidivas da lesão. Nesse sentido, nosso trabalho destaca-se ao demonstrar um aumento das NETs em amostras de camundongos, possibilitando a descoberta de um novo biomarcador, assim como de um possível novo alvo terapêutico.

Diversos estudos histopatológicos, descrevem que na periodontite apical pode-se destacar duas fases, a fase aguda e a fase crônica. Interessantemente, durante a fase aguda destaca-se o papel dos neutrófilos, já durante a fase crônica, ocorre uma mudança no perfil de células no local, e os macrófagos e linfócitos desempenham um papel importante na cronificação e evolução da doença (SOUZA et al, 2014). No presente trabalho, demonstramos que a lesão periapical, levou a um aumento de NETs circulantes, dados que ajudam a sustentar a hipótese que NETs atuam de maneira importante na amplificação e estabelecimento da lesão. Ainda demonstramos que a expressão de marcadores inflamatórios e da diferenciação e ativação de osteoclastos são alterados com o tratamento com DNase.

Embora seja esperado que durante a doença ocorra uma regulação positiva de diversos genes e moléculas que estão finamente atrelados ao processo inflamatório, nossos dados são pioneiros ao destacar que um tratamento sistêmico ainda no início do desenvolvimento da doença, foi capaz de inibir o forte infiltrado inflamatório local, assim como a expressão de moléculas ligadas a resposta imune inflamatória (SCHNEIDER et al. 2020). Schneider e colaboradores, demonstraram o papel das NETs no modelo clássico de artrite em camundongos, interessantemente o grupo observou que animais doentes possuem aumento de NETs no lavado articular em relação aos animais controles, e que esse aumento está relacionado com um aumento da expressão gênica de Pad4. Além disso, observou-se que em grupos de animais tratados com DNase, houve uma melhora da doença experimental.

Uma consequência importante da doença periapical é o desbalanço na fina regulação da atividade celular de osteoblastos-osteoclastos, de fato todo o tecido ósseo requer uma constante renovação da matriz óssea, mecanismos que são necessariamente regulados pela atividade dessas células citadas acima, além dos osteócitos (SETTEMBRE et al, 2009). É evidente que em doenças osteolíticas ocorra uma significativa redução da massa óssea e um aumento da fragilidade tecidual, mecanismos que estão atrelados ao aumento da atividade dos osteoclastos ou da diminuição da atividade dos osteoblastos ou de ambos os fatores associados (SEGOVIA-

SILVESTRE et al, 2009). No nosso estudo evidenciamos que embora a lesão periapical possa induzir a reabsorção óssea local, o tratamento com DNase sistêmica foi capaz de inibir o grande desenvolvimento da reabsorção óssea. Esses achados reforçam a hipótese que além de investigar as condições predisponentes ao desequilíbrio da atividade dessas células é de extrema importância para o entendimento de mecanismos imunes inatos. Adicionalmente, destacamos que tal tratamento embora tenha efeito ainda na migração de neutrófilos para o local, ele atua inibindo a atuação de NETs pela degradação do material liberado, embora novos experimentos sejam necessários para o entendimento do mecanismo.

Sabemos que o sistema imune tem estreita relação com a modulação óssea pelo fato de terem moléculas regulatórias em comum, de fato a ativação do sistema imune durante a infecção do canal radicular causa destruição óssea alveolar, e os neutrófilos juntamente com as NETs parecem participar ativamente desse processo. Embora mais experimentos sejam necessários, especulamos que as NETs possuam um efeito na destruição óssea de maneira indireta, estimulando macrófagos a secretar citocinas pró-inflamatórias, as quais induzem a expressão de RANKL por outras células. Nossos resultados comprovaram que NETs induzem a expressão de moléculas envolvidas na reabsorção óssea na lesão periapical, resultados que indicam que a perda óssea adjacente à lesão pode ser regulada pela atividade dos neutrófilos.

As lesões periapicais desenvolvem-se como uma resposta do hospedeiro frente às infecções e, as NETs são produtos gerados a partir de uma ativação de neutrófilos, cuja principal ação, entre muitas, relaciona-se à resistência contra os patógenos que originam essas infecções. Nesse estudo, avaliaram-se os aspectos imunológicos e histológicos da lesão periapical induzida em camundongos C57BL/6. Os resultados mostraram que os animais tratados com DNase apresentaram uma redução significativa na lesão, assim como na reabsorção óssea apical quando comparados aos outros grupos estudados, dados que conjuntamente levantam luz sobre o papel de NETs na patogênese dessa doença inflamatória e osteolítica.

