



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



CLARA MARINA PEREIRA CAVALCANTI SILVA

**PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE REDOX E DAS ARMADILHAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS NA GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DA
LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM CAMUNDONGOS**



Ribeirão Preto

2023

CLARA MARINA PEREIRA CAVALCANTI SILVA

**PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE REDOX E DAS ARMADILHAS
EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS NA GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DA
LESÃO PERIAPICAL INDUZIDA EXPERIMENTALMENTE EM CAMUNDONGOS**

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

Programa: Odontopediatria

Área de Concentração: Odontopediatria

Orientadora: **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**

Versão Corrigida

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZAÇÃO PARA REPRODUÇÃO

Autorizo a reprodução e/ou divulgação total ou parcial da presente obra, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Clara Marina Pereira Cavalcanti

Participação da atividade redox e armadilhas extracelulares de neutrófilos na gênese e desenvolvimento da lesão periapical induzida experimentalmente em camundongos. / Clara Marina Pereira Cavalcanti Silva; Orientadora Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Ribeirão Preto, 2023.

147p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Odontologia de Ribeirão - Preto/USP – Área de Concentração: Odontopediatria.

A versão original se encontra disponível na Unidade que aloja o Programa.

Versão Corrigida

1. Lesão periapical; 2. Stress oxidativo; 3. Armadilhas extracelulares de neutrófilos; 4. Espécies reativas de oxigênio

Silva CMPC. **Participação da atividade redox e armadilhas extracelulares de neutrófilos na gênese e desenvolvimento da lesão periapical induzida experimentalmente em camundongos.**

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

Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da defesa: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____ Julgamento _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Julgamento _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____ Julgamento _____

Assinatura _____

Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva – Orientadora e Presidente da Banca

Examinadora Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

CLARA MARINA PEREIRA CAVALCANTI SILVA

- Nascimento** 04 de julho de 1992 – Maceió/AL
- Filiação** José Pereira da Silva
Estela Márcia Pereira Cavalcanti Silva
- 2013-2018** Graduação em Odontologia
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas- FOUFAL
- 2016-2017** Extensão Universitária
Projeto de Extensão Endodontia de Molares
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas-FOUFAL
- 2016-2017** Extensão Universitária
Projeto Sorriso Mágico: Odontologia Ambulatorial e Hospitalar para Crianças com Câncer
Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Alagoas-FOUFAL
- 2019-2022** Especialização em Odontopediatria
FUNORP - Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto –USP
- 2020-2023** Pós-Graduação (Mestrado) em Odontologia
Área de concentração: Odontopediatria
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – FORP/USP

A **Deus**, meu pai e amigo em todos os momentos, obrigada por Sua presença constante na minha vida, por Seu amor e misericórdia que me fazem ir além do que mereço e sonhei. Sou muito grata a Ti meu pai. À **Nossa Senhora** por sempre estar ao meu lado e a intercessão **de Santa Clara, São Francisco, Santo Antônio e Santa Terezinha**. A fé traz a certeza de que Deus cuida de tudo e para cada etapa existe um propósito, isso me ajudou a focar no que precisava fazer e a viver essa jornada com muita gratidão e amor.

Ao meu voinho e voinha, **Rafael de Matos Silva e Deyse Marina Cavalcanti Silva**, por todo amor, apoio e por serem minha fonte de inspiração. Sou muito grata por ter vocês e aprender com os seres incríveis que vocês são. Vocês têm grande parte na construção da minha vida, dos meus valores e sempre foram também uma grande referência acadêmica, como profissionais e professores exemplares. Obrigada por toda ajuda e por estarem sempre presentes. Como eu amo vocês! Meu voinho sempre caminhou comigo em tudo e no mestrado não foi diferente, tendo participação emocional, incentivadora e ativa na troca de conhecimento! Ele sempre acreditou em mim e sonhamos juntos com esse dia. Não foi como queríamos ou programamos, mas sei que você está presente vô, assistindo do céu!

Aos meus pais **Estela Márcia Pereira Cavalcanti Silva e José Pereira da Silva**, que sempre fizeram de tudo por mim e minhas irmãs, não medindo esforços para alcançarmos nossos sonhos. Mesmo com o coração apertado por causa da distância física vocês me incentivaram a correr atrás dos meus sonhos, do melhor para mim e apoiaram minhas escolhas. Foi difícil conviver com a saudade, mas o amor, o cuidado e a partilha foram muito importantes para mim. Tenho muito orgulho de ser filha de vocês. Obrigada por tudo. Amo imensamente vocês!

Às minhas irmãs **Lyara Márcia Pereira Cavalcanti e Lara Maria Pereira Cavalcanti Silva**, que são uma parte de mim. Ter vocês na minha vida partilhando tudo é um presente. Obrigada pelo companheirismo e cumplicidade, por nossos momentos simples, mas muito especiais, por acreditarem e torcerem sempre por mim como se fosse por vocês. É por e para vocês. Amo vocês demais.

Ao meu amor e esposo **Arthur de Almeida Nobre Pires**, não consigo colocar em palavras como seu amor, sua presença, companheirismo e apoio são fundamentais na minha

vida. Ter sua leveza, seu colo que traz paz e seu ombro amigo sempre a minha espera, à disposição, fazem as dificuldades e medos se tornarem pequenos. Sua admiração e incentivo me ajudam a querer e buscar ser melhor. Você é uma pessoa incrível, que me ensina e me inspira! Admiro muito você! Sou muito grata a Deus por nós. Obrigada por tudo meu amor. Eu te amo demais!

Ao meu avô **Juvenal Pereira da Silva**, que apesar da distância física sempre estive torcendo por mim. Obrigada vô por suas orações, por sua torcida e amor. Sinto tudo isso em minha volta. Te amo!

Aos meus sogros **Eliana de Oliveira de Almeida Pires** e **Manoel Nobre Pires**, que sempre estiveram me ajudando e apoiando em tudo. Obrigada por acreditarem em mim e por me incentivarem em tudo. Amo muito vocês!

À toda **minha família e amigos**, meus tios, tias, primos, primas e grande amigos que torceram tanto por mim. Muito obrigada! Mesmo estando longe sinto o amor e a torcida. Amo vocês!

Aos **meus amigos de Ribeirão Preto**, que me acolheram com muito carinho, que foram muitas vezes aconchego e conforto para mim. Carrego vocês no meu coração. Obrigada!

Poder muitas vezes me enxergar com os olhos de pessoas tão especiais na minha vida me ajudou a acreditar mais em mim. Essa conquista sem dúvidas faz parte de cada um de vocês! Obrigada!

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À Prof.^a Dra. **Léa Assed Bezerra da Silva**, minha orientadora. Muito obrigada pelo acolhimento, por cada oportunidade, por poder realizar esse trabalho ao seu lado, por compartilhar seu conhecimento, sabedoria e experiência, por todo apoio e suporte. É um privilégio estar com esse exemplo de profissional que você é, que tanto inspira.

À querida Prof.^a Dra. **Raquel Assed Bezerra Segato**, agradeço demais por seu carinho, por ter me acolhido tão bem, pela oportunidade de conviver e aprender tanto ao seu lado, por sua confiança nos trabalhos. Minha gratidão por desfrutar da pessoa maravilhosa que você é, por todo apoio e incentivo. Admiro muito você!

Tem alguns momentos que não fazemos ideia que ajudamos ou fizemos algo por alguém e não queria deixar de agradecer por esses momentos também. Momentos que foram simples, mas que fizeram diferença para mim, seja por uma palavra de sabedoria, de alegria, de otimismo. Vocês são exemplos de profissionais, fonte de um conhecimento admirável e sempre foram acessíveis para compartilhar, seja em reuniões ou encontros importantes, como também nos encontros ao acaso em suas salas, nos corredores, na clínica. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

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

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

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela Bolsa de Mestrado.

Aos docentes do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP **Profa. Dra. Aldevina Campos de Freitas, Profa. Dra. Alexandra Mussolino de Queiroz, Profa. Dra. Andiará De Rossi Daldegan, Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano, Prof. Dr. Fabrício Kitazono de Carvalho, Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva, Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira, Profa. Dra. Kranya Victoria Díaz Serrano, Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva, Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuaní, Profa. Dra. Maria Cristina Borsatto, Profa. Dra. Maria da Conceição Pereira Saraiva, Profa. Dra. Mirian Aiko Nakane Matsumoto, Pro. Dr. Murilo Fernando Neuppmann Feres, Prof. Dr. Paulo Nelson Filho, Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, por toda dedicação em nos ensinar, por todo conhecimento e experiência que aprendi com vocês! Muito obrigada!

Aos meus professores da Universidade Federal de Alagoas, por toda dedicação, em especial aos professores **Amaro Carlos Júnior, Patrícia Batista Nascimento, Daniela Maria Carvalho Pugliesi e Daniel Pinto de Oliveira** pelo incentivo e apoio na carreira acadêmica.

À **Dra. Carolina Paes Torres Mantovani**, por sua atenção e carinho! Você é muito especial. Obrigada por dividir experiências e conhecimento!

À **Dra. Marília Pacífico Lucisano**, por ser tão prestativa e carinhosa. Muito obrigada por toda ajuda neste trabalho, por sua parceria e atenção!

Ao **Marco Antônio dos Santos**, especialista de laboratório do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, obrigada pela convivência leve e carinhosa, por toda ajuda neste trabalho. Muita gratidão a você!

À **Nilza Letícia Magalhães**, técnica de laboratório do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, que desde o início foi tão disponível e acolhedora. Muito obrigada por toda ajuda e participação neste trabalho. Sua alegria e energia transformavam qualquer dificuldade! Obrigada por tudo!

À **Mary Possani Carmessano**, secretária do Departamento de Clínica Infantil da FORP/USP, pela sua dedicação em nos ajudar! Muito obrigada pelo carinho e atenção em cada etapa! A sua disponibilidade e gentileza fazem a diferença! Obrigada Mary!

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

À **Vivian Vicentin Massoni**, minha grande parceira nesta pesquisa. Difícil descrever meu agradecimento aqui, dividir essa jornada com você foi muito especial! Sou muito grata por toda ajuda, por tantas experiências compartilhadas. Muito obrigada, Vivi!

Aos amigos e suportes que encontrei no mestrado, **Lisa, Carol, Lana, Alana, Ricardo**. Muito obrigada por toda ajuda e pela amizade! Muito grata por aprender e crescer com vocês. Vocês são muito especiais!

A meus amigos **Beatriz, Paulla, Lucas e Bianca**, pelo apoio e amor. Ter vocês ao meu lado, torcendo e compartilhando todos os momentos é um presente!

A todos aqueles que participaram direta ou indiretamente para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

Silva, CMPC. **Participação da atividade redox e armadilhas extracelulares de neutrófilos na gênese e desenvolvimento da lesão periapical induzidas experimentalmente em camundongos.** Ribeirão Preto, 2023. 147p. [Dissertação de Mestrado]. Ribeirão Preto: Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Diante do importante papel das espécies reativas de oxigênio (ROS) e das armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) em diferentes patologias sistêmicas e seu potencial na modulação da resposta imunológica, faz-se necessária melhor compreensão dos seus efeitos nos tecidos assim como sua utilização como alvos para futuras estratégias terapêuticas. Assim, para abordar o tema proposto, foram desenvolvidos estudos divididos em 2 objetivos gerais: avaliar a participação da atividade redox durante o desenvolvimento da lesão periapical; e a relação entre espécies reativas de oxigênio e armadilhas extracelulares de neutrófilos na gênese e desenvolvimento da lesão periapical. Para o **primeiro estudo**, foram utilizados 42 camundongos *wild-type* (7 animais/por grupo). No grupo controle, os animais estavam com dentes hígidos e nos demais grupos tiveram lesões periapicais induzidas nos primeiros molares inferiores. Após os períodos de 2, 5, 7, 21 e 42 dias, os animais foram eutanasiados e as hemi-mandíbulas direitas foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina e as lâminas obtidas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE) para descrição das características do conteúdo do canal radicular e das regiões apical e periapical (microscopia convencional) e histomorfometria da área das lesões periapicais (microscopia modo fluorescente). Além disso, foram realizadas reações de imuno-histoquímica para avaliação da presença/ausência e localização das enzimas oxidantes mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e das enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT). Já as hemi-mandíbulas esquerdas foram submetidas ao processamento para a técnica de qRT-PCR e avaliação da expressão de RNAm das mesmas enzimas citadas anteriormente. Para os dados da morfometria realizou-se o teste Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Para os dados da imuno-histoquímica, realizou-se o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e de Mann-Whitney. Ambas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software GraphPad Prism 9. Já para os dados de expressão gênica, realizou-se o teste ANOVA com pós-teste com contraste ortogonal por meio do software SAS/STAT®. Ainda, foi realizado o teste de correlação de Spearman para avaliar o grau de correlação entre a expressão de genes e o tamanho da lesão periapical. O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%. Os resultados permitiram concluir que no decorrer dos períodos, a lesão periapical progrediu. Houve aumento da expressão gênica das enzimas MPO, CAT, SOD e GR no dia 5, em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). A expressão gênica da iNOS aumentou nos dias 21 e 42 dias em relação ao controle ($p < 0,05$). Também foi possível observar correlação moderada entre MPO e CAT (0,7), entre iNOS e a lesão periapical (0,6) e correlação forte entre MPO e GR (0,8). Além disso, a imunomarcagem de todas as enzimas se apresentou mais intensa nos períodos crônicos, porém apenas a MPO teve diferença entre esses grupos e o controle

($p < 0,05$) e a iNOS, maior aos 5 dias, em comparação ao de 2 e 7 dias ($p < 0,05$) e aos 42 dias, em relação ao de 7 dias ($p = 0,03$). Assim, observou-se nos períodos iniciais do desenvolvimento da lesão periapical o aumento da atividade redox. Nas lesões crônicas, teve exposição prolongada de ROS, observadas pela imunomarcagem. O aumento da expressão de iNOS teve correlação com o tamanho das lesões periapicais e sua marcação aos 42 dias, parece estar associada à destruição óssea e cementária, sugerindo o importante papel da atividade redox como mecanismo de defesa e na patogênese das lesões periapicais. Para o **segundo objetivo proposto**, de avaliação da relação das NETs e ROS no desenvolvimento de lesões periapicais, foram utilizados 42 camundongos *wild-type* (7 animais/grupo), sendo o controle o grupo de animais com entes hígidos e os demais grupos com lesões periapicais induzidas nos primeiros molares inferiores. Após os períodos de 2, 5, 7, 21 e 42 dias, as amostras foram avaliadas para descrição do canal radicular e das regiões apical e periapical, histomorfometria da área das lesões periapicais e contagem do número de neutrófilos. Além disso, foram realizadas reações de imunohistoquímica para avaliação da co-localização dos marcadores de NETs, elastase de neutrófilo (NE) e histona 3 citrulinada (H3Cit) e MPO e H3Cit. Adicionalmente, também foi avaliada a expressão gênica de NE e H3Cit por qRT-PCR. Foi observado maior número de neutrófilos nos períodos de 21 e 42 dias, com diferença com os demais grupos ($p < 0,05$). A formação de NETs também foi maior nesses períodos (21 e 42 dias), evidenciada pela co-localização tanto de NE e H3Cit como de MPO e H3Cit. Após a obtenção dos resultados de ambos os estudos pode-se concluir que, durante o desenvolvimento da lesão periapical, pode-se evidenciar o stress oxidativo, maior atividade de neutrófilos e formação de NETs, especialmente nos períodos mais tardios de avaliação que correspondem à cronificação, o que pode indicar a relação entre a formação de ROS e a liberação de NETs com a destruição tecidual periapical.

Palavras-chave: stress oxidativo, lesão periapical, armadilhas extracelulares de neutrófilos, espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Silva, CMPC. **Participation of redox activity and neutrophil extracellular traps in the genesis and development of experimentally induced periapical lesions in mice.** Ribeirão Preto, 2023. 147p. [Master dissertation]. Ribeirão Preto: Ribeirão Preto School of Dentistry, University of São Paulo.

Given the vital role of reactive oxygen species (ROS) and neutrophil extracellular traps (NETs) in different systemic pathologies and their potential to modulate the immune response, it is necessary to understand their effects on tissues better, as well as their use as targets for future therapeutic strategies. Thus, to address the proposed theme, it was developed studies divided into 2 general objectives were developed: to evaluate the participation of redox activity during the formation and development of the periapical lesion; and the relationship between reactive oxygen species and neutrophil extracellular traps in the genesis and development of the periapical lesion. For the first study, 42 wild-type mice (7 animals/group) were used, the control group had sound teeth and the others had periapical lesions induced in the mandibular first molars. After periods of 0, 2, 5, 7, 21, and 42 days, the animals were euthanized. The right hemi-mandibles were submitted to routine histotechnical processing, and the obtained slides were stained with hematoxylin and eosin (HE) for the description of the root canal contents description and apical and periapical regions (conventional microscopy) and histomorphometry of the area of periapical lesions (fluorescent mode microscopy). In addition, immunohistochemical reactions were performed to assess the presence/absence and location of the oxidizing enzymes myeloperoxidase (MPO) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), and the antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), glutathione reductase (GR) and catalase (CAT). The left hemi-mandibles were submitted to processing for the qRT-PCR technique and evaluation of mRNA expression of the same enzymes mentioned above. The Kruskal-Wallis test was performed for the morphometry data, followed by the Dunn post-test. The Kruskal-Wallis test and the Dunn and Mann-Whitney post-test were performed for immunohistochemical data. Both statistical analyses were performed using the GraphPad Prism 9 software. The ANOVA test was performed with a post-test with orthogonal contrast using the SAS/STAT® software for the gene expression data. Furthermore, Spearman's correlation test was performed to assess the degree of correlation between gene expression and the size of the periapical lesion. The significance level adopted for all analyzes was 5%. The results allowed us to conclude that, over time, the periapical lesion progressed. There was an increase in the gene expression of MPO, CAT, SOD, and GR enzymes on day 5 compared to the control group ($p < 0.05$). iNOS gene expression increased on days 21 and 42 compared to the control ($p < 0.05$). It was also possible to observe a moderate correlation between MPO and CAT (0.7), between iNOS and the periapical lesion (0.6), and a strong correlation between MPO and GR (0.8). In addition, the immunostaining of all enzymes was more intense in the chronic periods. However, only MPO had a difference between these groups and the control ($p < 0.05$), and iNOS was higher at 5 days compared to 2 and 7 days ($p < 0.05$) and at 42 days, compared to 7 days ($p = 0.03$). Thus, redox activity was increased in the initial periods of development of the periapical lesion. In chronic lesions, there was prolonged exposure of ROS, observed by immunostaining. The increase

in iNOS expression correlated with the size of the periapical lesions, and its marking at 42 days seems to be associated with bone and cemental destruction, suggesting the important role of redox activity as a defense mechanism and in the pathogenesis of periapical lesions. For the second proposed objective, evaluating the relationship between NETs and ROS in the development of periapical lesions, 42 wild-type mice (7 animals/experimental period) were used, with periapical lesions induced in the lower first molars. After 0, 2, 5, 7, 21, and 42 days, the samples were evaluated for the description of the root canal and the apical and periapical regions, histomorphometry of the area of periapical lesions, and count of the number of neutrophils. In addition, immunohistochemical reactions were performed to assess the colocalization of NET markers, neutrophil elastase (NE), and citrullinated histone 3 (H3Cit) and MPO and H3Cit. Additionally, NE and H3Cit gene expression was also evaluated by qRT-PCR. More neutrophils were observed in the 21 and 42 days, with a difference with the other groups ($p < 0.05$). The formation of NETs was also increased in these periods (21 and 42 days), evidenced by the colocalization of both NE and H3Cit and MPO and H3Cit. After obtaining the results of both studies, it can be concluded that, during the development of the periapical lesion, oxidative stress, more significant activity of neutrophils, and formation of NETs can be evidenced, especially in the later periods of evaluation that correspond to chronic period, which may indicate the relationship between the formation of ROS and the release of NETs and its role in periapical tissue destruction.

Keywords: oxidative stress, periapical lesion, extracellular neutrophil traps, reactive oxygen species.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Lesão periapical.....	19
1.2 Neutrófilos e Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos.....	21
1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	27
1.4 Relação entre as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e as Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).....	33

CAPÍTULO 1 - PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE REDOX DURANTE A FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL.....

INTRODUÇÃO	37
PROPOSIÇÃO	38
Objetivo Geral.....	38
Objetivos Específicos.....	39
MATERIAL E MÉTODOS	39
Obtenção das amostras.....	40
Procedimentos Operatórios.....	40
Indução das Lesões Periapicais.....	41
Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica.....	43
Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical.....	45
Morfometria em Microscopia de Fluorescência.....	46
Imuno-histoquímica.....	46
Expressão Gênica - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).....	47
Extração de RNA total.....	47
<i>Síntese de cDNA</i>	48
Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).....	48
Análise Estatística.....	49
RESULTADOS	49
Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical.....	49
Morfometria em Microscopia de Fluorescência.....	54
Imuno-histoquímica.....	56
Mieloperoxidase (MPO).....	57
Óxido Nítrico Sintase e (iNOS).....	57
Catalase (CAT).....	59

Superóxido Dismutase (SOD)	59
Glutationa Redutase (GR)	60
Expressão Gênica - qRT-PCR.....	62
Marcadores Oxidantes	62
.....	64
Marcadores Antioxidantes	64
DISCUSSÃO	69
CONCLUSÃO	78

CAPÍTULO 2 - RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE REDOX E ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS NA GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL79

INTRODUÇÃO.....	80
PROPOSIÇÃO	82
Objetivo Geral	82
Objetivos Específicos	83
MATERIAL E MÉTODOS.....	83
Obtenção das amostras	84
Procedimentos Operatórios	84
Indução das lesões periapicais	84
Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica	85
Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical	88
Contagem de neutrófilos.....	88
Mensuração das Lesões Periapicais.....	89
Imuno-histoquímica.....	89
Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)	91
Extração de RNA total	91
Síntese de cDNA	92
Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)	92
Análise Estatística	93
RESULTADOS	93
Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical.....	93
Contagem de neutrófilos.....	95
Mensuração das Lesões Periapicais.....	96
Imuno-histoquímica.....	97
Imunomarcagem de NETs (MPO+H3Cit)	97

Imunomarcação de NETs (NE+H3Cit).....	99
Imunomarcação das enzimas oxidantes (MPO e iNOS)	100
Imunomarcação das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GR)	102
Expressão gênica - qRT-PCR	106
Marcadores de NETs (NE e H3Cit)	106
Marcadores Oxidantes Mieloperoxidase (MPO) e Óxido Nítrico Sintase (iNOS).....	108
Marcadores Antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Glutathiona Redutase (GR) e Catalase (CAT)	110
DISCUSSÃO	114
CONCLUSÃO	119
REFERÊNCIAS	120
ANEXO.....	146

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Lesão periapical

A formação e o desenvolvimento das lesões periapicais são decorrentes tanto da presença de micro-organismos, seus produtos e subprodutos no tecido pulpar, quanto do efeito da resposta de defesa do hospedeiro na tentativa de combater a infecção (Stashenko et al., 1990; 1998; Čolić et al., 2009; Galler et al., 2021). Os micro-organismos, que podem ganhar acesso à polpa dentária a partir de lesões de cárie, traumatismos ou restaurações insatisfatórias (Sasaki et al., 2004; Park et al., 2015), estimulam reações inflamatórias por meio do sistema imunológico (Neelakantan et al., 2017; Karamifar et al., 2020; Galler et al., 2021; Silva, 2022). A permanência e disseminação da infecção para o sistema de canais radiculares, provocam reações imuno-inflamatórias persistentes e complexas, levando à necrose pulpar e destruição óssea nos tecidos periapicais (Čolić et al., 2009; Karamifar et al., 2020; Cavalla et al., 2021; Galler et al., 2021; Goldman et al., 2021). Além disso, na necrose pulpar e lesão periapical há o predomínio de bactérias anaeróbias estritas (Rocha et al., 1998) e Gram-negativas, as quais possuem na sua parede celular lipopolissacarídeos (LPS), liberados após sua morte e multiplicação celular (Stashenko e Wang, 1992; Silva et al., 2002; Bezerra da Silva, 2018). O LPS induz uma resposta autodestrutiva, iniciando e exacerbando a resposta inflamatória e a reabsorção óssea (Safavi e Nichols, 1993; Bezerra da Silva, 2018; Paula-Silva et al., 2020).

A presença de componentes e produtos metabólicos microbianos no tecido pulpar estimula a primeira linha de defesa do organismo, a partir de células do sistema imune inato, como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas e epiteliais, que vai atuar detectando os micro-organismos invasores e promover uma cascata de eventos visando controlar e eliminar a infecção (Schroder e Tschop, 2010; Sun et al., 2020). Nesse contexto, Receptores de Reconhecimento de Padrões (PRRs), expressos por esses tipos celulares, identificam estruturas específicas comuns microbianas, denominadas de Padrões Moleculares Associados aos Patógenos (PAMPs) e componentes celulares alterados ou danificados, denominados Padrões Moleculares Associados a Danos (DAMPs) (Schroder e Tschop, 2010; Aberrazak et al., 2015; Fullard e O'Reilly, 2015; Galler et al., 2021; Li e Wu, 2021).

Dentre os PRRs mais conhecidos na ligação a patógenos e iniciação da resposta inflamatória, se destacam os diversos receptores do tipo toll-like (TLRs). O TLR-4 que é expresso na superfície celular reconhece padrões microbianos como o LPS, presente nas lesões periapicais (Iwasaki e Medzhitov, 2004; Galler et al., 2021; Li e Wu, 2021).

A partir do reconhecimento da infecção, os PRRs atuam como transdutores de sinais, ativando a resposta de defesa do hospedeiro por meio do sistema imune inato e adaptativo. Essa ativação consiste na produção de moléculas de sinalização extracelular, que medeiam o recrutamento de mais células imunes para o local da infecção (Schroder e Tschop, 2010; Alberts et al., 2014; Sun et al., 2020). Essas moléculas sinalizadoras podem ser prostaglandinas, quimiocinas, citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e várias interleucinas (IL) como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12 e IL-17. A resposta inflamatória depende também de alterações dos vasos sanguíneos, que se dilatam e se tornam permeáveis aos fluídos e às proteínas, as quais se acumulam e auxiliam na defesa (Alberts et al., 2014; Abdulkhaleq et al., 2018; Ou et al., 2021). Paralelamente a isso, as células endoteliais dos vasos sanguíneos são estimuladas pelos mediadores pró-inflamatórios advindos das células do hospedeiro ou dos patógenos associados a expressar proteínas de adesão, que promovem ligação e posterior escape de leucócitos para o meio extravascular, por meio da diapedese. Essas células se acumulam no foco da infecção e são ativadas para eliminar o agente agressor e também secretar mais mediadores inflamatórios (Delves e Roitt, 2000; Alberts et al., 2014; Abdulkhaleq et al., 2018), orquestrando a intensidade e a duração da reação imuno-inflamatória (Roescher et al., 2009; Xiong et al., 2019; Zivanovic et al., 2021). Essas respostas não discriminam alvos, gerando danos também ao hospedeiro. Por isso, as respostas inflamatórias intensas prolongadas ou ineficientes, com a persistência da infecção bacteriana, torna o processo inflamatório crônico, contribuindo para dano e morte tecidual (Mittal, et al., 2014; Arulselvan et al., 2016; Panigrahy et al., 2021).

A resposta do hospedeiro não alcança os micro-organismos disseminados pelo sistema de canais radiculares, resultando em uma inflamação crônica. Logo, a necrose pulpar e destruição dos tecidos periapicais observadas durante o desenvolvimento das lesões periapicais também estão relacionados às respostas de

defesa do hospedeiro (Nair et al., 2004; Duncan e Cooper, 2020; Galler et al., 2021). Por esse motivo, o entendimento da contribuição desses mecanismos de defesa na progressão das lesões periapicais é de extrema importância.

1.2 Neutrófilos e Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

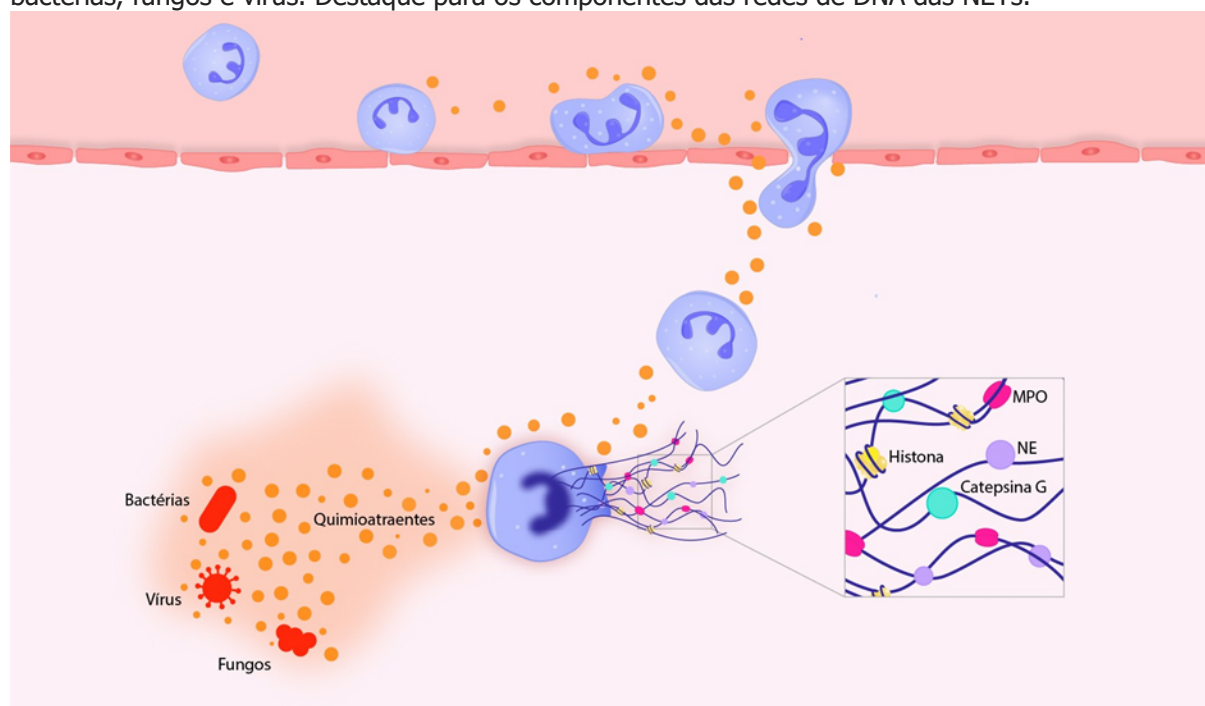
Os primeiros leucócitos recrutados para o local infectado são os neutrófilos, pois são atraídos rapidamente pelo gradiente químico formado por endotoxinas e mediadores liberados pelos patógenos no local da infecção (Kolaczowska e Kubes, 2013; Zawrotniak e Rapala-Kozi, 2013; Liew e Kubes, 2019; Burn et al., 2021). Os neutrófilos, também chamados de granulócitos polimorfonucleares (PMN), possuem meia-vida curta circulantes no sangue e atuam durante a inflamação aguda, eliminando patógenos e orquestrando outras células do sistema imune. Entretanto, a ativação contínua durante a inflamação, por meio de citocinas e produtos bacterianos, permite uma longevidade aumentada de neutrófilos no local da infecção. Diante disso, trabalhos recentes mostraram que os neutrófilos podem ter funções mais complexas, além do seu papel na infecção aguda, exercendo funções chave no sistema imune adaptativo (Kolaczowska e Kubes, 2013; Liew e Kubes, 2019; Rosales, 2020; Singhal e Kumar, 2022).

A eliminação de patógenos por neutrófilos está relacionada a diversos mecanismos antimicrobianos decorrentes de seus componentes celulares, como peptídeos antimicrobianos, enzimas proteolíticas e produção de espécies reativas de oxigênio (*Reactive Oxygen Species* - ROS) e de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species* - RNS) (Alberts et al., 2014; Burn et al., 2021). Os neutrófilos podem realizar a fagocitose, processo que ocorre a partir da ligação da superfície das células fagocíticas ao patógeno e sua internalização em vesículas chamadas de fagossomos. O fagossomo se funde com os grânulos lisossomais, que liberam sobre o patógeno, peptídeos antimicrobianos, enzimas lisossomais e ROS e RNS, para sua morte intracelular (Alberts et al., 2014; Galli et al., 2011; Uribe-Querol e Rosales, 2020; Burn et al., 2021). Além disso, também podem combater os patógenos por sua degranulação intra e extracelular, liberando ROS, RNS e proteínas antimicrobianas (AMPs) (Häger et al., 2010; Burn et al., 2021).

Um mecanismo de defesa adicional dos neutrófilos é a liberação de uma

barreira física para aprisionar e matar os micro-organismos, chamada de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (*Neutrophils Extracellular Traps* – NETs) (Amulic et al., 2012; Papayannopoulos, 2018). As NETs resultam na liberação de redes/fitas de DNA associadas a ROS, peptídeos nucleares, como as histonas (H1, H2A, H2B, H3 e H4) e proteínas granulares, como elastase de neutrófilos (NE), mieloperoxidase (MPO), catepsina G, enzima proteinase-3 (PR3), lisozima C, lactoferrina, defensinas, calprotectina e gelatinase (Brinkmann, 2018; Burgener e Schroder, 2020; Tan et al., 2021). Essas redes aprisionam e imobilizam os patógenos, evitando sua disseminação e exercem atividade antimicrobiana por meio da ação de alguns de seus componentes (Burgener e Schroder, 2020). A MPO, por exemplo, libera o ácido hipocloroso (HOCl), que é uma espécie reativa de oxigênio, a qual atua como agente microbicida e a NE rompe a membrana bacteriana (Pu et al., 2016). Logo, as NETs possuem como função principal a resolução de infecções a partir da morte de micro-organismos (Brinkmann, 2018) e a regulação da resposta inflamatória (Hidalgo et al., 2022). A Figura 1 esquematiza a formação de NETs como resposta dos neutrófilos frente a patógenos durante a infecção.

Figura 1. Ilustração da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos na presença de bactérias, fungos e vírus. Destaque para os componentes das redes de DNA das NETs.



Fonte: autoria própria.

Diversos trabalhos têm objetivado elucidar os mecanismos de formação das

NETs em respostas a diferentes estímulos que provocam eventos de sinalização distintos e se traduzem em mudanças morfológicas dos neutrófilos (Pilszczek et al., 2010; Yipp et al., 2012; Douda et al., 2015; Kenny et al., 2017; Thaim et al., 2020; Huang et al., 2022). Esses eventos de sinalização podem ser por meio da ativação de receptores de superfície, gerando mudança na concentração de cálcio intracelular, ativação de cascatas de sinalização de quinases e produção de ROS ou ainda por meio de toxinas bacterianas e ROS, sem ativar os receptores de superfície (Thaim et al., 2020). Assim, a liberação de NETs pode ocorrer por diferentes vias, dependendo do estímulo indutor.

A primeira via descrita e predominante é a NETose suicida ou lítica, a qual induz a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, que catalisa a liberação e transferência de elétrons da NADPH para o oxigênio molecular gerando o ânion superóxido (O_2^-), um tipo de ROS que é convertido posteriormente em várias outras espécies reativas (Brinkmann et al., 2004; Palmer et al., 2012; Burgener e Schroder, 2020; Hidalgo et al., 2022; Block et al., 2022). A formação de ROS ativa a liberação das enzimas mieloperoxidase (MPO) e elastase de neutrófilo (NE) dos grânulos azurófilos, as quais se deslocam para o núcleo e inativam por clivagem as histonas, promovendo o relaxamento da cromatina e descondensação do DNA (Papayannopoulos et al., 2010; Björnsdottir et al., 2015; Castanheira e Kubes, 2019). Além disso, as ROS promovem um aumento no influxo de cálcio, ativando a enzima peptidilarginina deiminase 4 (PAD4), que atua citrulinando as histonas, provocando a descondensação do DNA celular (Burgener e Schroder, 2020; Tan et al., 2021). Posteriormente, a membrana nuclear se decompõe e a cromatina, descondensada e agora no citosol, interage com enzimas citoplasmáticas, seguida da lise da membrana plasmática e liberação das NETs (Papayannopoulos et al., 2010; Björnsdottir et al., 2015; Burgener e Schroder, 2020). Esses últimos processos de rompimento da membrana plasmática e liberação de NETs para o espaço extracelular são mediados pela enzima Gasdermina D (GSDMD), ativada por meio da clivagem por NE, o que resulta na morte dos neutrófilos (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2010; Sollberger et al., 2018; Hidalgo et al., 2022), uma morte celular, que difere da apoptose e necrose (Brinkmann et al., 2004; Fuchs et al., 2010; Castanheira e Kubes, 2019; Burgener e Schroder, 2020).

Adicionalmente, foi descrito um outro mecanismo de liberação de NETs, como uma estratégia antimicrobiana mais rápida e que possibilita a viabilidade dos neutrófilos, os quais continuam desempenhando suas funções como migração e fagocitose enquanto liberam as NETs (Pilszczek et al., 2010; Yipp et al., 2012; Boeltz et al., 2019; Rosazza et al., 2021; Block et al., 2022). Esse processo procedeu da sinalização de cálcio e conseqüentemente ativação da PAD4, que permite a citrulinização das histonas para mediar a descondensação do DNA (Souza et al., 2018; Vorobjeva e Chernyak, 2020). A cromatina descondensada juntamente com as enzimas foram liberadas sem rompimento do núcleo, por meio de vesículas nucleares que se transportam para a membrana plasmática, onde a cromatina é externalizada sem torná-la permeável, possibilitando que os neutrófilos permaneçam viáveis. (Castanheira e Kubes, 2019; Burgener e Schroder, 2020). A forma de ativação dessa via de liberação vital de NETs ainda não está totalmente elucidada, entretanto, foi observado que ela não depende da liberação de NADPH oxidase, como ocorre na NETose suicida (Pilszczek et al., 2010; Doua et al., 2015; Hidalgo et al., 2022). Outra diferença é que ainda que a NETose suicida foi acompanhada de citrulinização de histonas dependente de PAD4, ela pode ser dispensável para a extrusão de NETs, visto que a NE também atua descondensando o DNA (Claushuis et al., 2018; Guiducci et al., 2018; Burgener e Schroder, 2020). Já na liberação vital de NETs, a ação da PAD4 parece essencial (Lewis et al., 2015; Burgener e Schroder, 2020).

Mais recentemente alguns poucos estudos têm descrito, ainda, a extrusão de NETs por meio da sinalização não canônica do inflamassoma (Chen et al., 2018; Burgener e Schroder, 2020). Os inflamassomas atuam como sensores para bactérias presentes no citosol e ativam proteínas efetoras conhecidas como caspases, que induzem uma morte celular programada chamada de piroptose. No entanto, quando avaliada a presença microbiana no citosol de neutrófilos, foi observada a ativação da caspase-11, envolvida na ativação do inflamassoma não canônico, levando à clivagem de GSDMD e morte celular com características de NETose. Pois, a liberação de NETs por essa via, assim como nas outras, apresentou extrusão de DNA, co-localização de DNA-MPO e citrulinização de histonas, porém ocorreu independente da atividade de NE ou MPO, pois os poros nucleares permitiram que a caspase acessasse a cromatina degradando as histonas (Chen et al., 2018; Sollberger et al.,

2018). Além disso, a enzima PAD4 pode atuar na citrulinização das histonas, mas não é essencial para essa via (White et al., 2016; Chen et al., 2018; Burgener e Schroder, 2020).

Embora as NETs sejam liberadas com o objetivo principal de eliminar micro-organismos por meio da ação de seus componentes citotóxicos e oxidantes (Brinkmann, 2018; Liew e Kubes, 2019), as armadilhas podem também gerar danos colaterais às células do hospedeiro uma vez que as proteases, proteínas citotóxicas e ROS associadas aos prolongamentos dos neutrófilos também podem funcionar como DAMPs no meio extracelular, promovendo a liberação de mediadores pró-inflamatórios e o recrutamento de mais células imunes, amplificando a resposta inflamatória (Foussert et al., 2020; Singhal e Kumar, 2022). Esses componentes citotóxicos podem atuar, ainda, como autoantígenos, desencadeando a produção de autoanticorpos, o que pode promover o desenvolvimento de doenças autoimunes (Castanheira e Kubes, 2019; Hidalgo et al., 2022; Huang e O'Sullivan, 2022).

Diante disso, vários estudos demonstraram que o influxo sustentado de neutrófilos e liberação persistente de NETs está relacionado a várias doenças, como lúpus eritematoso (Hakkim et al., 2010; Wirestam et al., 2020; Fresneda et al., 2021; Wang et al., 2022), vasculite de pequenas veias (Kessenbrock et al., 2009; Bergqvist et al., 2019; Foussert et al., 2020; Chen et al., 2022), sepse (Clark et al., 2007; Meng et al., 2012; Denning et al., 2019; Silva et al., 2021; Zhang et al., 2023), artrite reumatóide (Chapman et al., 2019; Fresneda et al., 2021; Cheng et al., 2022; Pan et al., 2023), lesões pulmonares (Narasaraju et al., 2011; Lefrançais et al., 2018; Uddin et al., 2019; Scozzi et al., 2022) e outras condições inflamatórias (Parker et al., 2012; Euler et al., 2019; Huang et al., 2020; Lai et al., 2023). Foi observado que as NETs também possuem funções na progressão, metástase e recidiva do câncer (Masucci et al., 2020; Herre et al., 2023).

Adicionalmente, desde a declaração da Organização Mundial da Saúde que decretou a pandemia pelo novo coronavírus, tem sido estudada a participação das NETs na gravidade das lesões em diferentes órgãos acometidos por essa infecção viral (Barnes et al., 2020; Middleton et al., 2020; Tomar et al., 2020; Szturmowicz et al., 2021; Zhang et al., 2022; Zhao et al., 2022; Root-Bernstein, 2023). O aumento da formação das NETs durante o curso do COVID-19 tem potencial deletério para

células epiteliais pulmonares (Veras et al., 2020), possuindo papel principal na gravidade da síndrome do desconforto respiratório agudo, manifestações renais, inflamatórias sistêmicas (Guéant et al., 2021; Al-Kuraishy et al., 2022) e cardiovasculares após a doença (McCarthy et al., 2021; Zhang et al., 2022). Devido a expressiva atribuição das NETs nessas condições, podem ser um potencial alvo terapêutico (Tan et al., 2021; Mutua et al., 2021; Al-Kuraishy et al., 2022; Zhao et al., 2022).

Na Odontologia, alguns estudos relacionaram a formação das NETs com a inflamação periodontal, podendo estar associada à gravidade da doença periodontal (White et al., 2016; Vitkov et al., 2017; Kumar et al., 2018; Kaneko et al., 2018; Magán-Fernández et al., 2019, 2020; Moonen et al., 2020; Vitkov et al., 2021; Wang et al., 2021). A formação de NETs em pacientes com periodontite esteve associada a parâmetros clínicos sistêmicos, estabelecendo uma possível ligação entre periodontite e artrite reumatóide (Oliveira et al., 2021), assim como do efeito deletério da periodontite para o curso grave da COVID-19 (Vitkov et al., 2022). Além disso, um estudo mostrou que metacrilatos presentes nas resinas compostas, como o dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA), o dimetacrilato de uretano (UDMA) e o dimetacrilato de bisfenol A glicol (Bis-GMA) exerceram um efeito pró-inflamatório nos neutrófilos, estimulando a liberação NETs (Alizadehgharib et al., 2020).

Na Endodontia, Cooper et al. (2017) relataram a relevância de avaliar as NETs e seus componentes como novos marcadores para o prognóstico de patologias pulpares, bem como determinar seus níveis na infecção pulpar para direcionar novas formas de gerenciamento da doença. Ainda, foi realizado um estudo avaliando a influência das NETs na polpa dental infectada e a relação de seus componentes com as respostas das células pulpares. Observou-se que as NETs possuem um importante papel na patogênese das doenças pulpares, como injúrias e efeitos inflamatórios crônicos nas células da polpa, contribuindo para sua progressão. Além disso, concluíram que os NETs e as histonas podem atuar como novos marcadores e/ou alvo terapêuticos para patologias pulpares (Holder et al., 2019). Mais recentemente, Duncan e Cooper, em 2020, reforçaram que as NETs estão presentes na polpa dentária, como mecanismo de defesa, mas sua liberação pode exacerbar a inflamação e iniciar a morte celular pulpar. Recentemente, um estudo demonstrou a

expressão de armadilhas extracelular de neutrófilos, por meio de imunofluorescência da histona citrulinada 3 (H3Cit) e da mieloperoxidase (MPO) em lesões periapicais induzidas experimentalmente no contexto de avaliação do querubismo, uma desordem genética inflamatória óssea caracterizada pelo aparecimento de lesões fibrocísticas nos maxilares (Fujii et al., 2021). Além disso, dentes com pulpite irreversível assintomática apresentaram número aumentado de neutrófilos no tecido pulpar, os quais a maioria apresentava morfologia semelhante às NETs (Contreras et al., 2023).

Um estudo do nosso grupo de pesquisa avaliou a participação das armadilhas extracelulares de neutrófilos durante a formação e progressão de lesões periapicais em camundongos. Os resultados deste estudo permitiram evidenciar a presença das armadilhas extracelulares de neutrófilos nas lesões periapicais, especialmente nos períodos tardios de avaliação, concomitantemente com maior número de neutrófilos. Adicionalmente, as proteínas PAD4 e CTSG também estiveram presentes durante a progressão da lesão periapical, sugerindo ação na degradação tecidual, potencializando a resposta inflamatória e a progressão da lesão periapical (Massoni, 2023).

1.3 Espécies Reativas de Oxigênio (ROS)

Espécies reativas são compostos químicos, como moléculas, íons ou radicais livres, altamente instáveis e reativos, os quais podem ser derivados de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (RNS). Os radicais livres tendem a ligar o elétron não pareado, na sua última camada, com outros de moléculas ou estruturas próximas, comportando-se como agentes oxidantes. Já as espécies que não são radicais livres são facilmente convertidas em radicais altamente reativos (Dickson e Zhou, 2020; Herb e Schramm, 2021). Devido a sua natureza, as espécies reativas promovem uma cascata de transição de uma espécie para a outra (Brieger et al., 2012; Lorenzen et al., 2017; Mullen et al., 2020; Sies e Jones, 2020).