## **7 CONCLUSÕES**



**Pode-se observar que:**

**I-** O modelo de indução de lesão periapical leva a um maciço infiltrado de células imunes no local;

**II-** Lesão Periapical induz reabsorção óssea local, mas tratamento com DNase inibe a reabsorção óssea;

**III-** Durante a Lesão Periapical ocorre aumento de NETs no plasma;

**IV-** A inibição de NETs pelo tratamento sistêmico com DNase está relacionado com a redução de infiltrado inflamatório e número de células TRAP<sup>+</sup> na lesão periapical;

**V-** O tratamento com DNase altera a expressão de marcadores inflamatórios e da diferenciação e ativação de osteoclastos na lesão periapical.

**Concluiu-se que:**

NETs são importantes na reabsorção óssea induzida pelo modelo de periodontite apical, e a investigação do seu papel e subsequente mecanismo lança luz sobre novas opções de tratamentos e futuros alvos terapêuticos nesta patologia.

## **8 REFERÊNCIAS**

Abi Abdallah, D. S. et al. **Toxoplasma gondii triggers release of human and mouse neutrophil extracellular traps.** Infect. Immun. 80, 768–777 (2012).

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. **Pathogen recognition and innate immunity.** Cell. 2006 Feb 24;124(4):783-801. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.015. PMID: 16497588.

Aranha AM, Repeke CE, Garlet TP, Vieira AE, Campanelli AP, Trombone AP, Letra A, Silva RM, Garlet GP. **Evidence supporting a protective role for th9 and th22 cytokines in human and experimental periapical lesions.** J Endod. 2013 Jan;39(1):83-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.015. Epub 2012 Nov 10. PMID: 23228262.

Brinkmann, V. et al. **Neutrophil extracellular traps kill bacteria.** Science 303, 1532–1535 (2004)

Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. **Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression.** J Dent Res. 2021 Jan;100(1):29-36. doi: 10.1177/0022034520952341. Epub 2020 Aug 31. PMID: 32866421.

Colić M, Gazivoda D, Vucević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. **Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions.** Mol Immunol. 2009 Nov;47(1):101-13. doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.011. Epub 2009 Feb 15. PMID: 19232436.

Colón DF, Wanderley CW, Franchin M, Silva CM, Hiroki CH, Castanheira FVS, Donate PB, Lopes AH, Volpon LC, Kavaguti SK, Borges VF, Speck-Hernandez CA, Ramalho F, Carlotti AP, Carmona F, Alves-Filho JC, Liew FY, Cunha FQ. **Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis.** Crit Care. 2019 Apr 8;23(1):113. doi: 10.1186/s13054-019-2407-8. PMID: 30961634; PMCID: PMC6454713.

Czaikoski PG, Mota JM, Nascimento DC, Sônego F, Castanheira FV, Melo PH, Scortegagna GT, Silva RL, Barroso-Sousa R, Souto FO, Pazin-Filho A, Figueiredo F, Alves-Filho JC, Cunha FQ. **Neutrophil Extracellular Traps Induce Organ Damage during Experimental and Clinical Sepsis.** PLoS One. 2016 Feb 5;11(2):e0148142. doi: 10.1371/journal.pone.0148142. PMID: 26849138; PMCID: PMC4743982.

Da Silva RA, Ferreira PD, De Rossi A, Nelson-Filho P, Silva LA. **Toll-like receptor 2 knockout mice showed increased periapical lesion size and osteoclast number.** J Endod. 2012 Jun;38(6):803-13. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.017. Epub 2012 Apr 26. PMID:2595116.

De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA. Interferon-gamma, interleukin-10, **Intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions.** J Endod. 2008 Jan;34(1):31-8. doi: 10.1016/j.joen.2007.09.021. PMID: 18155488.

De Souza FFL, Schneider AH, Machado CC, de Almeida SCL, da Silva TA, Cunha FQ, Louzada-Junior P, de Oliveira RDR. **Synovial fluid survivin and NETs as independent biomarkers in rheumatoid arthritis.** Clin Exp Rheumatol. 2022 Nov 24. doi: 10.55563/clinexprheumatol/flzpgb. Epub ahead of print. PMID: 36441653.

Dezerega A, Pozo P, Hernández M et al. (2010). **Chemokine monocyte chemoattractant protein-3 in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis.** Journal of Periodontology 81, 267–76.

Dezerega, A., Osorio, C., Mardones, J., Mundi, V., Dutzan, N., Franco, M., Hernández, M. (2010). **Monocyte chemotactic protein-3: possible involvement in apical periodontitis chemotaxis.** International Endodontic Journal, 43(10), 902–908. doi:10.1111/j.1365-2591.2010.01764.x

Drazic R, Sopta J, Minic AJ. **Mast cells in periapical lesions: potential role in their pathogenesis.** J Oral Pathol Med 2010;39:257–62.