As ROS e RNS são geradas em processos fisiológicos controlados para exercerem seu papel essencial na manutenção de diversas funções celulares, como produção de energia, defesa contra patógenos invasores, sinalização celular, atuando no crescimento, diferenciação e morte das células e na expressão de genes,

auxiliando as células a se adaptarem e a sobreviverem em condições de stress causadas por estímulos bioquímicos, fisiológicos e patológicos (Finkel, 2011; Dandekar et al., 2015; Senoner e Dichtl, 2019; Tauffenberger e Magistretti, 2021; Sies et al., 2022). Portanto, essas espécies reativas são produzidas em processos metabólicos celulares, ou ainda em resposta a patógenos e a citocinas inflamatórias (Herb e Schramm, 2021).

Como já mencionado, ao ser detectado um patógeno ou dano tecidual o organismo estimula reações inflamatórias, como um processo protetor, com o objetivo de eliminar a infecção ou tecido danificado e promover o reparo. Essas reações imuno-inflamatórias são conduzidas pelo aumento da formação de ROS/RNS pelas células imunes, sendo de extrema importância para o início, progressão e término dos processos inflamatórios (Lorenzen et al., 2017; Mullen et al., 2020). As primeiras células recrutadas para o local da infecção atuam de forma rápida, realizando a fagocitose dos micro-organismos invasores, como mecanismo de defesa do sistema imune inato. As ROS são produzidas nas células fagocíticas em um processo conhecido como explosão oxidativa (*oxidative burst*), pelo complexo enzimático NADPH oxidase, que produz O_2^- (Yang et al., 2013; Al-Sharid, 2021). A enzima óxido nítrico sintase (iNOS), também pode estar envolvido no *oxidative burst*, tem sua expressão aumentada por citocinas e estímulos inflamatórios, e atua reduzindo o oxigênio molecular (O_2) em óxido nítrico (NO) e H_2O (Marrocco et al., 2017; Checa e Aran, 2020; Juan et al., 2021). O NO é uma importante espécie reativa, que é o substrato primário do O_2^- e a reação entre eles dá origem ao peroxinitrito ($ONOO^-$), altamente reativo e que possui forte atividade antimicrobiana (Arreiros et al., 2006; Thomas, 2015; Checa e Aran, 2020). Ainda, o O_2^- sofre dismutação em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e na presença dessa ROS, a enzima mieloperoxidase (MPO) oxida substratos como o Cl^- , formando ácido hipocloroso (HOCl), um potente oxidante e agente antimicrobiano (Aratani, 2018; Al-Shehri, 2021). As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio são as principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, pois essas reações redox causam danos irreversíveis e inespecíficos em biomoléculas celulares vitais do patógeno (Arreiros et al., 2006; Al-Shehri, 2021).

Além de apresentarem funções na defesa do hospedeiro eliminando

patógenos, as ROS e RNS coordenam outros mecanismos, a partir da modificação de proteínas, lipídios, receptores de membrana e canais iônicos, atuando como moléculas sinalizadoras, regulando vários fatores de transcrição e os papéis fenotípicos e funcionais das células (Yang et al., 2013; Lorenzen et al., 2017; Checa e Aran, 2020). Deste modo, a formação de ROS/RNS estimula importantes vias de sinalização, amplificando a resposta inflamatória (Chatterjee et al., 2016). Além disso, altera o metabolismo dos neutrófilos, levando à fagocitose ou ao processo de NETose e formação de NETs (Fokam e Hoskin, 2020; Hidalgo et al., 2022). As espécies reativas também ativam as células dendríticas a iniciar a resposta imune específica ao antígeno (Yang et al., 2013; Morris et al., 2022) e regulam o metabolismo das células T (Franchina et al., 2018; Lin et al., 2021). Nos macrófagos, até então não foi elucidado o mecanismo ao certo, mas foi demonstrado que formação do inflamassoma NLRP3 por essas células envolve e requer a regulação redox (Zhou et al., 2010; Herb e Schramm, 2021). Ainda, influencia a polarização de macrófagos em fenótipos M1 (pró-inflamatório) e M2 (anti-inflamatório) (Xu et al., 2016; Morris et al., 2022). Dentre os fatores de transcrição sensíveis a alterações redox, estão o fator nuclear- κ B, estimulando a produção de moléculas pró-inflamatórias e o fator nuclear 2 relacionado ao eritróide 2 (Nrf2), estimulando moléculas anti-inflamatórias (Morgan e Liu, 2011; Kovac et al., 2015; Checa e Aran, 2020). Logo, durante a inflamação, o aumento de ROS e RNS está relacionado com a sinalização celular e eliminação de células alteradas ou infectadas, contribuindo para a resolução da inflamação (Fokam e Hoskin, 2020).

Entretanto, o excesso de ROS e RNS produzido durante a resposta inflamatória e a exposição por períodos prolongados de células e tecidos a essas espécies podem levar a amplificação da inflamação e causar danos associados à inflamação crônica (Arulselvan et al., 2016; Banerjee et al., 2020; Sun et al., 2020). Por isso, evidências crescentes indicam a importância dos sistemas de regulação redox das células durante o processo inflamatório, que incluem tanto as ROS e RNS, como também componentes antioxidantes, como as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxiredoxina (Prx), glutathiona peroxidase (GSH-Px) e glutathiona redutase (GR) (Arulselvan et al., 2016; Senoner e Dichtl, 2019; Meng et al., 2021; Tanable et al., 2022; Sies et al., 2022). Os antioxidantes são produzidos

pelo organismo e também participam das reações redox reduzindo a formação das espécies reativas para manutenção de seus níveis adequados, essenciais para as diversas funções celulares (Finkel, 2011; Dandekar et al., 2015; Senoner e Dichtl, 2019; Tauffenberger e Magistretti, 2021; Sies et al., 2022).

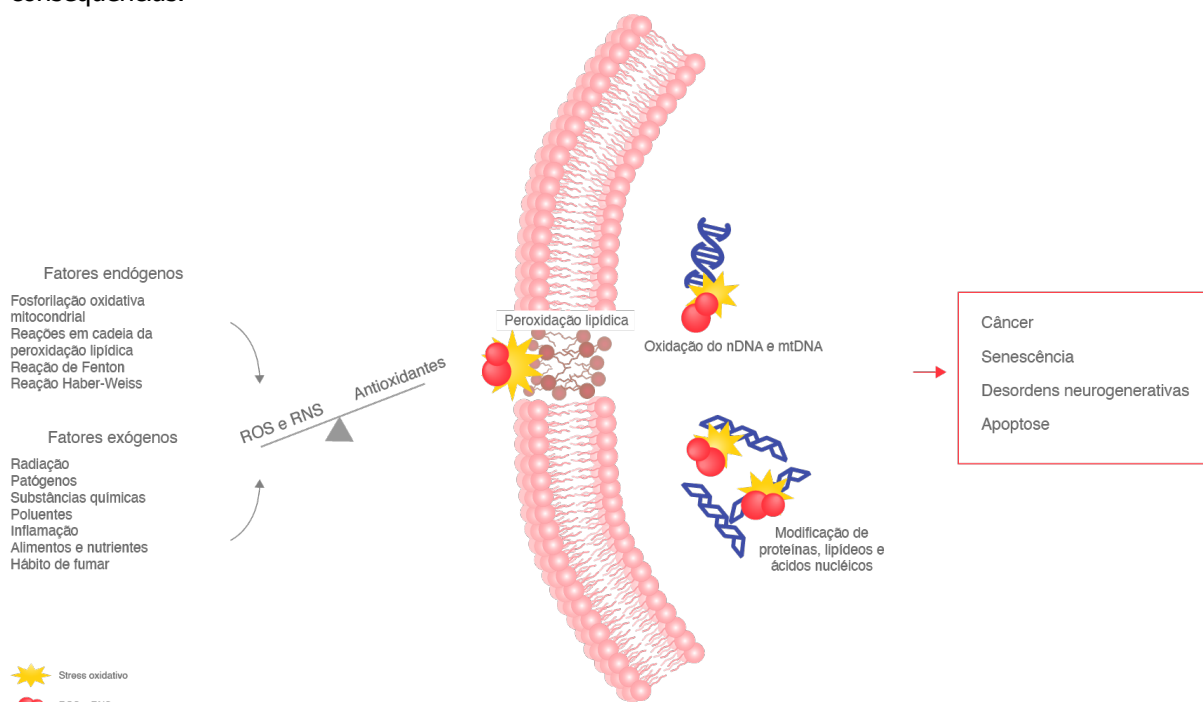
A desregulação ou interrupção na produção de compostos oxidantes e na atuação dos sistemas de defesa antioxidante a favor da uma produção exagerada de ROS e RNS resulta no stress oxidativo (Hrycay e Bandiera, 2015; Kattoor et al., 2017), promovendo a oxidação de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, desencadeando alterações em funções celulares e danos teciduais (Fois et al., 2018; Daenen et al., 2019; Sies et al., 2022).

Em situações patológicas, as ROS e RNS são produzidas em quantidades excessivas, estimulando moléculas pró-inflamatórias (Checa e Aran, 2020). Por isso, o stress oxidativo foi relacionado a uma variedade de doenças inflamatórias, desempenhando papel importante em doenças cardiovasculares (García et al., 2017; Kattor et al., 2017; Ndeprepa, 2019; Senoner e Dichtl, 2019; Steven et al., 2019; Chang et al., 2020; Donia e Khamis, 2021; Krzemińska et al., 2022; Hou et al., 2023), diabetes mellitus (Pitocco et al., 2013; Ighodaro, 2018; Rendra et al., 2019; Yaribeygi et al., 2020; Ramos-Riera et al., 2023), lesões pulmonares (Fois et al., 2018; Xu et al., 2020; Zuo e Wijegunawardana, 2021; Barnes, 2022), doenças autoimunes (Shah e Sinha, 2013; Smallwood et al., 2018; Wójcik et al., 2021; He et al., 2022), além de estar envolvido no desenvolvimento de lesões cerebrais degenerativas (Crotty et al., 2017; Feitosa et al., 2018; Martínez et al., 2019, Picca et al., 2020; Ikawa et al., 2021; Li et al., 2023). Adicionalmente, o stress oxidativo tem sido considerado um importante fator no desenvolvimento de tumores, assim como sua regulação está relacionada à resposta a terapias anti-tumorais (Gorrini et al., 2013; Kudryavtseva et al., 2016; Poprac et al., 2017; Hu et al., 2021; Rosini e Pollegioni, 2022). Alguns trabalhos também relataram o papel das ROS em doenças ósseas, como a osteoporose, visto que seus altos níveis atuam favorecendo a osteoclastogênese induzida por RANKL e reabsorção óssea (Wauquier et al., 2009; Bai et al., 2005; Lee et al., 2005; Domazetovic et al., 2017; Agidigbi e Kim, 2019; Kimball et al., 2021). Ainda, estudos investigaram o papel das ROS na COVID-19, pois seus níveis elevados estiveram relacionados a formação excessiva de NETs,

inflamação e destruição tecidual em paciente infectados, apoiando a participação do stress oxidativo nos casos graves, pelo aumento do estado inflamatório e da produção de citocinas (Schönrich et al., 2020; Mingoti et al., 2022), podendo o stress oxidativo sinalizar o alto risco da sua gravidade no início da doença (Laforge et al., 2020). Portanto, vários estudos têm explorado novos caminhos para abordagens terapêuticas, com substâncias que mantenham a homeostase redox (de Las Heras et al., 2020; Silvagno et al., 2020; Forman e Zhang, 2021; Vollbracht e Kraft, 2022).

A Figura 2 ilustra, resumidamente, os principais fatores que influenciam o stress oxidativo, além de seus principais efeitos.

Figura 2. Ilustração dos efeitos nocivos do stress oxidativo nos processos celulares e suas principais consequências.



Fonte: autoria própria.

O conhecimento das fontes que causam stress oxidativo pode não só prevenir doenças sistêmicas como também doenças bucais, pois a cavidade oral é exposta a vários fatores que promovem a produção exacerbada de ROS (Żukowski et al., 2018; Sczapanik et al., 2022; Shetty et al., 2022). Diferentes patologias da mucosa oral como líquen plano, estomatite aftosa recorrente, pênfigo vulgar, leucoplasia e o câncer oral apresentam aumento das ROS e menor atividade do sistema antioxidante (Sardaro et al., 2019). Strycharz-Dudziak et al. (2020)

observaram em pacientes com câncer de orofaringe que tumores menos diferenciados e com maiores dimensões estavam relacionados a uma menor atividade das enzimas antioxidantes SOD e GSH-Px. Além disso, a coinfeção do vírus do papiloma humano (HPV) e Epstein-Barr (EBV) também mostrou níveis diminuídos dessas enzimas quando comparados à infecção única desses vírus nesses pacientes. As ROS também estão presentes em grandes concentrações na doença periodontal, podendo estar envolvida no seu estabelecimento e progressão (Acquier et al., 2017; Tóthová et al., 2017; Wang et al., 2017; Li et al., 2018; Chen et al., 2019). Além disso, a periodontite agressiva e algumas doenças associadas à doença periodontal grave também estão relacionadas ao stress oxidativo, o que favorece a sua gravidade e que pode ser utilizado como alvo terapêutico (Sczapanik et al., 2020; Bhagat et al., 2021; Palathingal et al., 2022). Yu et al. (2022) demonstraram resultados promissores ao utilizar um nanomaterial antioxidante, que possui alta atividade de SOD e CAT, em um modelo de periodontite em ratos, suprimindo a perda óssea e diminuindo a inflamação.

Ainda, no tecido pulpar, as ROS também são encontradas, produzidas em níveis fisiológicos, e mediadas por células dentárias para promover reparo. Porém, em níveis elevados, possuem efeitos deletérios que promovem a morte celular pulpar ou necrose desse tecido (Duncan e Cooper, 2020; Gallorini et al., 2021; Zhang et al., 2021). Alguns estudos mostraram a participação do stress oxidativo no desenvolvimento de lesões periapicais (Inchingolo et al., 2013; Hernández-Ríos et al., 2017; Jakovljevic et al., 2018; Loureiro et al., 2021; Zivanovic et al., 2021; Loureiro et al., 2022), estando associado à dor e reabsorção óssea (Vengerfeldt et al., 2017). Nesse contexto, um estudo demonstrou a ação promissora do medicamento dioscina, de ação antioxidante, no controle da periodontite apical refratária, uma vez que estimulou, *in vivo*, a osteogênese de pré-osteoblastos por meio da inibição das ROS (Yin et al., 2020). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou, por meio de análise proteômica, menores níveis de proteínas relacionadas ao stress oxidativo em abscessos apicais agudos em comparação a amostras de dentes com periodontite apical crônica (Loureiro et al., 2022).

Outros trabalhos evidenciaram que o stress oxidativo na lesão periapical pode estar associado a doenças sistêmicas, causando consequências generalizadas

(Inchingolo et al., 2013; Hernández-Ríos et al., 2017; Tibúrcio-Machado et al., 2021; Dos Santos et al., 2023) uma vez que a presença de lesão periapical influenciou o balanço oxidante e antioxidante no coração, pâncreas, fígado e rins em um estudo com ratos (Barcelos et al. 2020). Além disso, Tsosura et al. (2021) observaram que a periodontite apical materna ocasionou, na sua prole adulta, alterações no sistema antioxidante e menor sensibilidade à insulina. Outro trabalho demonstrou, ainda, que as lesões pulpares associadas ao diabetes poderiam ter como causa o dano oxidativo mitocondrial (Wu et al., 2022). Nesse contexto, recentemente Loureiro et al. (2022) avaliaram a expressão de proteínas em amostras do canal radicular de dentes com periodontite apical assintomática, de pacientes com diabetes tipo 2 e de pacientes não comprometidos sistemicamente. Esses autores puderam evidenciar que, embora as proteínas relacionadas ao stress oxidativo, como a MPO, peroxiredoxinas, eosinófilo peroxidase e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase foram observadas em ambos os grupos, estas estiveram maior expressão nos pacientes diabéticos.

Diante do exposto, considerando evidências científicas da participação do stress oxidativo no desenvolvimento da lesão periapical, uma revisão sistemática destacou a importância de um melhor entendimento da relação das ROS na patogênese dessas lesões e o estabelecimento de ferramentas de diagnóstico mais eficazes, além de alvos terapêuticos voltados para o restabelecimento do equilíbrio oxidativo (Georgiou et al., 2021). Para isso, é necessária uma melhor compreensão da dinâmica e do efeito das respostas oxidantes e antioxidantes ao longo da formação da lesão periapical. Entretanto, até o momento, nenhum trabalho realizou a caracterização de enzimas redox durante a gênese e o desenvolvimento da lesão periapical.

1.4 Relação entre as Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) e as Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs)

Dado o papel das ROS e NETs na resposta imuno-inflamatória e visto que as ROS podem estimular a liberação de NETs, seja por meio da sua formação pela NADPH oxidase ou por meio de ROS mitocondrial (Douda et al., 2015; Dunn et al., 2015; Al-Shehri; 2021), ou ainda por meio da liberação de ROS pelos próprios micro-organismos (Kenny et al., 2017), diferentes trabalhos têm avaliado a ação dessas

estruturas no processo inflamatório com repercussão sistêmica e sua associação (Fuchs et al., 2007; Stojkov et al., 2017; Kenny et al., 2017; Schonrich et al., 2020; Ye et al., 2021; Wang et al., 2021; Huang et al., 2022; Zu et al., 2022). Dinauer et al. (2005), mostraram que a deficiência de NOX2 e consequentemente ausência de produção eficiente de ROS, principal fator na doença granulomatosa (DGC), esteve relacionada à maior propensão a infecções bacterianas repetidas e inflamação crônica. Outro estudo mostrou que a formação de H₂O₂ foi eficiente para promover a liberação de NETs e após a utilização da enzima catalase, a qual remove o H₂O₂ pela sua conversão em água e dióxido de oxigênio, houve inibição da liberação de NETs. Porém, um inibidor de catalase, o 3-aminotriazole (3-AT) aumentou a liberação de NETs, por meio da elevação dos níveis de H₂O₂ disponíveis (Fuchs et al., 2007). Foi avaliado também o efeito da curcumina, importante redutor de ROS e ativador da via de sinalização antioxidante, sob a formação de NETs *in vitro*, estimulada com éter difenílico polibromado, e a curcumina impediu a formação de NETs via inibição de ROS (Ye et al., 2021). Outro agente redutor de ROS, o piruvato de etila, reduziu a liberação de NETs durante a sepse, atenuando também a resposta inflamatória sistêmica e a disfunção da barreira epitelial (Wang et al., 2021). Ainda durante a sepse, o zingerone, substância antioxidante, apresentou efeito protetor por promover inibição da formação de NETs devido a inibição de ROS por meio da via Nrf2 (Zhu et al., 2022).

Com relação à associação entre ROS e NETs na Odontologia, foi visto que a bactéria *Porphyromonas gingivalis* induziu grande quantidade de ROS em neutrófilos e que a principal resposta dos neutrófilos a esse patógeno foi a fagocitose, embora as NETs possam ter um papel secundário (Jayaprakash et al., 2015). Foi observado que esse patógeno pode ter a capacidade de degradar NETs, o que reflete na sua formação reduzida, favorecendo à invasão microbiana do *P. gingivalis* no tecido (Mikolai et al., 2020). Outro estudo avaliou a expressão de ROS e NETs a partir de neutrófilos isolados do sangue periférico estimulados com 19 bactérias periodontopatogênicas. Foi observada, também, a expressão de proteínas como elastase, mieloperoxidase e catepsina G. Níveis elevados de NETs e ROS foram encontrados decorrentes de micro-organismos como *Veillonella parvula* e *Streptococcus gordonii*. Ainda, foi observado que as NETs aprisionaram todas as

bactérias testadas, mas não foram capazes de destruí-las. Os inibidores de receptores não mostraram efeitos na liberação de NETs e ROS, o que sugere uma variabilidade da resposta dos neutrófilos a diferentes tipos bacterianos, podendo contribuir para a patogênese das doenças periodontais por meio de diferentes mecanismos moleculares (Hirschfeld et al., 2017). Isso é reforçado por meio dos diferentes mecanismos que os patógenos possuem para resistir às respostas de defesa mediada pelos neutrófilos, como formação de ROS e NETs (Jiang et al., 2021).

Diante do papel das espécies reativas e das NETs em várias doenças sistêmicas e seu potencial na modulação da resposta imunológica, é importante buscar compreender melhor seus efeitos e alvos para futuras estratégias terapêuticas.

Assim, para abordar o tema proposto, foram desenvolvidos estudos divididos nos 2 capítulos a seguir:

- Participação da atividade redox durante a formação e desenvolvimento da lesão periapical; e
- Avaliação da relação entre espécies reativas de oxigênio e armadilhas extracelulares de neutrófilos na gênese e desenvolvimento da lesão periapical.

CAPÍTULO 1 - PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE REDOX DURANTE A FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL

CAPÍTULO 1 - PARTICIPAÇÃO DA ATIVIDADE REDOX DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL

INTRODUÇÃO

Muitos aspectos envolvidos na resposta imunológica e nas vias inflamatórias são conduzidos por reações de oxi-redução (redox), que ocorrem nas células imunes, promovendo a geração aumentada de espécies reativas de oxigênio (ROS) e de nitrogênio (*Reactive Nitrogen Species* - RNS) e stress oxidativo. A formação dessas espécies reativas está relacionada à manutenção de diversas funções celulares, como sinalização celular e homeostase (Finkel, 2011; Dandekar et al., 2015; Senoner e Dichtl, 2019; Tauffenberger e Magistretti, 2021; Sies et al., 2022). Logo, possuem papel crucial no início, progressão e término dos processos inflamatórios (Lorenzen et al., 2017; Mullen et al., 2020).

A resposta imuno-inflamatória inicial consiste na produção de mediadores químicos, fenômenos vaso-exsudativos e recrutamento de leucócitos fagocíticos para o local infectado (Schroder e Tschop, 2010; Alberts et al., 2014; Arulselvan et al., 2016; Abdulkhaleq et al., 2018; Sun et al., 2020). Essas células fagocíticas geram várias ROS no processo conhecido como explosão oxidativa (*oxidative burst*), pelo complexo enzimático NADPH oxidase, que produz O_2^- (Yang et al., 2013; Al-Sharid, 2021). O O_2^- reage rapidamente com outras moléculas, podendo formar outras espécies reativas como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito ($ONOO^-$), ou ainda o ácido hipocloroso (HOCl) (Arreiros et al., 2006; Thomas, 2015; Aratani, 2018; Checa e Aran, 2020; Al-Shehri, 2021). As ROS e RNS são as principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, pois causam danos irreversíveis e inespecíficos em biomoléculas celulares vitais do patógeno (Arreiros et al., 2006; Al-Shehri, 2021).

Ao mesmo tempo, a sua formação também estimula vias de amplificação da inflamação. Pois modulam proteínas, lipídios, receptores de membrana e canais iônicos, regulando citocinas e quimiocinas para ativar e mobilizar células do imunológico (Yang et al., 2013; Franchina et al., 2018; Lin et al., 2021; Morris et al., 2022) e induzindo a expressão de vários genes, para uma reação pró e anti-inflamatória (Morgan e Liu, 2011; Kovac et al., 2015; Checa e Aran, 2020). Essas

respostas estão não só sob o controle das ROS e RNS, como também do sistema antioxidante que atuam mantendo seus níveis fisiológicos (Balaban et al., 2005; Senoner e Dichtl, 2019; Sies et al., 2022).

A formação elevada e prolongada dessas espécies reativas resulta no stress oxidativo, promovendo a oxidação de biomoléculas, incluindo proteínas, lipídeos e DNA, desencadeando alterações em funções celulares e danos teciduais (Fois et al., 2018; Daenen et al., 2019; Sies et al., 2022). Desta forma, o stress oxidativo foi associado a várias patologias inflamatórias e doenças autoimunes (Yaribeygi et al., 2020; He et al., 2022; Krzemińska et al., 2022; Ramos-Riera et al., 2023; Hou et al., 2023).

Nas infecções endodônticas, a persistência de micro-organismos, seus produtos metabólicos e conseqüentemente das respostas imuno-inflamatórias do hospedeiro resulta na formação de lesões periapicais (Stashenko et al., 1989; 1990; Čolić et al., 2009; AAE, 2020; Galler et al., 2021). Essa inflamação crônica pode promover a superprodução de ROS e RNS e a exposição prolongada de células e tecidos a elas, que podem contribuir para necrose do tecido pulpar e reabsorção óssea. Diante disso, alguns estudos observaram a participação do stress oxidativo no desenvolvimento da lesão periapical (Inchingolo et al., 2013; Hernández-Ríos et al., 2017; Jakovljevic et al., 2018; Loureiro et al., 2021; Zivanovic et al., 2021) e sua associação com a reabsorção óssea (Wauquier et al., 2009; Vengerfeldt et al., 2017). Georgiou et al. (2021) ressaltaram a importância do entendimento da relação ROS/RNS nas lesões periapicais, podendo auxiliar futuramente em ferramentas de diagnóstico e terapias antioxidantes.

Sendo assim, é importante compreender como ocorre a expressão local das ROS/RNS e antioxidantes ao longo tempo e seu efeito na formação das lesões periapicais. No entanto, nenhum trabalho se concentrou em caracterizar e entender a expressão local das enzimas redox durante a gênese e o desenvolvimento da lesão periapical.

PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a atividade redox por meio da participação de enzimas oxidantes e antioxidantes na formação e desenvolvimento

de lesões periapicais induzidas em camundongos *wild-type* (WT).

Objetivos Específicos

- Descrever as características do conteúdo do canal radicular e das regiões apical e periapical nos cortes corados em hematoxilina e eosina (HE), por meio da microscopia convencional.
- Realizar a histomorfometria para mensuração das áreas correspondentes às lesões periapicais por microscopia convencional no modo de fluorescente.
- Avaliar a marcação imuno-histoquímica para as enzimas oxidantes mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintase (iNOS) e antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT).
- Relacionar as características da região apical /periapical e a expressão dos marcadores oxidantes/antioxidantes.
- Correlacionar o tamanho da lesão periapical e a expressão dos marcadores oxidantes/antioxidantes.
- Avaliar a participação das enzimas oxidantes (MPO e iNOS) e antioxidantes (SOD, GR, CAT) por meio de qRT-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

O número de animais foi definido com o auxílio do cálculo amostral. O projeto foi submetido à apreciação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade de São Paulo tendo sido aprovado (Processo nº 0009/2021 - ANEXO). Todos os procedimentos realizados nos animais foram conduzidos de acordo com o guia ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) para estudos em animais (Kilkenny et al., 2010; Percie du Sert et al., 2020) e guia PRIASE 2021 para estudos em Endodontia (Nagendrababu et al., 2021). Os cuidados com o bem-estar dos animais seguiram as normas e princípios éticos adotados pela CEUA/FORP-USP e as Resoluções Normativas do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal (CONCEA), regulamentadas pela Constituição Federal Brasileira na Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

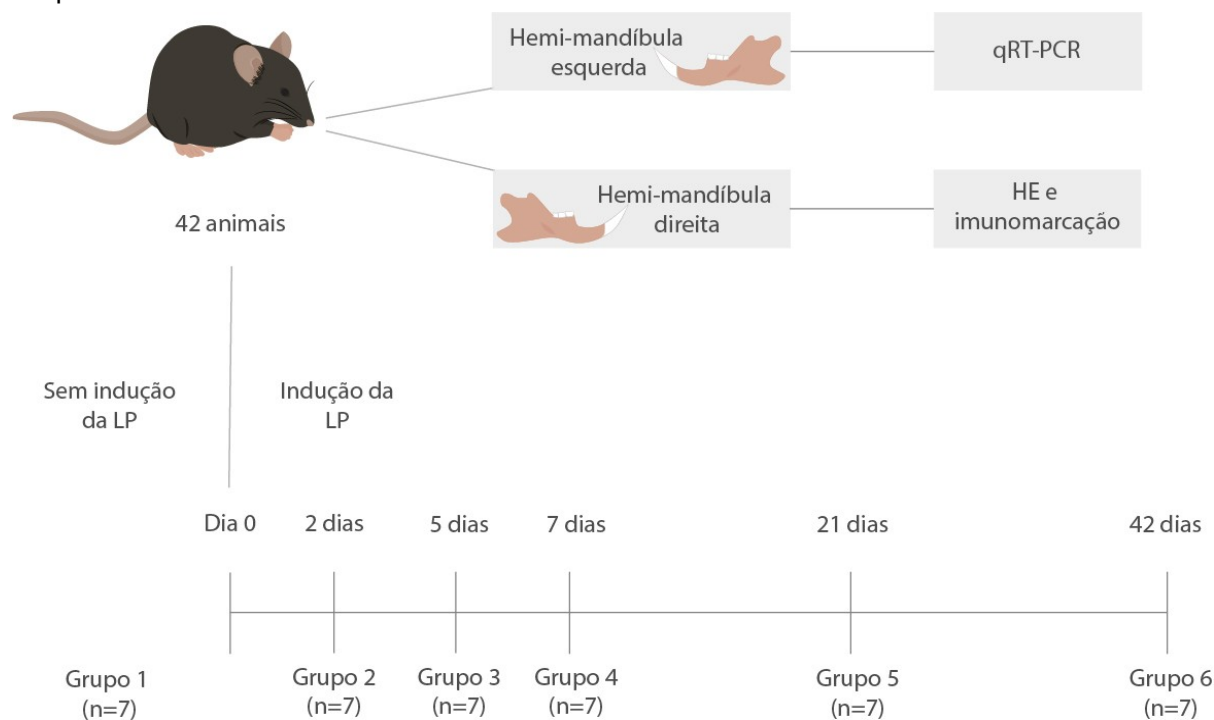
Obtenção das amostras

Procedimentos Operatórios

Foram utilizados 42 camundongos *wild-type* (WT) machos que apresentavam como *background* a linhagem C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 20 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério I da FORP/USP com ração padrão e livre acesso à água. Para cada período experimental de 0, 2, 5, 7, 21 e 42 dias foram utilizados 7 animais para todas as análises. Enquanto no período experimental inicial (dia 0) os dentes estavam hígidos (sem indução de lesão periapical), nos períodos subsequentes (2, 5, 7, 21 e 42 dias) todos os animais tiveram lesão periapical induzida.

A Figura 3 demonstra a divisão dos grupos utilizados, bem como períodos experimentais, o número de animais e as análises que foram realizadas em cada grupo.

Figura 3. Divisão dos grupos e períodos experimentais, o número de animais para cada grupo e as análises que foram realizadas. LP = lesão periapical. qRT-PCR= reação em cadeia da polimerase em tempo real. HE= hematoxilina e eosina.



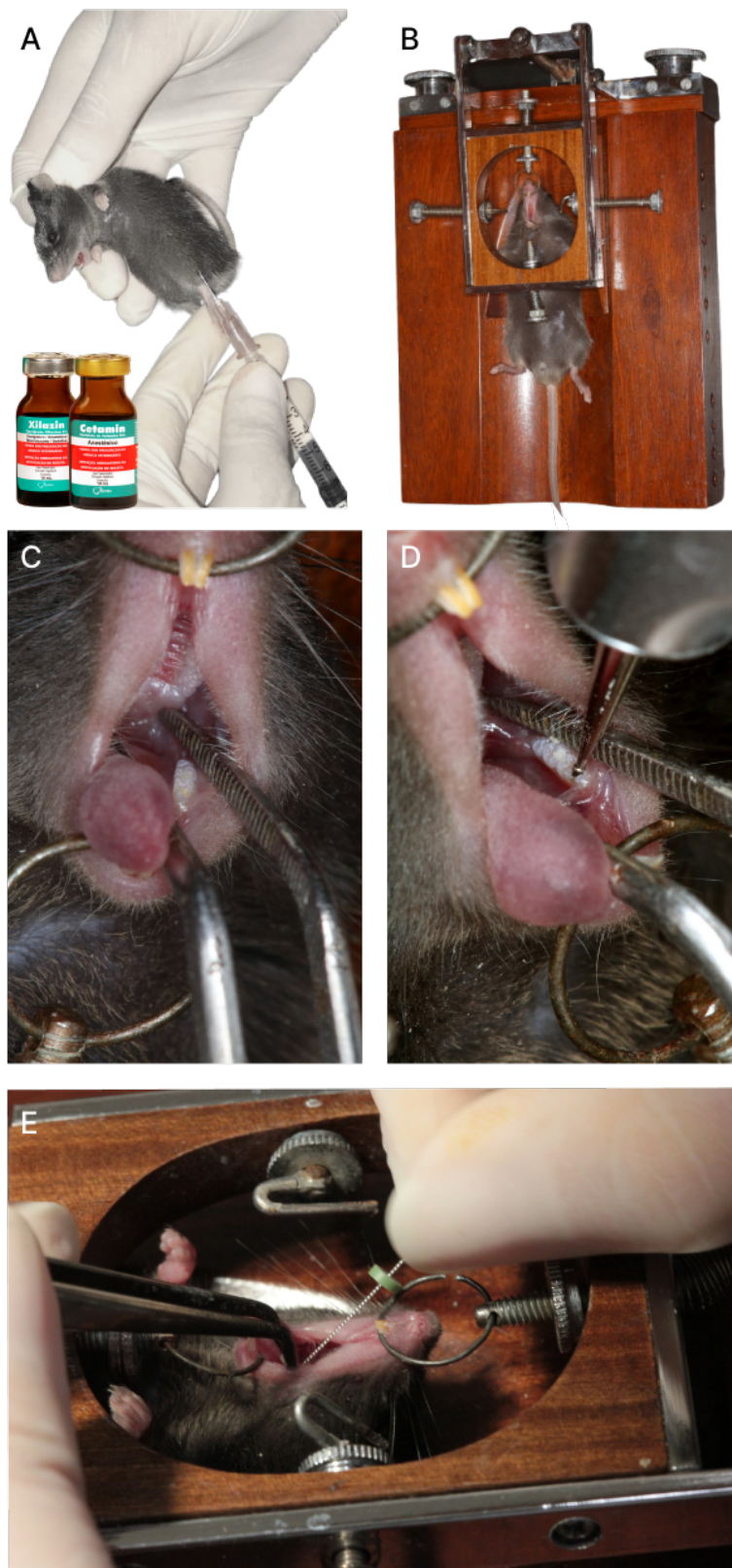
Indução das Lesões Periapicais

A indução de lesão periapical foi realizada em todos os animais dos grupos nos tempos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. A indução foi realizada de acordo com método já empregado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Oliveira et al., 2015; De Rossi et al., 2016; Barreiros et al., 2018; Pucinelli et al., 2022).

Inicialmente, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular na coxa traseira com Ketamina (150 mg/Kg de peso corporal) e Xilazina (7,5 mg/Kg de peso corporal). Em seguida, imobilizados em uma mesa de retração da mandíbula, de forma que permaneceram com a boca aberta para adequada visualização dos molares inferiores (esquerdo e direito). Então foi realizada a abertura coronária com o auxílio de uma broca esférica em baixa rotação (nº ¼ - KG Sorensen, São Paulo, Brasil), montada em motor de baixa rotação e contra-ângulo (Dabi Atlante Equipamentos Odontológicos, Ribeirão Preto, Brasil) para acesso aos canais radiculares. O tecido pulpar dos primeiros molares inferiores foi exposto à cavidade bucal e a polpa radicular foi removida parcialmente com uma lima endodôntica tipo K número 8 (Maillefer S/A, Suíça) como mostra a Figura 4. Os dentes não receberam selamento coronário.

Decorridos os períodos experimentais de 2, 5, 7, 21, e 42 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados em câmara de gás carbônico (CO₂), sendo as mandíbulas dissecadas para o processamento histotécnico e análise por biologia molecular.

Figura 4. Procedimentos para a indução da lesão periapical: (A) Anestesia por injeção intramuscular na coxa traseira com Ketamina e Xilazina; (B) Camundongo imobilizado em uma mesa de retração da mandíbula; (C) Adequada visualização do molar inferior; (D) Abertura coronária com o auxílio de uma broca esférica em baixa rotação montada em motor de baixa rotação e contra-ângulo para acesso aos canais radiculares; (E) Exploração dos canais radiculares e remoção parcial da polpa radicular com uma lima endodôntica tipo K número 8.



Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica

Para a realização da análise microscópica em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE) e imunomarcção foram utilizadas as hemi-mandíbulas direitas dos animais em todos os períodos de avaliação.

Assim, as amostras foram fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por, aproximadamente, 4 horas em água corrente. Em seguida, para a desmineralização, as peças foram mantidas na solução à base de EDTA a 4,13%, à temperatura ambiente, trocada semanalmente, até sua completa desmineralização que ocorreu, em média, após 30 dias. O grau de desmineralização das estruturas mineralizadas foi testado por meio da penetração de uma agulha nos tecidos, para verificação da sua consistência. Após a desmineralização, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70%, 80%, 95% por 45 minutos cada; 2 trocas de 100% por 45 minutos cada e 1 troca de álcool 100% pernoite), diafanizadas em xilol (3 banhos de 40 minutos) e incluídas em parafina.

Os blocos contendo os dentes foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) no sentido méso-distal. Cortes seriados de 4µm foram obtidos em toda a extensão da lesão periapical. Por amostra, foram obtidas de 5 a 15 lâminas, com 3 cortes em cada lâmina. O processamento histotécnico está esquematizado na Figura 5.

Figura 5. Fluxograma ilustrando o processamento histotécnico.



Os cortes de cada grupo experimental e controle foram corados com HE e submetidos à análise em microscopia óptica convencional para descrição do conteúdo do canal radicular e das regiões apical e periapical. Assim, foram

selecionados os cortes que apresentaram a raiz distal dos primeiros molares inferiores mostrando simultaneamente os terços coronário, médio e apical do canal radicular, o forame apical e o osso alveolar. Essa análise objetivou uma descrição dos aspectos microscópicos envolvidos no desenvolvimento da lesão periapical. Além disso, esses cortes tiveram função metodológica, uma vez que os cortes utilizados para a imunomarcação foram escolhidos após análise dos cortes corados com HE.

Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical

A partir dessa avaliação se obtém uma visão panorâmica de todo o processo da doença, permitindo fazer possíveis correlações com os resultados obtidos na imuno-histoquímica. Para essa análise, foi utilizado o microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) e realizada por um único avaliador experiente, sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado. As características das regiões apicais e periapicais de cada grupo foram descritas e classificadas em escores para os parâmetros avaliados.

- Tecido pulpar: tecido com aspecto de normalidade (Escore 0); alteração suave do tecido (necrose parcial) (Escore 1); necrose moderada no tecido (Escore 2) e necrose severa (necrose total da polpa) (Escore 3).
- Infiltrado inflamatório na região periapical: ausência de infiltrado inflamatório (Escore 0); presença de infiltrado suave (Escore 1); presença de infiltrado moderado (Escore 2) e presença de infiltrado severo (Escore 3).
- Espessura do ligamento periodontal apical: ligamento com aspecto de normalidade (Escore 0); presença de aumento suave no ligamento (Escore 1); presença de aumento moderado do ligamento (Escore 2) e presença de aumento severa do ligamento periodontal (Escore 3).
- Osso alveolar: ausência de reabsorção (Escore 0); presença de reabsorção (Escore 1).
- Cimento apical: ausência de reabsorção (Escore 0); presença de reabsorção (Escore 1).

Morfometria em Microscopia de Fluorescência

Foi realizada a avaliação morfométrica das lesões periapicais nos espécimes corados com HE, de acordo com De Rossi et al. (2005). Para tal, foi utilizado o microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 10x, no modo fluorescente, com filtro Alexa Fluor 488 (AF488, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) e com as seguintes especificações: excitação de G365, refletores FT395 e emissão LP420. As imagens foram transferidas para o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, EUA), onde as áreas das lesões periapicais foram delineadas e medidas em mm². A delimitação da lesão excluiu as estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar), facilmente identificadas pela forte fluorescência verde, e incluiu áreas de reabsorção, dissociação fibrilar e infiltrado inflamatório, identificadas pela ausência de fluorescência e aparência escurecida.

Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas por meio da técnica da imunoperoxidase para marcação da mieloperoxidase, óxido nítrico sintase, superóxido dismutase, glutathione redutase e catalase.

Os cortes histológicos foram desparafinizados, sendo os epítomos antigênicos recuperados com calor utilizando tampão citrato (pH=6,0) ativado em forno de micro-ondas (cinco vezes de 10 segundos). Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 2 vezes por 10 minutos com PBS e 1 vez com solução PBS/Triton a 0,5% (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA), pelo mesmo período. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas com PBS e PBS/Triton conforme descrito anteriormente.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução de 1% BSA (albumina de soro bovino)/PBS, por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas overnight em geladeira com os anticorpos primários (Quadro 1) diluídos em BSA 1%. Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário biotilado adequado, por 1 hora à temperatura ambiente. Depois de nova lavagem, foi colocado o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit, Vecstain; Vector Laboratories Inc.) por 30 minutos. A

seguir, as lâminas foram lavadas com PBS e PBS/Triton e foi efetuada a revelação da reação com solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) e H₂O₂ a 3% em PBS por 1 minuto. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, lavadas em água corrente, lavadas em água amoniacal por 30 segundos, lavadas em água corrente, diafanizadas, desidratadas e montadas. A análise foi realizada por um único avaliador experiente, previamente calibrado ($Kappa > 0,9$) e sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado utilizando um microscópio Axio Imager. M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) sob luz convencional. Os resultados foram expressos de maneira qualitativa, levando-se em consideração a presença/ausência e a localização das marcações.

Quadro 1. Anticorpos utilizados e suas respectivas diluições e especificações nas reações de imunohistoquímica.

Anti-corpo	Diluição	Empresa (n° catálogo)
Anti-iNOS	1:800	ABclonal (A0312)
Anti-SOD1	1:200	ABclonal (A0274)
Anti-Catalase	1:100	Bioss (bs-6874R)
Anti-GLUR	1:50	Bioss (bs-0837R)
Anti-Mieloperoxidase	1:4000	ABclonal (A1374)

Expressão Gênica - Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

Foram utilizadas as hemi-mandíbulas esquerdas de todos os animais em todos os períodos.

Extração de RNA total

As hemi-arcadas foram submetidas à extração de RNA usando o protocolo do fabricante do kit PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A quantidade de RNA extraído foi estimada com o auxílio do NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE).

Síntese de cDNA

A partir de 1µg de RNA total foi confeccionada a fita de DNA complementar (cDNA) por uma reação de transcrição reversa, baseado no protocolo proposto pelo fabricante do kit High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA).

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

A reação de amplificação de cada gene foi constituída por primers específicos de cDNA, sonda fluorescente específica, o sistema de fluorescência TaqMan (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, EUA), e reagente MasterMix (Applied Biosystems). A expressão de genes gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Gapdh) e β-actina (Actb) foi analisada como genes constitutivos (housekeeping). Com esta técnica, foi avaliada a expressão de RNAm de MPO, iNOS, SOD, GR e CAT (Quadro 2).

Quadro 2. Descrição dos genes utilizados para a *reação em cadeia da polimerase em tempo real*.

Função do gene	Símbolo	Nome do gene	Assay ID
Formação de ROS e RNS	MPO	Mpo	Mm 01298424_m1
	iNOS	Nos2	Mm 00440502_m1
Produção de antioxidantes	CAT	Cat	Mm 00437992_m1
	SOD	Sod1	Mm 01344233_g1
	GR	Grs	Mm 00439154_m1
Genes constitutivos	ACTB	Actb	Mm 02619580_g1
	GAPDH	Gapdh	Mm 99999915_g1

A análise quantitativa da expressão de RNAm foi realizada por meio do StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems[®], Foster City, CA, EUA), sob condições de 95°C (2 minutos), seguidas por 40 ciclos de 95°C (1 segundo) e 60°C (20 segundos). As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra. Após a amplificação das amostras, a quantificação relativa foi realizada por meio do método 2-ΔΔCt.

Análise Estatística

As variáveis categóricas, dos valores em escore obtidos na análise descritiva em HE, foram expressas como porcentagem. A comparação da extensão da área da lesão periapical entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e dos resultados da imuno-histoquímica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e de Mann-Whitney, por meio do programa computacional GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

A inferência e os testes de hipótese dos dados da expressão gênica foram realizados através do ANOVA com pós teste utilizando contrastes ortogonais assumindo e considerando a normalidade dos resíduos, para este caso foi utilizado o software SAS/STAT® em sua versão online (Van Rossum e Drake, 2013; Montgomery, 2017). O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar o grau de correlação entre a expressão de genes e o tamanho da lesão periapical. A intensidade das correlações positivas e negativas foi definida de acordo com o valor do "Coeficiente de correlação (r)" (1: perfeito; 0,7 a 0,9: forte; 0,4 a 0,6 moderado; 0,1 a 0,3: fraco; 0: sem correlação). O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%.