Ferreira LG, Rosin FC, Corrêa L. **Analysis of Interleukin 17A in periapical abscess and granuloma lesions.** Braz Oral Res. 2016;30:S1806-83242016000100235. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2016.vol30.0034. Epub 2016 Mar 28. PMID: 27050938.

Graves, Dana. **Cytokines that promote periodontal tissue destruction.** Journal of periodontology, v. 79, p. 1585-1591, 2008.

Haringman JJ, Smeets TJ, Reinders-Blankert P, Tak PP (2006). **Chemokine and chemokine receptor expression in paired peripheral blood mononuclear cells and synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and reactive arthritis.** Annals of the Rheumatic Diseases 65, 294–300.

Iizasa H, Matsushima K. IL-8. In: Oppenheim JJ, Feldmann M, ed. **Cytokine reference.** San Diego, CA: Academic Press, 2001: 1061–1067

Jayaprakash K, Demirel I, Khalaf H, Bengtsson T. **The role of phagocytosis, oxidative burst**

**and neutrophil extracellular traps in the interaction between neutrophils and the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*.** *Mol Oral Microbiol.* 2015

Jorch SK, Kubes P. **An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease.** *Nat Med.* 2017 Mar 7;23(3):279-287. doi: 10.1038/nm.4294. PMID: 28267716.

Karsenty G, Kronenberg HM, Settembre C. **Genetic control of bone formation.** *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2009;25:629-48. doi: 10.1146/annurev.cellbio.042308.113308. PMID: 19575648.

Kinane DF, Stathopoulou PG, Papapanou PN. **Periodontal diseases.** *Nat Rev Dis Primers.* 2017 Jun 22;3:17038. doi: 10.1038/nrdp.2017.38. PMID: 28805207.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. **Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis.** *Science* 1992; 258: 1798–1801.

Kolaczowska E, Jenne CN, Surewaard BG, Thanabalasuriar A, Lee WY, Sanz MJ, Mowen K, Opendakker G, Kubes P. **Molecular mechanisms of NET formation and degradation revealed by intravital imaging in the liver vasculature.** *Nat Commun,* 2015; 26;6:6673.

Kolaczowska E, Kubes P. **Neutrophil recruitment and function in health and inflammation.** *Nat Rev Immunol.* 2013 Mar;13(3):159-75. doi: 10.1038/nri3399. PMID: 23435331.

Ledesma-Montes C, Garcés-Ortiz M, Rosales-García G, et al. **Importance of mast cells in human periapical inflammatory lesions.** *J Endod* 2004;30:855–9.

Lima, S. C. A., Rizo, V. H. T., Silva-Sousa, Y. T. C., Almeida, L. Y., Almeida, O. P., & León, J. E. (2011). **Immunohistochemical Evaluation of Angiogenesis and Tryptase-positive Mast Cell Infiltration in Periapical Lesions.** *Journal of Endodontics*, 37(12), 1642–1646. doi:10.1016/j.joen.2011.08.024

Lukić A, Vojvodic D, Majstorović I, Colić M. **Production of interleukin-8 in vitro by mononuclear cells isolated from human periapical lesions.** *Oral Microbiol Immunol.* 2006 Oct;21(5):296-300. doi: 10.1111/j.1399-302X.2006.00293.x. PMID: 16922928.

Marc,al JR, Samuel RO, Fernandes D, et al. **T-helper cell type 17/regulatory T-cell immunoregulatory balance in human radicular cysts and periapical granulomas.** J Endod 2010;36:995–9.

Márton IJ, Kiss C. **Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis.** Oral Microbiol Immunol. 2000 Jun;15(3):139-50. doi: 10.1034/j.1399-302x.2000.150301.x. PMID: 11154396.

Marton IJ, Rot A, Schwarzingler E, Szakáll S, Radics T, Vályi-Nagy I, Kiss C. **Differential in situ distribution of interleukin-8, monocyte chemoattractant protein-1 and Rantes in human chronic periapical granuloma.** Oral Microbiol Immunol. 2000 Feb;15(1):63-5. doi: 10.1034/j.1399-302x.2000.150111.x. PMID: 11155167.

Menten P, Wuyts A, Van Damme J (2001) **Monocyte chemotactic protein-3.** European Cytokine Network 12, 554–60.

Middleton EA, He XY, Denorme F, Campbell RA, Ng D, Salvatore SP, Mostyka M, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk AC, Loda M, Cody MJ, Manne BK, Portier I, Harris ES, Petrey AC, Beswick EJ, Caulin AF, Iovino A, Abegglen LM, Weyrich AS, Rondina MT, Egeblad M, Schiffman JD, Yost CC. **Neutrophil extracellular traps contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome.** Blood. 2020 Sep 3;136(10):1169-1179. doi: 10.1182/blood.2020007008. PMID: 32597954.