RESULTADOS

Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical

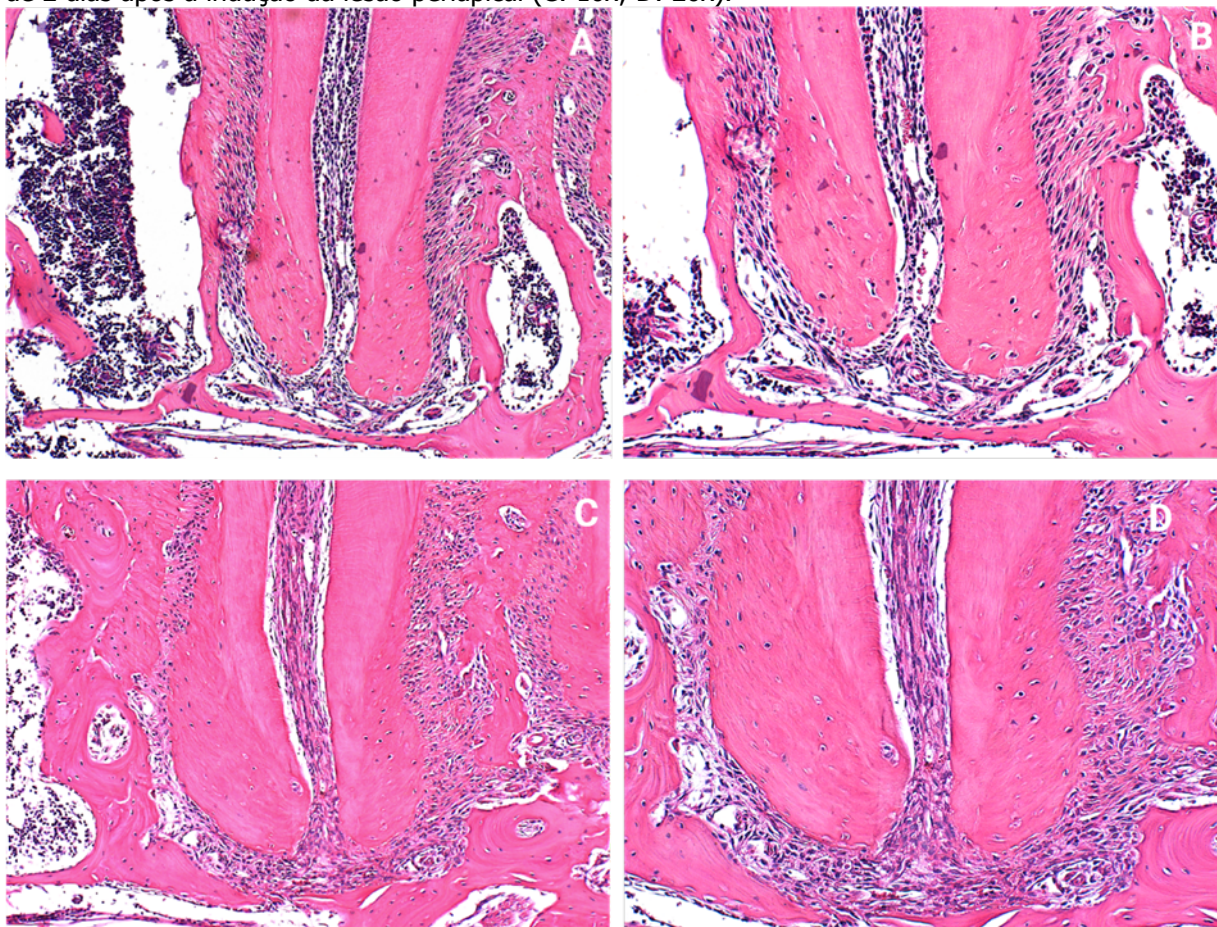
No grupo controle, sem indução de lesão periapical, foi observado tecido pulpar sadio, com tecido conjuntivo normal, camada odontoblástica íntegra e ausência de infiltrado inflamatório (100%); o ligamento periodontal se encontrava com aspecto de normalidade, com presença de fibras e células organizadas (100%).

Além disso, a superfície cementária e osso alveolar estavam regulares e íntegros (100%) (Figura 6A e 6B).

Após 2 dias da indução da lesão periapical, o tecido pulpar se mostrava alterado, já com necrose parcial (100%) e infiltrado inflamatório de suave a moderado. O ligamento periodontal apresentava espessura normal, com infiltrado inflamatório suave (100%). O osso alveolar normal apresentando osteoblastos na sua superfície (100%) e a superfície cementária regular com ausência de reabsorções (100%) (Figura 6C e 6D).

Figura 6. Fotomicrografias representativas da análise descritiva das regiões apical e periapical das

lâminas coradas com HE do Grupo Controle (dente hígido) (A: 10x; B: 20x) e do período experimental de 2 dias após a indução da lesão periapical (C: 10x; D: 20x).



No grupo de 5 dias, o tecido pulpar se encontrava alterado, com necrose parcial (100%), com infiltrado inflamatório de moderado para severo. O ligamento periodontal estava normal (57,14%) e suavemente aumentado (42,86%), com infiltrado inflamatório suave no periápice (100%). O osso alveolar e a superfície cementária estavam regulares, com ausência de reabsorções (100%) (Figura 7).

No período de 7 dias, o tecido pulpar já se encontrava totalmente necrosado, com ausência da camada odontoblástica (100%) e infiltrado inflamatório severo na polpa. A lesão periapical progrediu, apresentando ligamento periodontal suavemente (42,86%) e moderadamente (57,14%) aumentado, com infiltrado inflamatório misto predominantemente crônico de suave (28,57%) a moderado (71,43%). O osso alveolar se apresentava normal e com osteoblastos em sua superfície. A superfície cementária era regular e sem reabsorção em todos os espécimes (Figura 8).

Figura 7. Fotomicrografias representativas da análise descritiva das regiões apical e periapical das lâminas coradas em HE no período experimental de 5 dias (A: 10x; B: 20x; C: 40x).

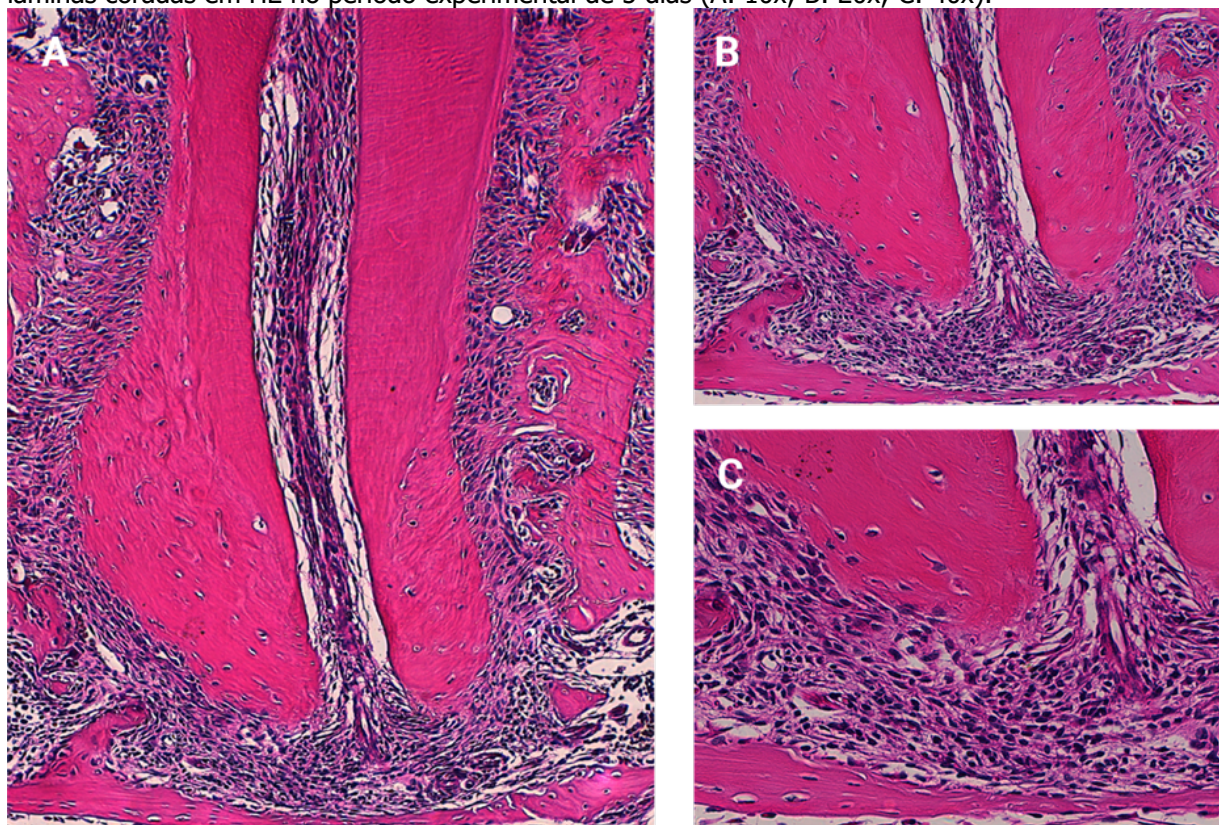
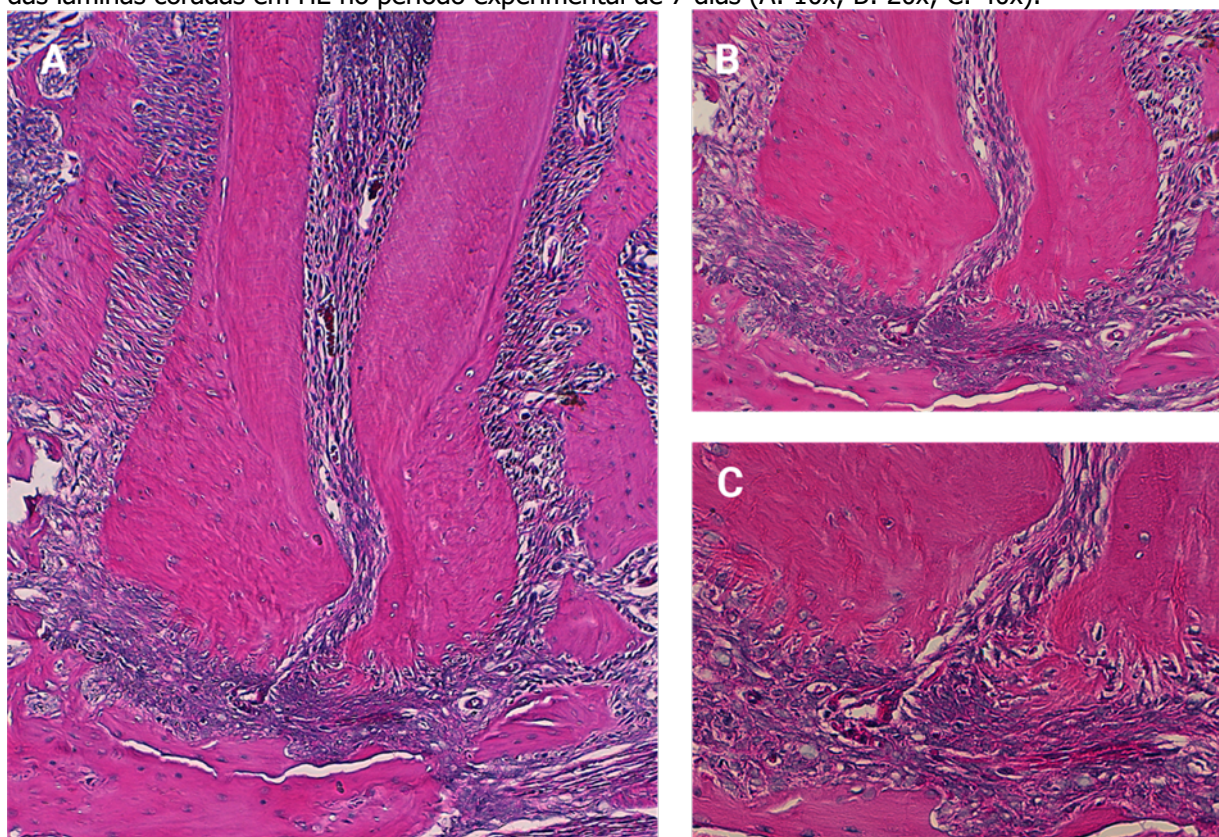
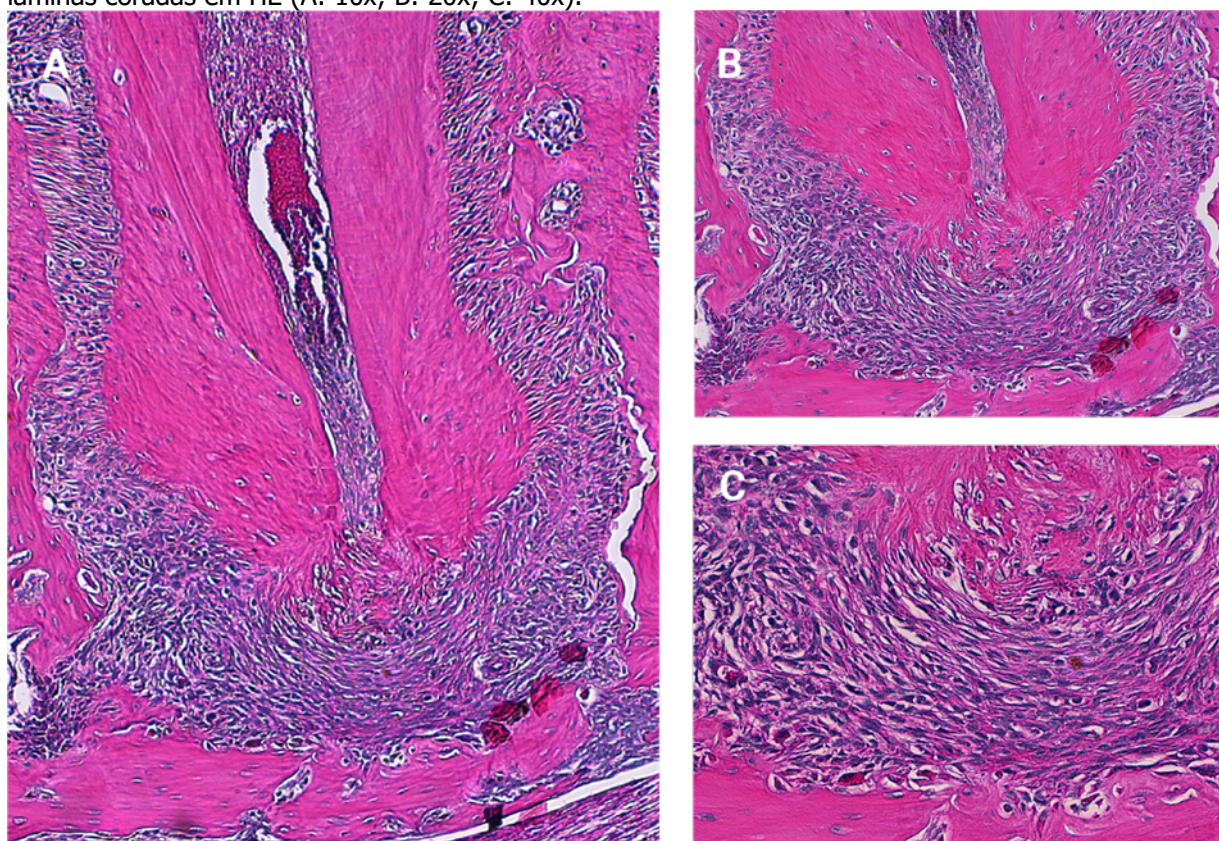


Figura 8. Fotomicrografias representativas da análise descritiva das regiões apical e periapical das lâminas coradas em HE no período experimental de 7 dias (A: 10x; B: 20x; C: 40x).



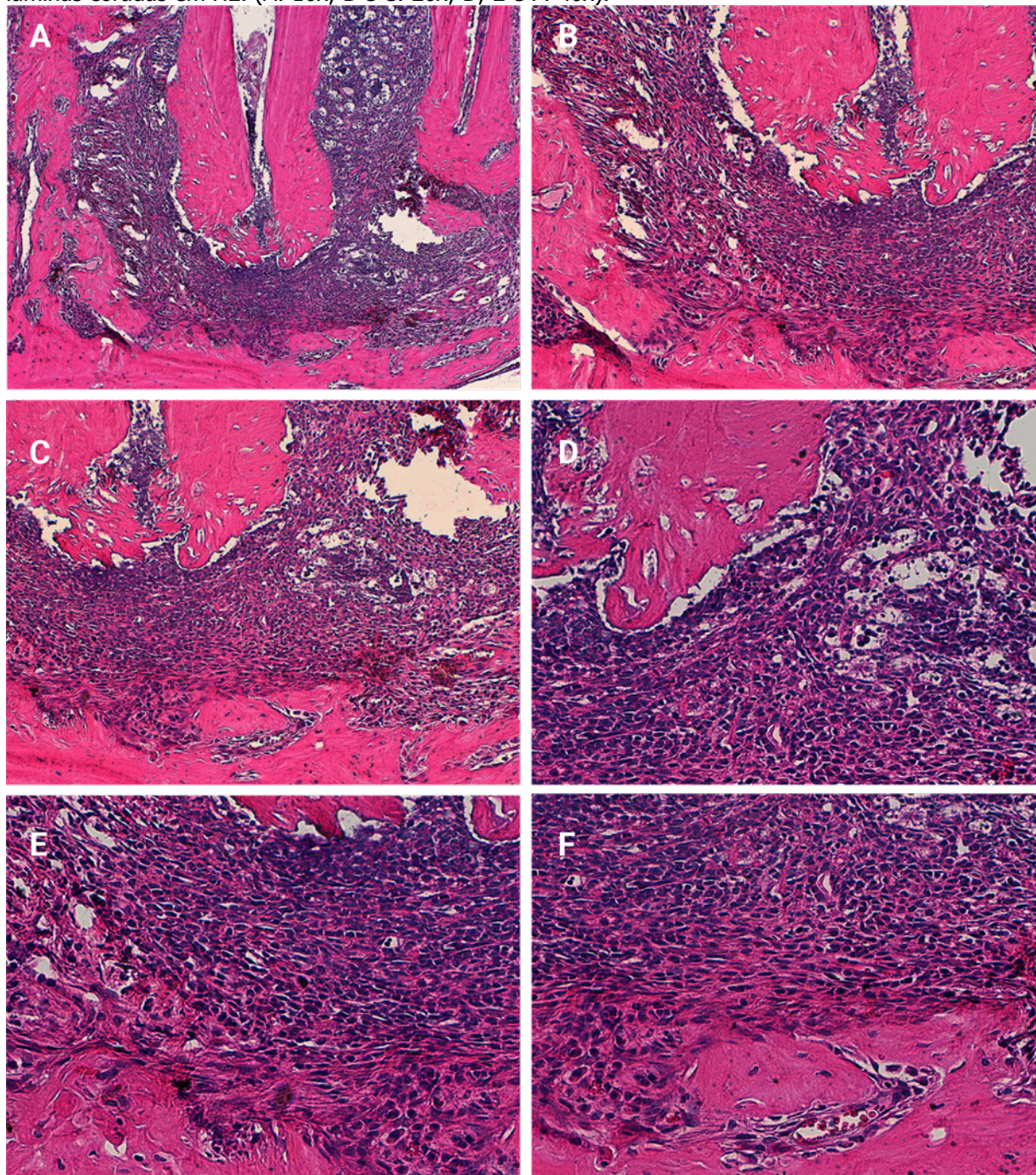
Aos 21 dias, havia necrose total do tecido pulpar (100%), com infiltrado inflamatório severo. O ligamento periodontal se encontrava moderadamente (28,57%) ou severamente (71,43%) aumentado, com infiltrado inflamatório, também variando de moderado (57,14%) a severo (42,86%). O osso alveolar estava irregular e com presença de reabsorção, sendo visível muitos osteoclastos e ausência de osteoblastos em todos os espécimes do grupo. Porém, a superfície cementária se encontrava regular e sem reabsorção (Figura 9).

Figura 9. Fotomicrografias representativas do período experimental de 21 dias, evidenciando as características microscópicas observadas na análise descritiva das regiões apical e periapical das lâminas coradas em HE (A: 10x; B: 20x; C: 40x).



Após 42 dias, todos os espécimes apresentavam o tecido pulpar totalmente necrosado, com infiltrado inflamatório severo. A persistência e manutenção do processo inflamatório na região periapical se apresentou em estágio mais avançado, apresentando o ligamento periodontal severamente aumentado, com infiltrado inflamatório também severo (100%). Além disso, havia áreas extensas de reabsorção da superfície cementária e do osso alveolar (100%). O osso alveolar já estava desintegrado, com ausência da lâmina dura (100%) (Figura 10).

Figura 10. Fotomicrografias representativas do período experimental de 42 dias, evidenciando as características microscópicas observadas na análise descritiva das regiões apical e periapical das lâminas coradas em HE. (A: 10x; B e C: 20x; D, E e F: 40x).



De uma maneira geral, após a análise microscópica descritiva nos diferentes períodos experimentais avaliados após abertura coronária e indução da lesão periapical, pode-se observar:

- Necrose parcial do tecido pulpar nos períodos iniciais (2 e 5 dias) e necrose total do tecido pulpar após 7 dias.
- Aumento progressivo do espaço do ligamento periodontal, desde normal aos 2

- dias até severamente aumentado aos 42 dias.
- Aumento progressivo da intensidade do infiltrado inflamatório na região periapical, desde leve aos 2 dias até severo aos 42 dias.
 - Presença de reabsorção óssea a partir do período de 21 dias.
 - Presença de reabsorção cementária somente no período de 42 dias.

Morfometria em Microscopia de Fluorescência

A análise morfométrica da extensão das lesões periapicais (área em mm^2) foi realizada nas lâminas coradas em HE por meio da microscopia de fluorescência.

No Grupo 1, correspondente ao dente hígido sem e abertura e coronária e indução de lesão periapical, a área avaliada correspondeu ao ligamento periodontal sadio o qual apresentou valor médio de $0,03 \text{ mm}^2$. Nos demais grupos com indução da lesão periapical, a média do tamanho das lesões foi progressivamente maior, de $0,04 \text{ mm}^2$ para o Grupo 2 (2 dias), $0,06 \text{ mm}^2$ para o grupo 3 (5 dias), $0,09 \text{ mm}^2$ para o grupo 4 (7 dias), $0,14 \text{ mm}^2$ para o grupo 5 (21 dias) e para o grupo de 42 dias (grupo 6) foi de $0,22 \text{ mm}^2$. A Tabela 1 apresenta os valores máximos e mínimos, a média em mm^2 , e o desvio padrão dos grupos após análise morfométrica da extensão das lesões periapicais.

Tabela 1. Resultados obtidos na análise morfométrica das áreas das lesões periapicais em mm^2 , nos diferentes grupos experimentais.

Grupo	Mínima	Máxima	Média	Desvio Padrão
Grupo I	0,03	0,04	0,03	0,00
Grupo II	0,03	0,05	0,04	0,01
Grupo III	0,04	0,09	0,06	0,02
Grupo IV	0,07	0,12	0,09	0,02
Grupo V	0,10	0,22	0,14	0,04
Grupo VI	0,17	0,28	0,22	0,04

Ao comparar com o grupo controle, houve aumento significativo da área da lesão periapical aos 5 dias ($p=0,01$), 7, 21 e 42 dias ($p\leq 0,0001$) (Figura 11). A comparação entre os períodos experimentais mostrou que os grupos de 21 e 42 dias apresentaram maior área da lesão periapical, com diferença significativa de todos os demais grupos ($p<0,0001$). Entretanto, a lesão periapical aos 42 dias foi significativamente maior em relação aos 21 dias ($p<0,0001$). A Figura 12 apresenta fotomicrografias de cortes microscópicos representativos da mensuração das lesões periapicais.

Figura 11. Boxplot da comparação entre o grupo controle e os períodos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias com relação à extensão das lesões periapicais. Diferença estatisticamente significativa entre o controle e os dias 5, 7, 21 e 42 (*) ($p<0,05$) e entre 21 e 42 dias (#) ($p<0,0001$).

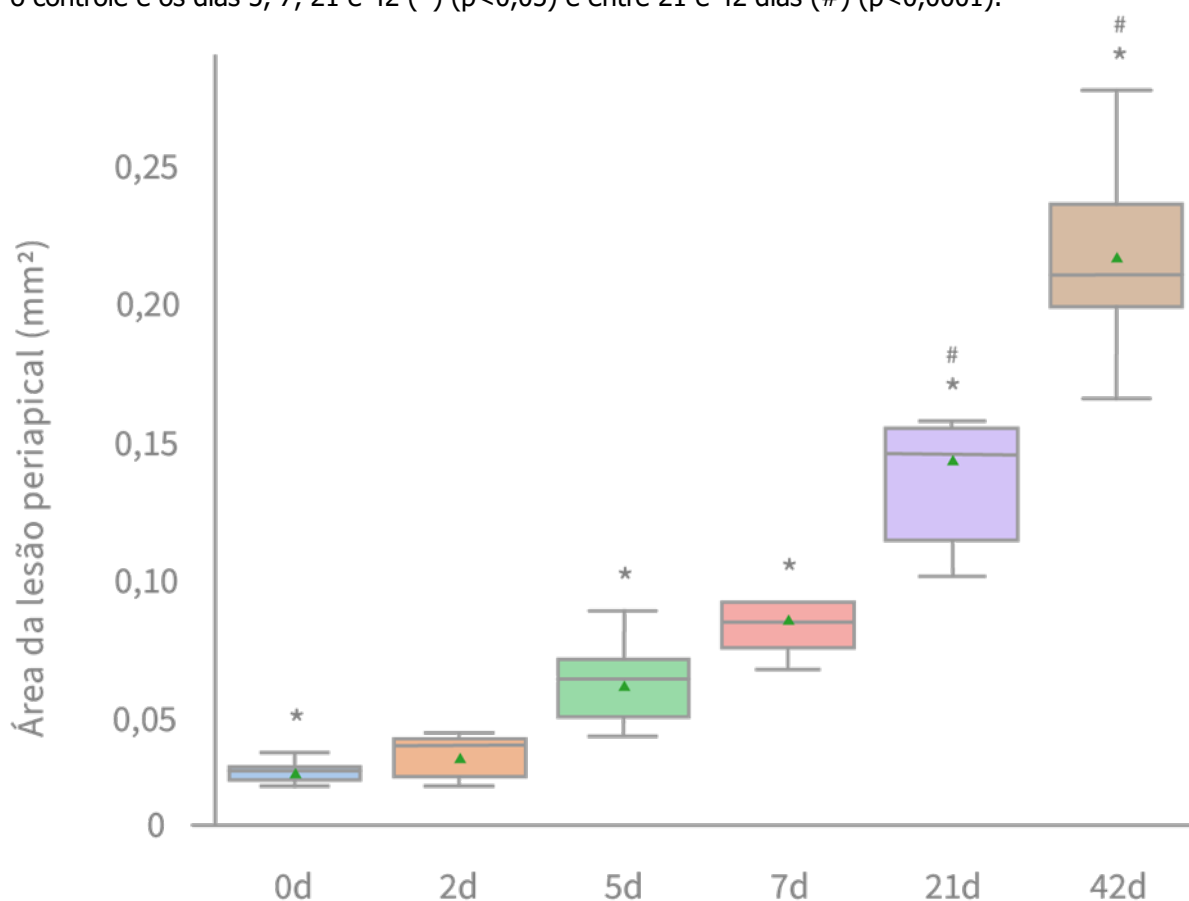
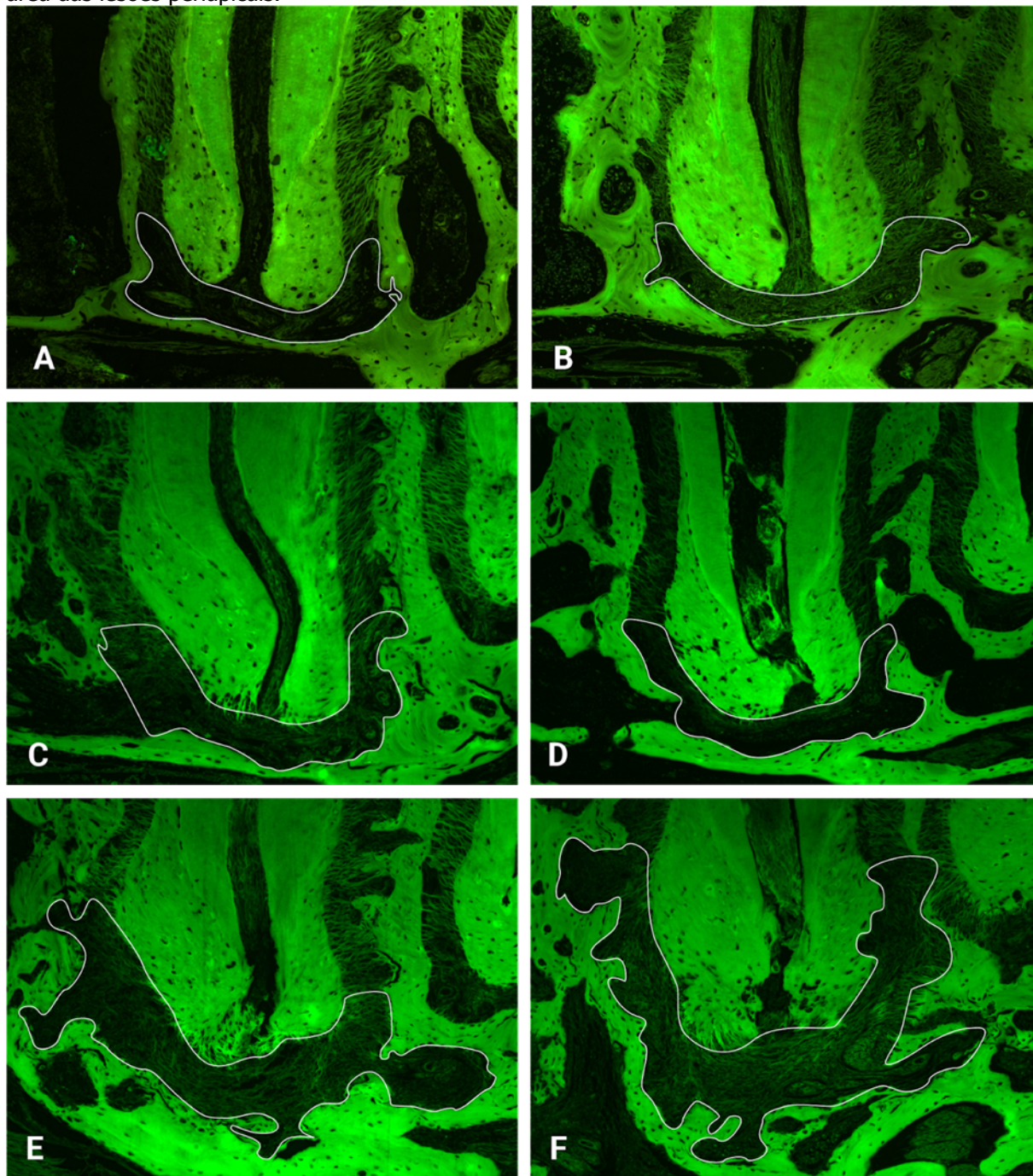


Figura 12. Fotomicrografias representativas dos diferentes períodos experimentais de lâminas coradas com hematoxilina e eosina e observadas em microscopia de fluorescência para mensuração da área das lesões periapicais.



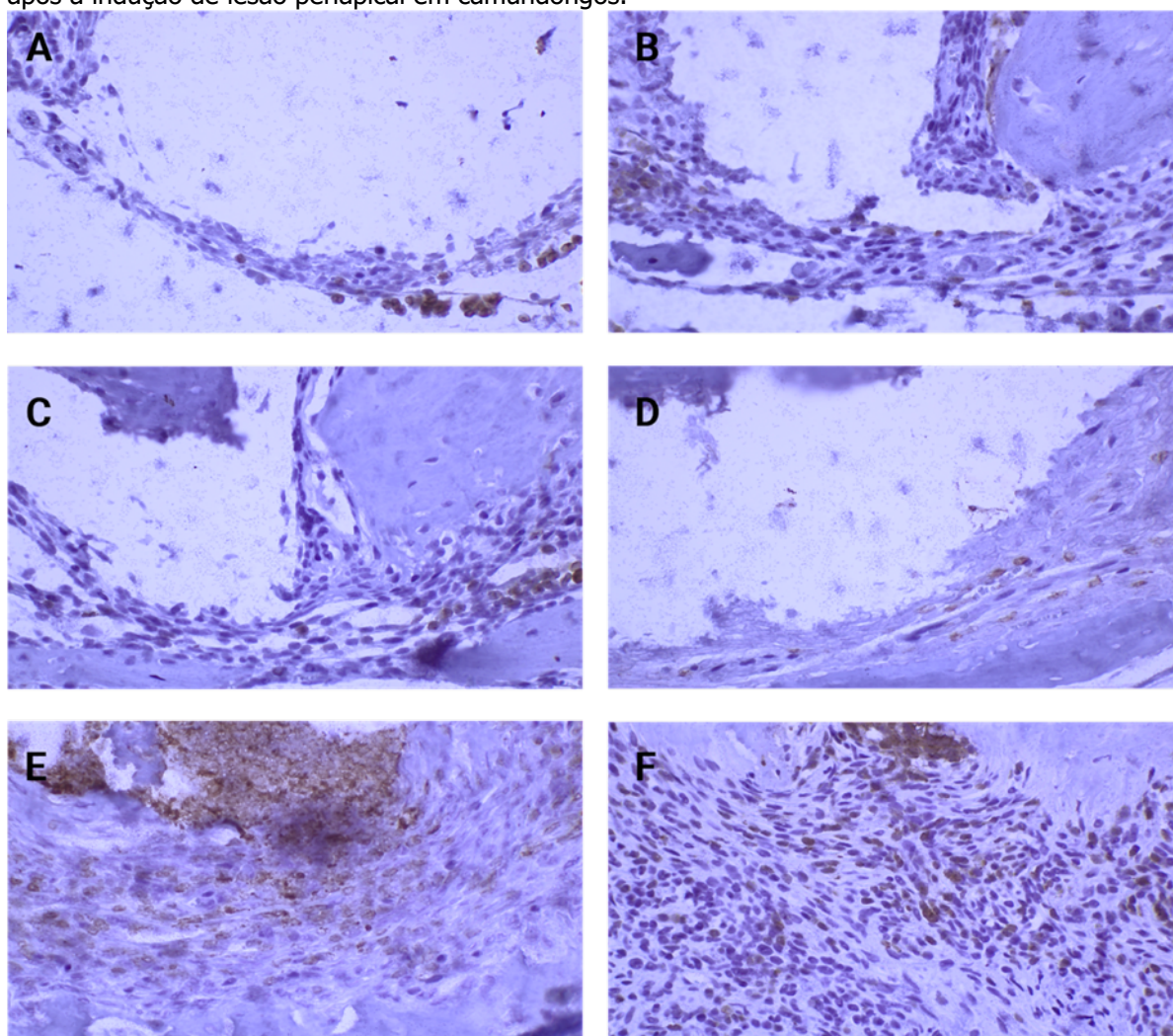
Imuno-histoquímica

A análise qualitativa dos resultados obtidos após a imunomarcção das enzimas oxidantes (MPO, iNOS) e antioxidantes (CAT, GR e SOD) estão descritos a seguir.

Mieloperoxidase (MPO)

Nos grupos Controle, 2, 5 e 7 dias após a indução periapical, foi observado marcação leve pontuais no ligamento periodontal (Figuras 13A-D). Já aos 21 e 42 dias, a marcação foi moderada na região do forame apical e dispersa pela lesão periapical (Figuras 13E e 13F). Os grupos de 21 e 42 dias apresentaram maior marcação dessa enzima, com diferença estatisticamente significativa em comparação com os demais grupos ($p= 0,001$).

Figura 13. Fotomicrografias representativas após imunomarcação com anticorpo anti-mieloperoxidase de amostras provenientes do grupo controle (dente hígido – A) e dos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.

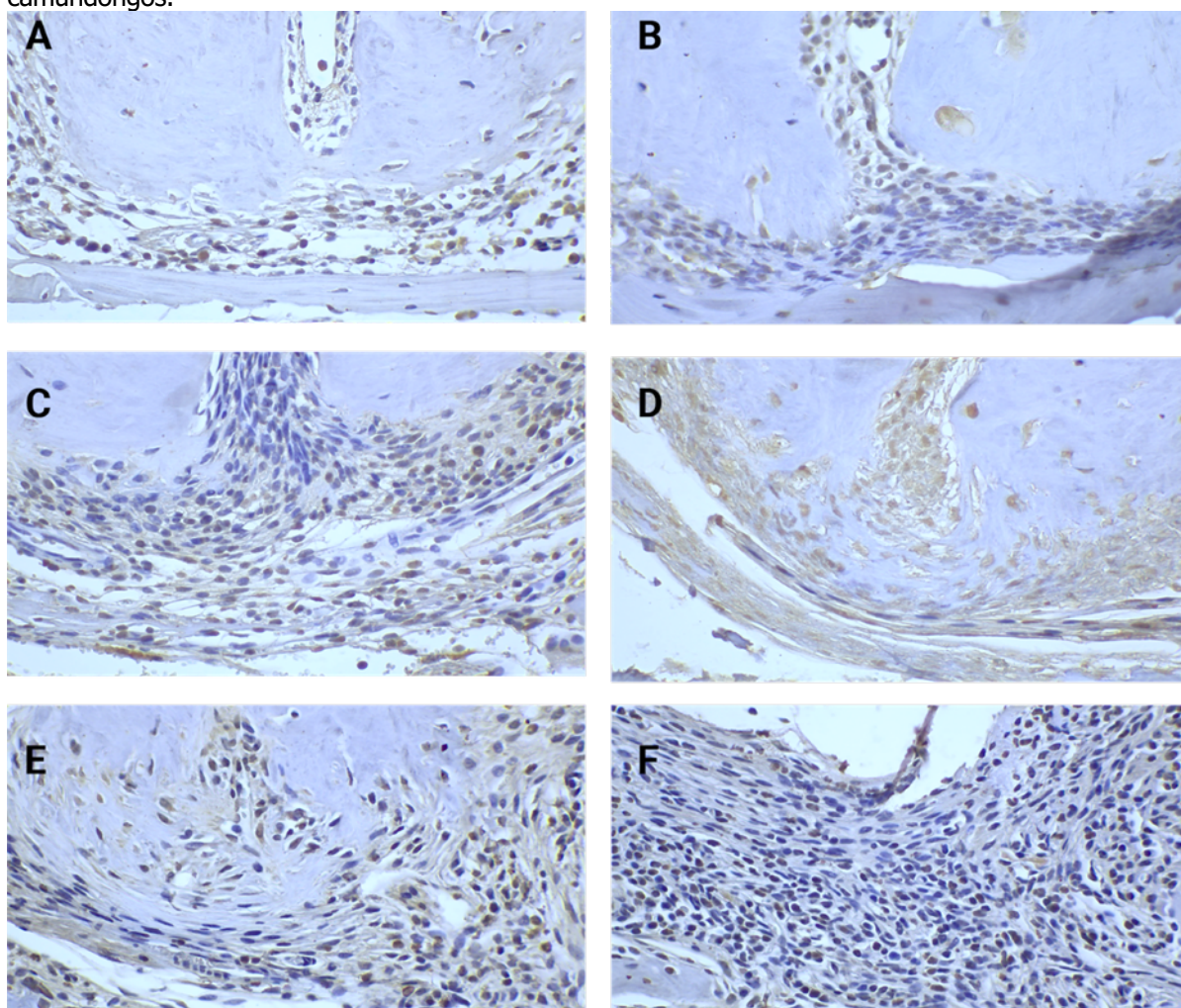


Óxido Nítrico Sintase e (iNOS)

Os grupos Controle e 2 dias apresentaram marcação de leve a moderada no terço apical do canal radicular e ao longo do ligamento periodontal (Figuras 14A e

14B). Após 5 dias da indução da lesão periapical, observou-se marcação leve a severa de iNOS próximo ao forame apical, no ligamento periodontal e próximo ao osso alveolar (Figura 14C). No período de 7 dias, as células foram marcadas positivamente de forma leve a moderada no ligamento periodontal e próximo ao osso alveolar (Figura 14D). Já nos períodos de 21 e 42 dias, observou-se marcação de moderada a severa na lesão periapical (Figuras 14E e 14F). Quando comparados os grupos dois a dois pelo teste de Mann Whitney, o período do dia 5 apresentou diferença estatística significativa do grupo de 2 ($p=0,05$) e 7 dias ($p=0,01$) e o grupo de 7 dias foi diferente do de 42 (0,03).

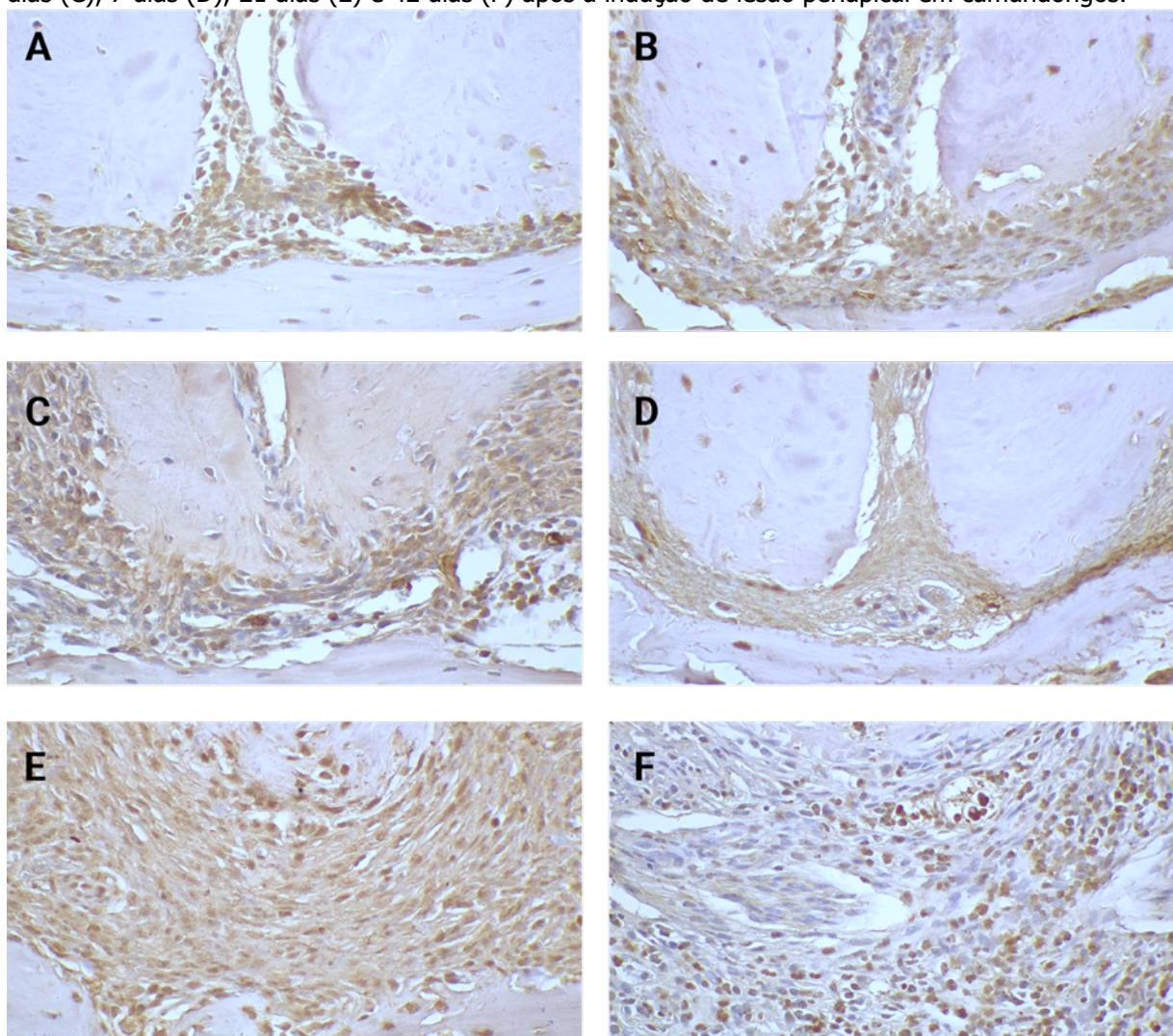
Figura 14. Fotomicrografias representativas após imunomarcacão com anticorpo anti-óxido nítrico sintase no grupo controle (dente hígido – A) e nos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F), após a indução de lesão periapical em camundongos.



Catalase (CAT)

Nos grupos Grupo Controle, 2, 5 e 7 dias, pode-se observar marcação moderada a severa no terço apical do canal radicular e no ligamento periodontal do período controle (Figuras 15A-D). As amostras do período de 21 e 42 dias apresentaram-se moderada e severa, com marcações mais severas na lesão (Figuras 15E e 15F). Entretanto, sem diferenças estatísticas entre os períodos, pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p > 0,05$).

Figura 15. Fotomicrografias representativas após imunomarcação com anticorpo anti-catalase no grupo controle (dente hígido – A) e nos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.