Nair PNR. **Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response.** Periodontol 2000 1997: 13: 121–148.

Narasaraju T, Yang E, Samy RP, Ng HH, Poh WP, Liew AA, Phoon MC, van Rooijen N, Chow VT. **Excessive neutrophils and neutrophil extracellular traps contribute to acute lung injury of influenza pneumonitis.** Am J Pathol. 2011 Jul;179(1):199-210. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.03.013. Epub 2011 May 7. PMID: 21703402; PMCID: PMC3123873.

Naufel AO, Aguiar MCF, Madeira FM, Abreu LG. **Treg and Th17 cells in inflammatory periapical disease: a systematic review.** Braz Oral Res. 2017 Dec 18;31:e103. doi: 10.1590/1807-3107bor-2017.vol31.0103. PMID: 29267664.

Papayannopoulos V. **Neutrophil extracellular traps in immunity and disease.** Nat Rev Immunol. 2018 Feb;18(2):134-147. doi: 10.1038/nri.2017.105. Epub 2017 Oct 9. PMID:

28990587.

Safavi KE, Rossomando EF. **Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis.** J Endod 1991; 17: 12–14.

Saitoh, T. et al. **Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1.** Cell Host Microbe 12, 109–116 (2012).

Segovia-Silvestre T, Neutzky-Wulff AV, Sorensen MG, Christiansen C, Bollerslev J, Karsdal MA, Henriksen K. **Advances in osteoclast biology resulting from the study of osteopetrotic mutations.** Hum Genet. 2009 Jan;124(6):561-77. doi: 10.1007/s00439-008-0583-8. Epub 2008 Nov 6. PMID: 18987890.

Silva TA, Garlet GP, Fukada SY, Silva JS, Cunha FQ. **Chemokines in oral inflammatory diseases: apical periodontitis and periodontal disease.** J Dent Res. 2007 Apr;86(4):306-19. doi: 10.1177/154405910708600403. PMID: 17384024.

Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. **Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development.** Arch Oral Biol. 2014 Sep;59(9):944-53. doi: 10.1016/j.archoralbio.2014.05.021. Epub 2014 May 29. PMID: 24927330.

Taira TM, Lima V, Prado DS, Silva TA, Issa JPM, da Silva LAB, Zamboni DS, Cunha FQ, Fukada SY. **NLRP12 Attenuates Inflammatory Bone Loss in Experimental Apical Periodontitis.** J Dent Res. 2019 Apr;98(4):476-484. doi: 10.1177/0022034518820289. Epub 2019 Jan 25. PMID: 30681895.

Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E. **Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways.** J Bone Miner Metab. 2021 Jan;39(1):19-26. doi: 10.1007/s00774-020-01162-6. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33079279.

Urban, C. F., Reichard, U., Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. **Neutrophil extracellular traps capture and kill Candida albicans yeast and hyphal forms.** Cell. Microbiol. 8, 668–676 (2006).

## **9 ANEXOS**





**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que o adendo da proposta intitulada "Papel das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NET) no desenvolvimento da periodontite apical experimental", registrada sob nº 22.1.545.60.4, sob a responsabilidade de Ayda Henriques Schneider e Sandra Yasuyo Fukada Alves, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada *ad referendum* em 24/11/2022 pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP).

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Colaboradoras: Laisa Yasmin de Souza e João Luiz Guilherme Neto,.

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	01/11/2022 a 30/09/2024
Espécie/Linhagem/Raça	Cam. Isogênico C57BL/6
Nº de animais	72
Peso/Idade	18-20g/ 6-8 sem
Sexo	Macho
Origem	Biotério da PUSP RP

Ribeirão Preto, 26 de outubro de 2022.

**Danielle Palma de Oliveira**  
**Coordenadora da CEUA-FCFRP**

Avenida do Café S/N - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP  
 Comissão de Ética no Uso de Animais - ceua@fcrfp.usp.br  
 Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892

Documento assinado digitalmente - Por favor verifique o HASH de autenticidade na página 2 desse documento.



### USPAssina - Autenticação digital de documentos da USP

#### Registro de assinatura(s) eletrônica(s)

Este documento foi assinado de forma eletrônica pelos seguintes participantes e sua autenticidade pode ser verificada através do código IQI3-B5Z8-4IG2-3VCA no seguinte link: <https://portalservicos.usp.br/iddigital/IQI3-B5Z8-4IG2-3VCA>

**Danielle Palma de Oliveira**

Nº USP: 3206811

Data: 24/11/2022 13:24

Perfil assinante:: Coordenadora da CEUA FCFRP