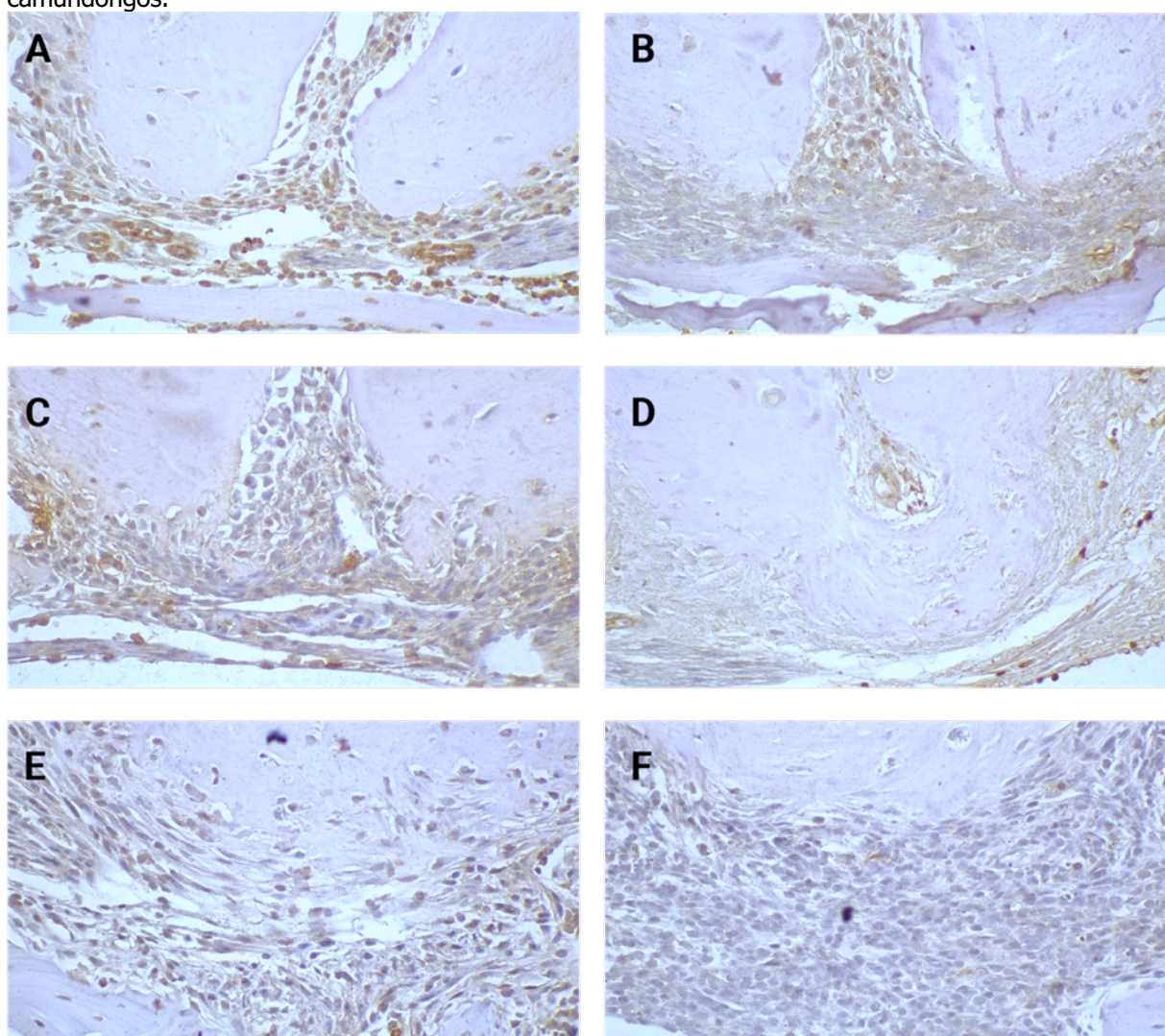


Superóxido Dismutase (SOD)

Os grupos Controle e 2 dias apresentaram marcação leve predominante, com algumas marcações moderadas no terço apical do canal radicular e no ligamento

periodontal (Figuras 16A e 16B). Aos 5 e 7 dias, observou-se marcação leve a moderada no terço apical do canal radicular e na região apical e periodontal (Figuras 16C e 16D). Já aos 21 e 42 dias, foi observado marcação leve em poucas amostras, mas predominante moderada a severa na lesão periapical (Figuras 16E e 16F). Porém, não foi encontrado diferença estatística entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p > 0,05$).

Figura 16. Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo anti-superóxido dismutase no grupo controle (dente hígido – A) e nos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.

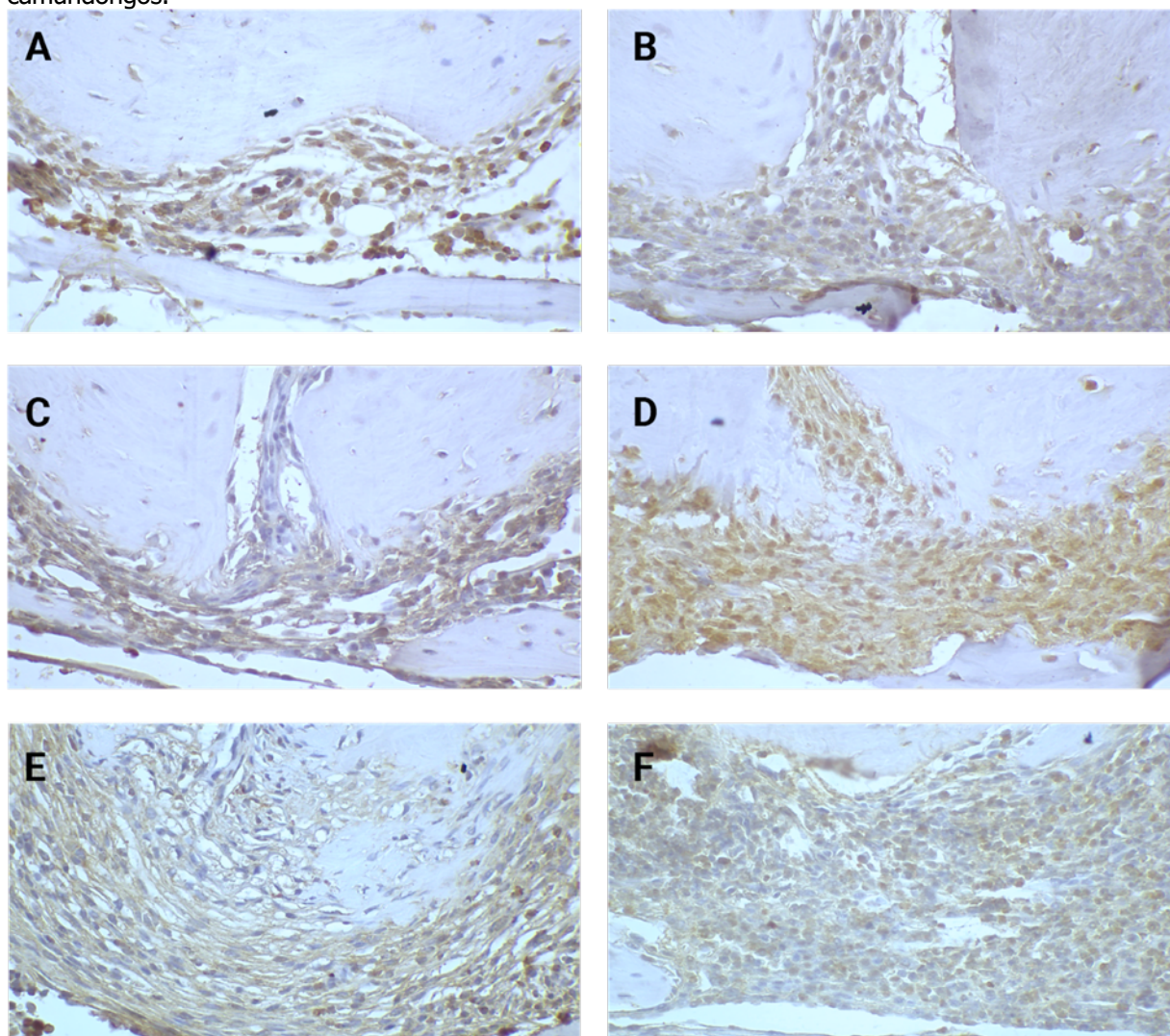


Glutathione Redutase (GR)

Nos grupos controle, 2, 5 e 7 dias após a indução periapical, a marcação foi leve a moderada no terço apical do canal radicular e ligamento periodontal (Figuras 17A-D). Aos 21 e 42 dias, observou-se marcação também leve, mas com

predominância moderada a severa no forame apical e disperso por toda a lesão (Figuras 17E e 17F). Não houve diferença estatística entre os períodos experimentais pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p > 0,05$).

Figura 17. Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo anti-glutationa redutase no grupo controle (dente hígado – A) e nos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.



De uma maneira geral, os resultados obtidos após a realização do ensaio de imuno-histoquímica para enzimas oxidantes (MPO, iNOS) e antioxidantes (CAT, GR e SOD) permitiram evidenciar que:

- Todas as enzimas oxidantes e antioxidantes propostas no presente estudo estiveram presentes em todos os períodos experimentais avaliados.
- A enzima oxidante MPO apresentou imunomarcção preferencialmente leve tanto

- no grupo controle quanto nos períodos de 2, 5, e 7 dias, com aumento na intensidade de marcação nos períodos mais tardios de avaliação (21 e 42 dias).
- A enzima oxidante iNOS apresentou imunomarcação de leve a moderada nos grupos controle e 2 dias, com aumento progressivo na intensidade de marcação nos períodos subsequentes.
 - A enzima antioxidante CAT apresentou imunomarcação de moderada a severa em todos os grupos avaliados, assim como no controle.
 - A enzima antioxidante SOD apresentou imunomarcação leve tanto no grupo controle quanto no período de 2 dias, marcação de leve a moderada nos períodos de 5 e 7 dias, com aumento na intensidade de marcação (moderada a severa) nos períodos mais tardios de avaliação (21 e 42 dias).
 - A enzima antioxidante GR apresentou imunomarcação leve nos grupos controle e 2, 5 e 7 dias, com aumento da intensidade da marcação (moderada a severa) nos períodos mais tardios de avaliação (21 e 42 dias).

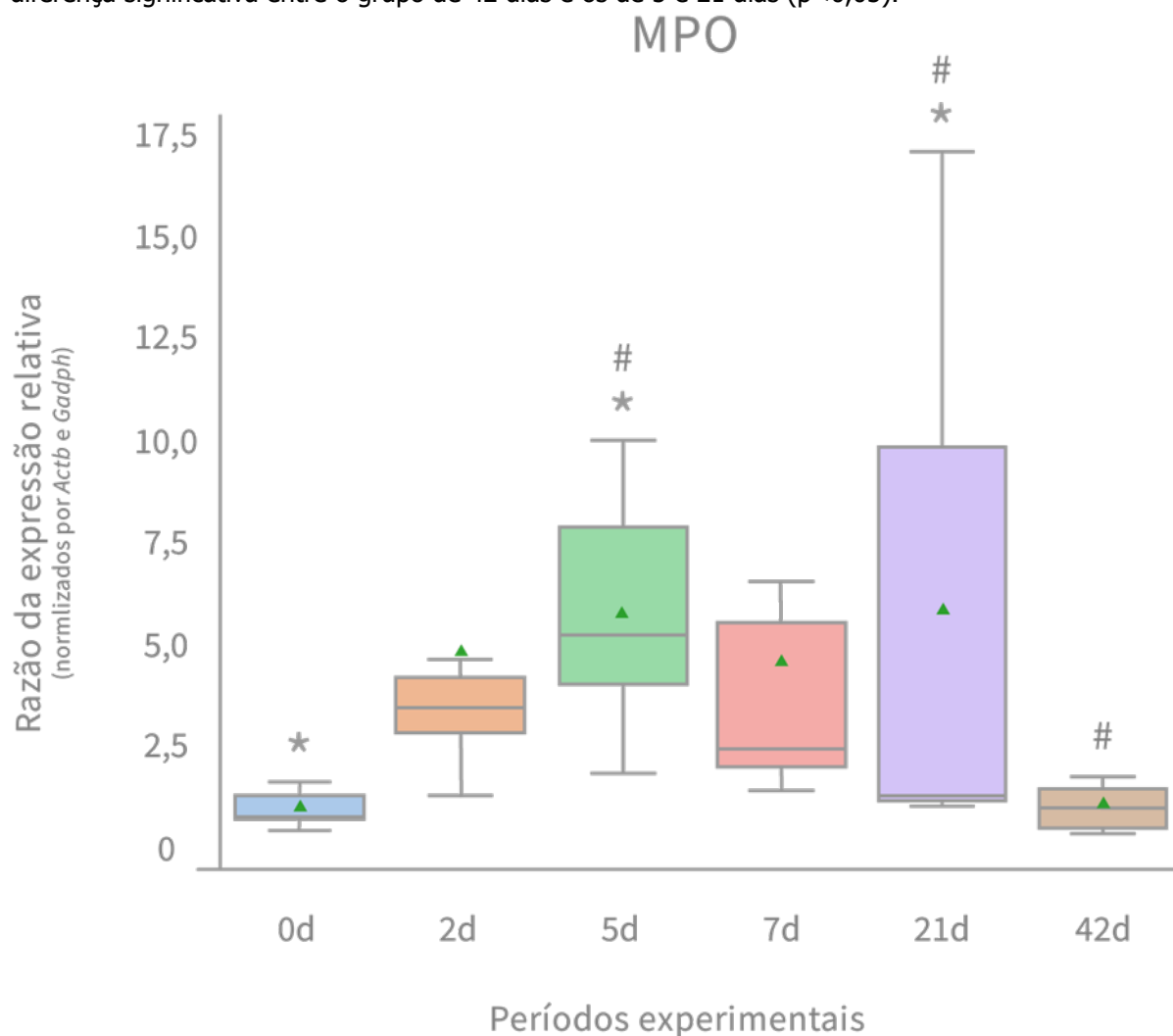
Expressão Gênica - qRT-PCR

Com o objetivo de avaliar a expressão das enzimas oxidantes e antioxidantes em função do tempo, foram coletadas amostras nos tempos 0 dias (controle), 2, 5, 7, 21 e 42 dias, para análise por PCR em tempo real.

Marcadores Oxidantes

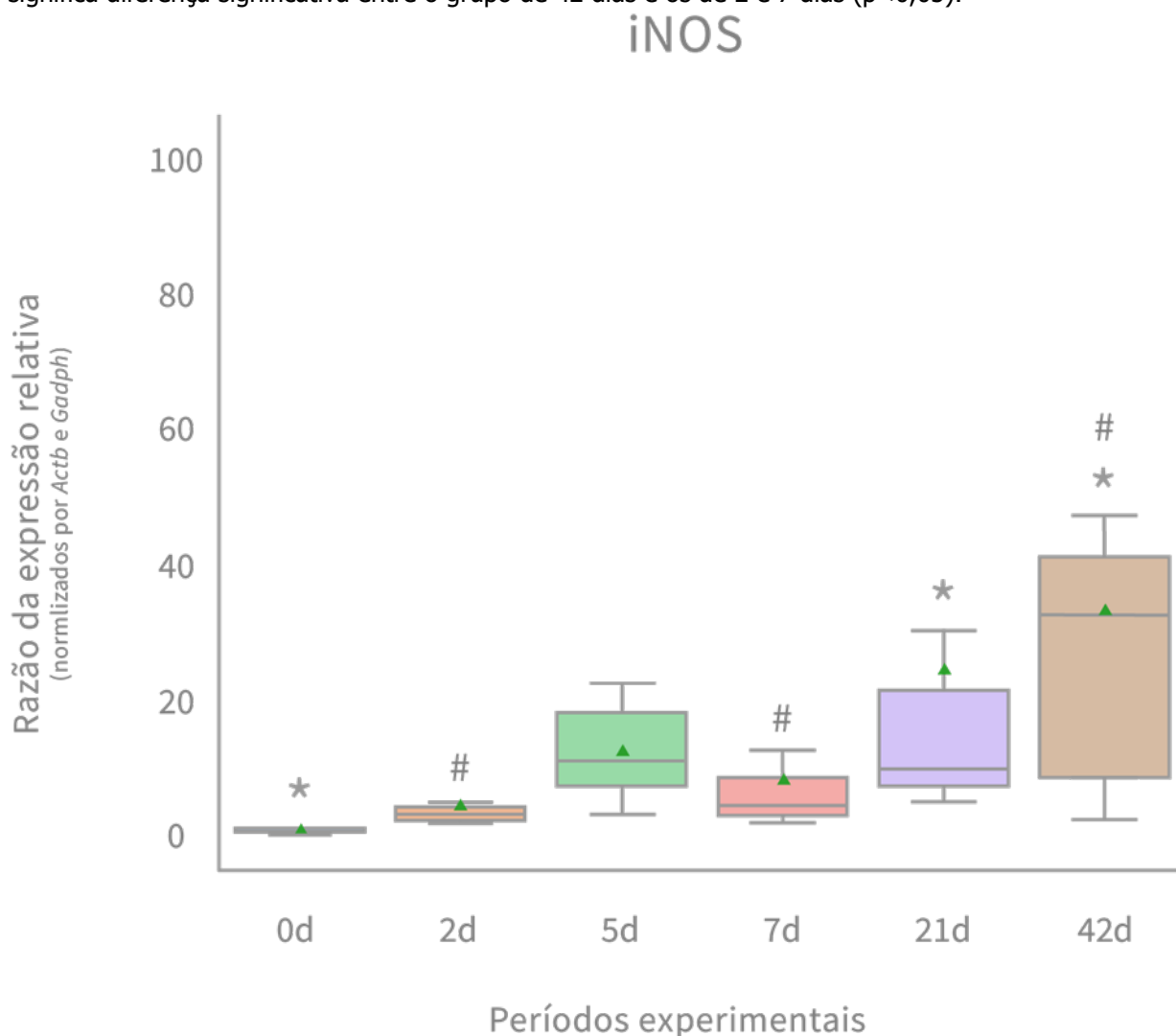
Ao avaliar os genes das enzimas oxidantes, a MPO apresentou maior expressão nos períodos de 5 e 21 dias após a indução da lesão periapical quando comparado ao período controle ($p < 0,05$). Esses grupos também apresentaram diferença estatística significativamente em relação ao grupo de 42 dias ($p < 0,05$), onde houve redução da expressão de MPO (Figura 18).

Figura 18. Representação gráfica da expressão gênica de MPO para o grupo controle (dente hígido) e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical. Asterisco (*) significa diferença estatística significativa entre o grupo controle e o de 5 e 21 dias ($p < 0,05$). (#): diferença significativa entre o grupo de 42 dias e os de 5 e 21 dias ($p < 0,05$).



A expressão da enzima iNOS apresentou aumento significativo aos 21 ($p=0,03$) e continuou aumentada aos 42 dias ($p=0,005$), em comparação com o grupo controle. O aumento de iNOS aos 42 dias também foi estatisticamente diferente dos grupos de 2 dias ($p=0,01$) e 7 dias ($p=0,02$) (Figura 19).

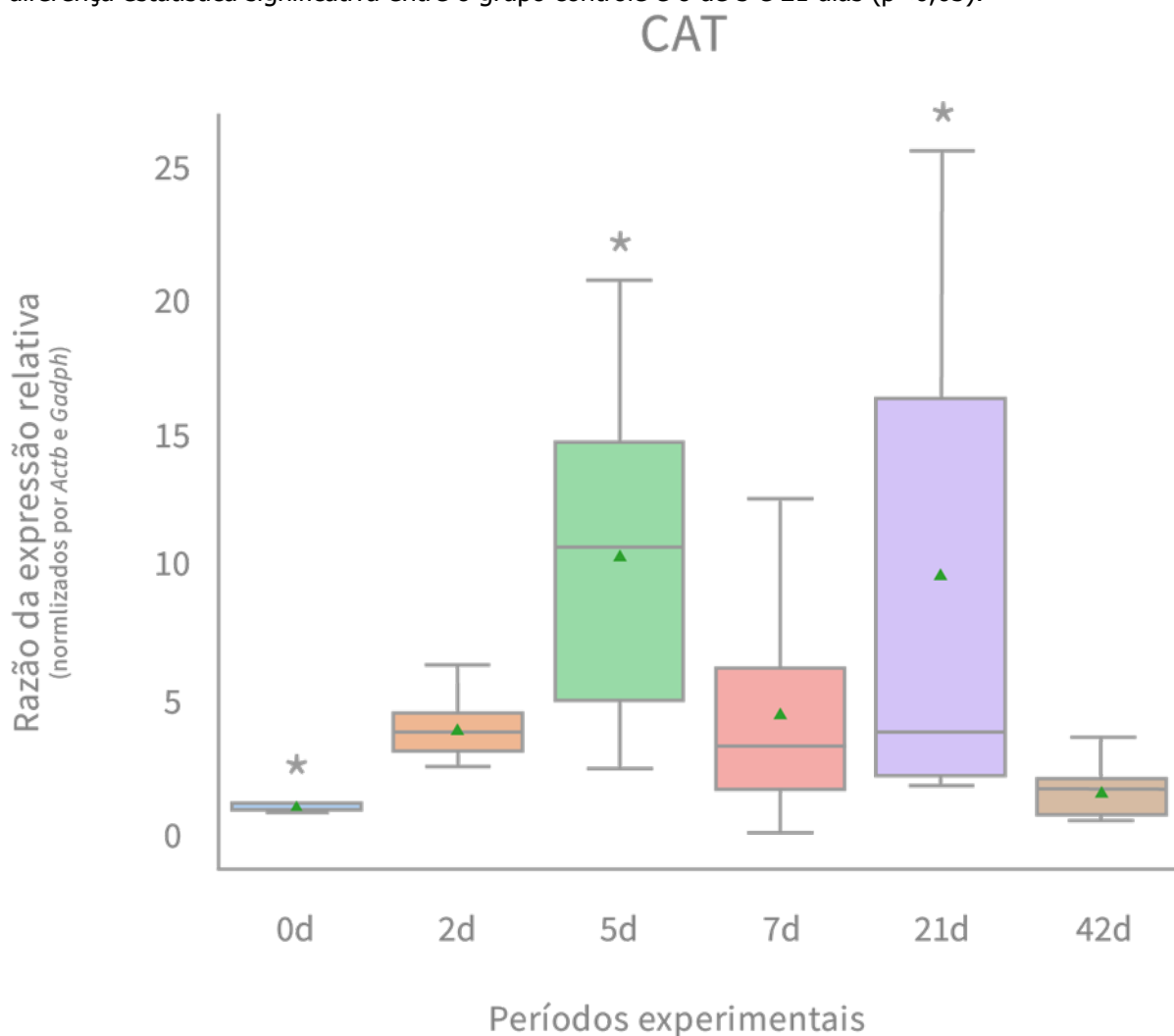
Figura 19. Representação gráfica da expressão gênica de iNOS para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical. Asterisco (*) significa diferença estatística significativa entre o grupo controle e o de 21 e 42 dias ($p < 0,05$). Hashtag (#) significa diferença significativa entre o grupo de 42 dias e os de 2 e 7 dias ($p < 0,05$).



Marcadores Antioxidantes

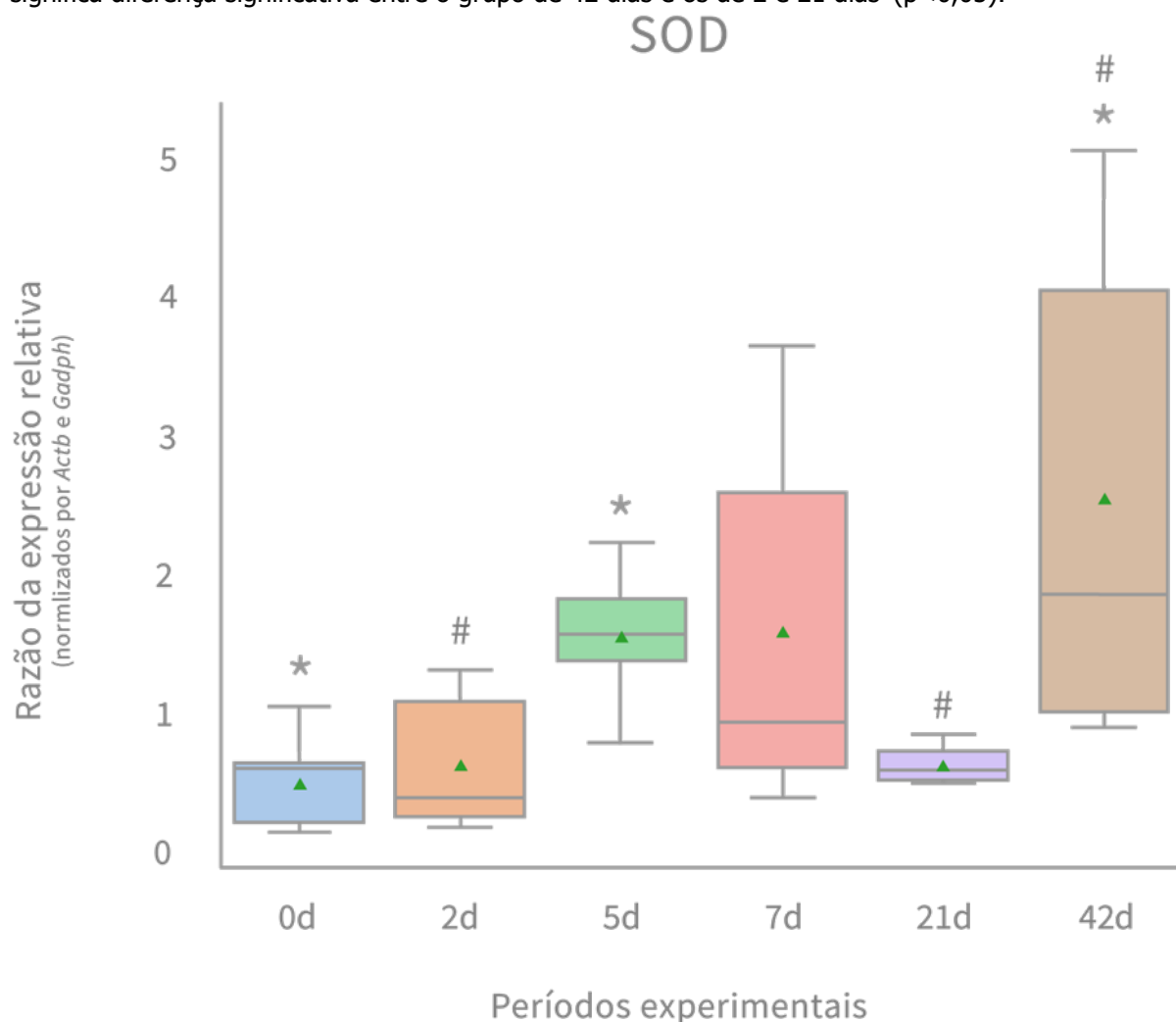
A enzima CAT apresentou aumento da sua expressão em função do tempo até o 5º dia, esse período apresentou diferença significativa de todos os grupos ($p < 0,05$), exceto o de 21 dias. Pois aos 21 dias também houve elevada expressão desse gene, mostrando diferença estatisticamente significativa em comparação com o grupo controle ($p < 0,003$) (Figura 20) e os grupos de 2 ($p = 0,04$) e 42 dias ($p = 0,005$), que apresentaram baixa expressão.

Figura 20. Representação gráfica da expressão gênica de CAT para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical. Asterisco (*) significa diferença estatística significativa entre o grupo controle e o de 5 e 21 dias ($p < 0,05$).



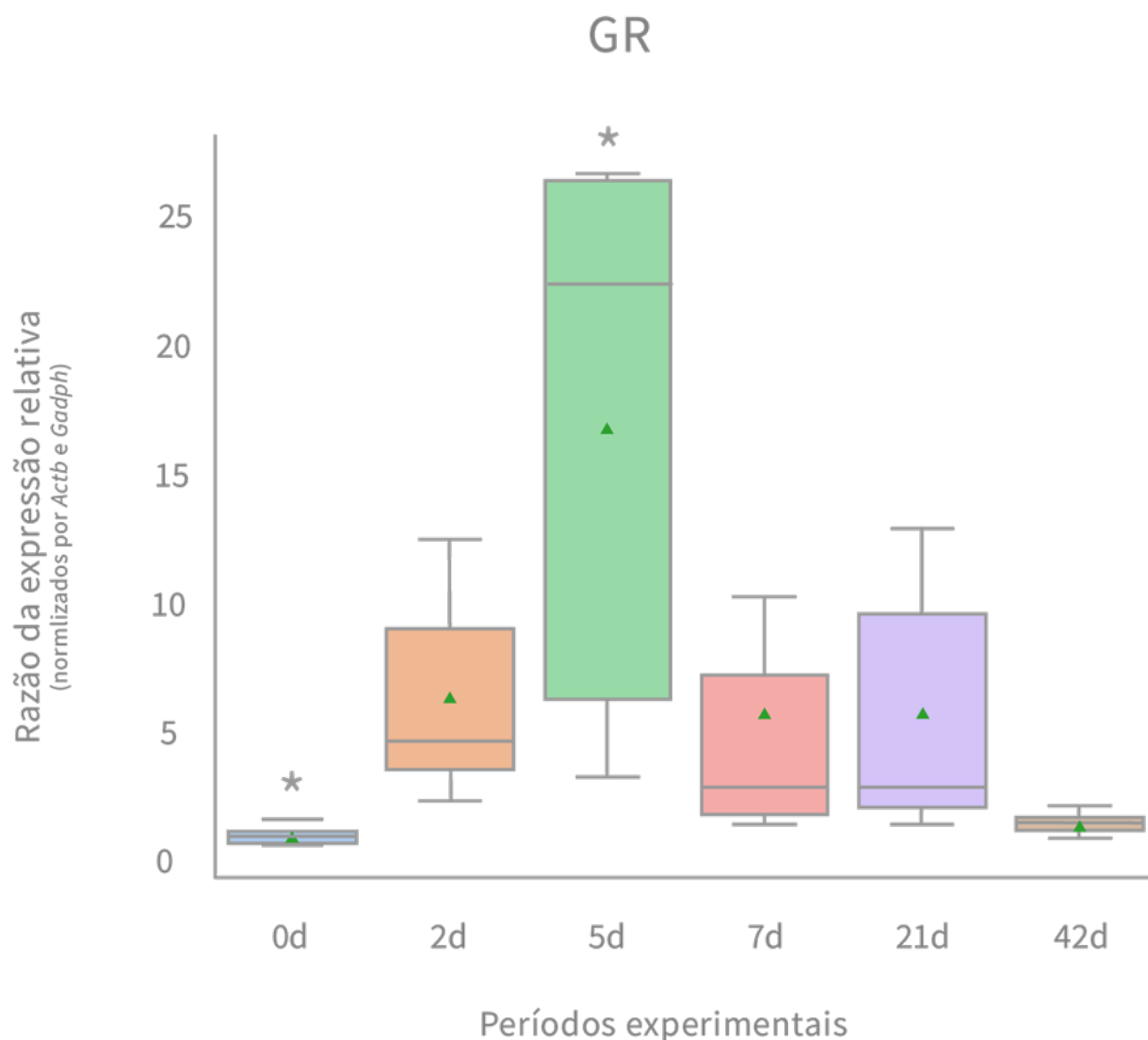
A enzima SOD apresentou aumento da sua expressão ao longo do tempo, com aumento significativo aos 5 dias em relação ao grupo controle ($p=0,04$). Essa expressão diminuiu aos 21 dias e depois voltou a aumentar aos 42 dias, com diferença significativa entre eles ($p=0,01$). O aumento observado no período de 42 dias também teve diferença significativa em relação aos dentes hígidos ($p=0,0006$) e após 2 da indução da lesão periapical ($p=0,01$) (Figura 21).

Figura 21. Gráfico representativo da expressão gênica de SOD para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical. Asterisco (*) significa diferença estatística significativa entre o grupo controle e o de 5 e 42 dias ($p < 0,05$). Hashtag (#) significa diferença significativa entre o grupo de 42 dias e os de 2 e 21 dias ($p < 0,05$).



A expressão de GR aumentou após a indução da lesão periapical, apresentando pico máximo aos 5 dias, com diferença significativa do grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 22) e dos demais grupos ($p < 0,05$). Após esse pico, sua expressão diminuiu ao longo do tempo até o período de 42 dias.

Figura 22. Gráfico representativo da expressão gênica de GR para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical. Asterisco (*) significa diferença estatística significativa entre o grupo controle e o de 5 dias ($p < 0,05$).



De uma maneira geral, os resultados obtidos após a análise de expressão gênica permitiram evidenciar que:

- A GR teve pico aos 5 dias.
- A MPO e a CAT aumentaram aos 5 e 21 dias e diminuíram aos 42 dias.
- A SOD esteve aumentada aos 5 e 42 dias, porém aos 21 dias sua expressão foi diminuída.
- A iNOS apresentou expressão maior nos períodos finais de 21 e 42 dias.

A partir dos dados da mensuração da lesão periapical e dos dados da expressão gênica dos marcadores oxidantes e antioxidantes, foi obtida uma matriz de correlação utilizando correlação de Spearman, para verificar a presença de efeitos

correlacionais entre as variáveis. Foi possível observar que existe uma correlação moderada entre a expressão de iNOS e o tamanho da lesão periapical ($r=0,6$; $p<0,05$), uma vez que, quanto maior foi a expressão desse gene, maior foi o tamanho da lesão periapical. Além disso, a expressão da enzima antioxidante CAT aumentou juntamente com a enzima oxidante MPO, apresentando correlação moderada ($r=0,7$; $p<0,05$). Adicionalmente, a expressão da enzima GR aumentou juntamente com a MPO, apresentando correlação forte ($r=0,8$; $p<0,05$) (Figura 23).

Figura 23. Matriz de correlação entre tamanho da lesão periapical e expressão gênica das enzimas oxidantes e antioxidantes. Quanto mais clara a cor (valores mais próximos ao 1), mais intensa é a correlação.



DISCUSSÃO

Estudos recentes têm destacado o papel complexo das espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) nas reações imuno-inflamatórias, mostrando a associação desse mecanismo de defesa do hospedeiro à patogênese de várias doenças e ressaltando como possíveis alvos terapêuticos promissores (Forman e Zhang, 2021; Vollbracht e Kraft, 2022; Tanabe et al., 2022; Hou et al., 2023). A destruição dos tecidos periapicais é consequência da interação entre microorganismos e as respostas do sistema imunológico, pois a resposta do hospedeiro possui função protetora, podendo, ao mesmo tempo, causar danos (Stashenko et al., 1989; 1990; Nair, 2004; Čolić et al., 2009; Karamifar et al. 2020; Cavalla et al., 2021; Galler et al., 2021). Assim, estudos devem ser realizados a fim de elucidar a participação dos mecanismos de defesa do hospedeiro na patogênese e progressão das infecções endodônticas.

Alguns estudos observaram, nas lesões periapicais, um efeito pró-oxidante, presença aumentada de determinadas enzimas oxidantes ou marcadores para danos oxidativos a biomoléculas (Dezerega et al., 2012; Vengerfeldt et al., 2017; Jakovljevic et al., 2018), mostrando que a resposta inflamatória frente a infecção endodôntica gera aumento nos níveis de ROS e stress oxidativo. Entretanto, nenhum estudo avaliou a atividade das enzimas oxidantes e antioxidantes ao longo da progressão dessa condição patológica, o que pode fornecer ferramentas importantes para compreender e para potencializar seu tratamento. Nesse sentido, esse trabalho buscou caracterizar e entender o comportamento das enzimas oxidantes e antioxidantes durante a formação e desenvolvimento das lesões periapicais. Descrevemos pela primeira vez a dinâmica da atividade redox e suas possíveis contribuições ao longo do estabelecimento da lesão periapical.

A avaliação das ROS é desafiadora devido a sua meia vida curta e elevada reatividade, por isso sua formação e ação podem ser detectadas por meio de danos oxidativos a biomoléculas ou por meio da atividade antioxidante (Tanabe et al., 2022). A expressão enzimas oxidantes e antioxidantes pode se alterar em resposta ao stress redox e podem ser utilizadas para avaliá-lo em células e tecidos na saúde e na doença. Para essa avaliação são sugeridas técnicas de biologia molecular, como imunológicas, enzimáticas e PCR (Marrocco et al., 2017). Para

superar as limitações de cada técnica, é sugerido que se faça a utilização de mais de um método de avaliação (Pinchuk et al., 2012; Marrocco et al., 2017). Diante disso, nosso trabalho buscou avaliar essas enzimas por meio da sua expressão detectada em qRT-PCR e pela imuno-histoquímica.

No presente estudo, as lesões periapicais se desenvolveram de forma dinâmica no decorrer dos períodos experimentais, apresentando aumento progressivo da espessura do ligamento periodontal a partir do período de 5 dias até os 42 dias, sendo que, neste último período, as áreas das lesões periapicais foram severamente mais extensas ($p < 0,0001$), com a presença de reabsorção óssea e cementária. A expressão dos genes oxidantes e antioxidantes estiveram presentes ao longo dos períodos experimentais em diferentes níveis, porém a maioria apresentou um aumento significativo inicial da sua expressão aos 5 dias após a indução da lesão periapical. Esses resultados indicam uma maior atividade redox nesse período, o que está de acordo com o estágio agudo da reação imuno-inflamatória, com o recrutamento e superativação de células imunes e respostas mais intensas reguladas pelas reações redox (Nair, 2004; van der Vilet e Janssen-Heininger, 2014; Arulsevan et al., 2016; Karamifar et al., 2020).

Dentre essas respostas, se destaca a formação de ROS/RNS, como o ânion superóxido (O_2^-), que são prejudiciais aos patógenos, mas também aos tecidos adjacentes. Esse ânion é uma das fontes primárias de ROS e sua produção em excesso está associada ao stress oxidativo e danos celulares (Holzerová e Prokisch, 2015; Banerjee et al., 2020; Checa e Aran, 2020). A maioria das ROS são derivadas do O_2^- , pois ele reage rapidamente, podendo formar substâncias mais reativas como o radical hidroxila (OH^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$), ou ainda se desmutar, de forma espontânea ou conduzida pela enzima SOD, formando H_2O_2 (Checa e Aran, 2020; Juan et al., 2021). Apesar da SOD ser uma enzima antioxidante, o H_2O_2 é uma ROS, menos reativa, mas que atua como molécula sinalizadora. Portanto, para o papel antioxidante da SOD, as reações posteriores com o H_2O_2 vão determinar o estado redox, visto que o H_2O_2 pode ser reduzido, reagindo com outras enzimas antioxidantes, como também pode reagir com oxidantes e formar espécies mais reativas (Aratani, 2018; Al-Shehri, 2021).

O aumento de SOD foi observado após ocorrência do stress oxidativo (Redl et al., 1993), e por isso, foi relacionado a doenças inflamatórias (McCord et al., 2005). Foram descritas três isoformas dessa enzima, de acordo onde ela é produzida, na mitocôndria e no citosol (SOD1 ou CuZn-SOD), exclusivamente na matriz mitocondrial (SOD 2 ou Mn-SOD) ou ainda extracelular, predominante em fluídos como linfa, plasma (SOD3 ou EC-SOD) (Zelko et al., 2002; Juan et al., 2021; Tris et al., 2021). Na Periodontia, vários estudos também relataram o aumento da SOD relacionado à periodontite ou ainda sua diminuição após tratamento e redução do stress oxidativo (Akalin et al., 2005; Novakovic et al., 2014; Araújo et al., 2017), podendo ter papel na gravidade dessa doença (Yang et al., 2014). No nosso trabalho avaliamos a expressão da SOD1, que apresentou aumento na expressão gênica aos 5 dias após a indução da lesão periapical. Bödör et al. (2007) também observaram uma elevada transcrição da SOD1, avaliada também por qRT-PCR, em amostras de tecido pulpar de dentes com pulpite irreversível em comparação com um grupo controle. Além disso, seu aumento no tecido pulpar, observado por espectrofotometria, foi associado a inflamação, podendo ser uma resposta compensatória ao stress oxidativo induzido pela inflamação (Davis et al., 1991; Baumgardner e Sulfaro, 2001). Sugere-se, assim, que o aumento inicial observado na expressão da SOD pode estar relacionado a tentativa de se equilibrar o stress oxidativo nesse período, pela elevada produção de O_2^- e consequentemente formação de H_2O_2 por ela. No presente estudo, ainda, a elevada formação de H_2O_2 , aos 5 dias, pode ter estimulado o aumento significativo ($p < 0,05$) na transcrição das enzimas CAT, MPO e GR, as quais também apresentaram aumento nesse período, visto que essas enzimas reagem com essa espécie reativa de oxigênio.

A CAT é liberada para reduzir o acúmulo tóxico de H_2O_2 , decompondo-o em oxigênio e água (Banerjee et al., 2020; Juan et al., 2021). Alguns estudos observaram os níveis de CAT aumentados, em polpas inflamadas em comparação com polpas saudáveis, por métodos espectrofotométricos (Esposito et al., 2003a; Esposito et al., 2003b; Topcu et al., 2016), mostrando que a inflamação promove aumento compensatório dessa enzima.

Quanto à MPO, também reage com H_2O_2 mas resulta na produção de ácido hipocloroso (HOCl), uma espécie mais reativa que o H_2O_2 que possui ação

antimicrobiana e estimula efeitos pró-oxidantes e pró- inflamatórios (Aratani, 2018; Al-Shehri, 2021). À semelhança do nosso estudo, um estudo observou níveis mais elevados de MPO em casos de pulpite e periodontite apical crônica, por meio de um ensaio imunoenzimático, tanto em tecido coletado do canal radicular como também em amostras de saliva (Vengerfeldt et al., 2017). O aumento desse e outros marcadores oxidantes também foi associado à dor e destruição óssea nesse mesmo trabalho.

A glutathiona participa de um importante sistema antioxidante, pois está presente na sua forma reduzida (GSH) que reage com H_2O_2 por intermédio da enzima GPx, formando glutathiona oxidada (GSSG). O esgotamento de GSH em favorecimento da GSSG, torna o ambiente mais propenso aos danos oxidativos. A enzima GR é constitutivamente ativa e induzível no stress oxidativo, visto que ela atua regenerando GSH a partir do GSSG (Perricone et al., 2009; Couto et al., 2016; Li et al., 2020). Logo, o pico de expressão desta enzima no período de 5 dias, sugere uma tentativa de proteção em consequência da alta formação de GSSG nesse período, devido à exagerada formação de ROS frente ao agente agressor. Uma vez que o aumento das enzimas antioxidantes pode representar uma regulação positiva compensatória em resposta ao stress oxidativo (Likidilid et al., 2010, Morrocco et al., 2017). Jakovljevic e colaboradores (2018) encontraram maiores níveis de GSSG em amostras de pacientes com periodontite apical em comparação com o controle saudável, o que reforça nossos achados em que o aumento dessa enzima antioxidante foi conduzido pelo aumento de GSSG. Quanto a imunomarcação dessa enzima na região periapical, foi observada predominância de marcações mais intensas com o decorrer dos períodos, porém sem apresentar diferença estatística entre eles. Apesar da GR atuar formando GSH para agir como antioxidante e evitar danos oxidativos, alguns estudos indicam que a GSH em condições patológicas desempenha papel na diferenciação de osteoclastos, contribuindo para a osteoclastogênese (Huh et al., 2006; Fujita et al., 2019). A marcação predominante moderada a severa nos períodos mais crônicos pode estar relacionada aos achados microscópicos, como elevada presença de osteoclastos e de destruição óssea nesses períodos. Isso corrobora com os resultados de Fujita e colaboradores (2019), que observaram que o aumento de GSH promoveu osteoclastogênese e destruição óssea

inflamatória em camundongos. Nossos resultados também demonstraram forte correlação entre a GR e a MPO, estando de acordo com outros estudos que observaram que a exposição ao HOCl, formado pela MPO, promove diminuição nos níveis de GSH formando GSSG (Carr e Winterbourn, 1997; Harwood et al., 2006), ou seja, estimulando a atividade da GR. Diante desses achados apresentados após os 5 dias da indução da lesão periapical, pode-se indicar elevada formação de ROS (O_2^- , H_2O_2 , e HOCl) e aumento compensatório antioxidante, em decorrência stress oxidativo nesse período.

No presente estudo, com o decorrer dos períodos e manutenção do agente agressor, uma vez que os patógenos não foram removidos, o estímulo inflamatório se manteve sempre presente, portanto, a transcrição aumentada de algumas dessas enzimas continuou acontecendo, promovendo um ambiente oxidativo crônico, que pode ter contribuído para a progressão desta patologia. Assim, observou-se aumento significativo da MPO e CAT também aos 21 dias, em relação ao grupo controle ($p < 0,05$). A expressão dessas enzimas apresentou uma correlação moderada ao longo do tempo, o que pode ser explicado por atuarem na presença do H_2O_2 . Logo, a persistência dessas enzimas nesse período sugere níveis elevados de H_2O_2 . Porém, a formação de H_2O_2 nesse período não está associada à atuação de SOD, devido a diminuição da sua expressão. Como já mencionado, o H_2O_2 pode ser formado pela dismutação do O_2^- , espontaneamente, ou ainda induzido por citocinas, fatores de crescimento e outros ligantes por meio da ativação de seus receptores correspondentes (Pulsen et al., 2011; Sies, 2020). Minczykowi e colaboradores (2001) relataram formação elevada de O_2^- e H_2O_2 em neutrófilos de amostras de sangue de pacientes com granuloma apical crônico. Apesar dessa geração aumentada ocorrer para defesa direta antimicrobiana, recrutando leucócitos, agindo como quimioatraentes e mediando a sinalização e regulação gênica (van der Vilet e Janssen-Heininger, 2017), a continuidade do seus níveis elevados contribui para amplificações destrutivas e deletérias uma vez que essas ROS induziram a superexpressão de RANKL, que estimula a diferenciação osteoclástica e reabsorção óssea, em células osteoblásticas de humanos e camundongos (Bai et al., 2005; Kanzari et al., 2014; Hernández-Ríos et al., 2017). Além disso, a produção

sustentada de H₂O₂ induziu a ativação pró-MMPs, como a MMP-2 e MMP-9 nos tecidos periodontais (Yoon et al., 2002; Cavalla et al., 2015), como também estimula a ativação do fator NF-κB e citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) (Morgan e Liu, 2011; Thoma e Lightfoot, 2018), importantes na patogênese da lesão periapical (Mei et al., 2003; Kaneko et al., 2019; Maia et al., 2020).

Com relação a imunomarcagem da CAT e MPO na região periapical, não houve grandes alterações na marcação da CAT entre os períodos, sem diferença estatística, sugerindo que essa enzima não teve grande participação local. Nesse contexto, Aslantas et al. (2022) observaram que a marcação de CAT foi intensa no tecido pulpar de dentes com pulpíte reversível, porém fraca em dentes com pulpíte irreversível. Já a MPO apresentou aumento significativo nos grupos de 21 e 42 dias em comparação com os demais ($p=0,001$), o que pode ter contribuído para a maior reabsorção óssea observada nesses períodos uma vez que a atividade dessa enzima resulta na formação de HOCl, que ativa metaloproteinases de matriz (MMPs), enzimas proteolíticas que degradam proteínas da matriz extracelular (Saari et al., 1990; Alfakry et al., 2016; Franco et al., 2017), as quais possuem expressão elevada nas lesões periapicais (Paula-Silva et al., 2020).

Ainda no período de 21 dias, houve aumento da expressão de iNOS que persistiu até os 42 dias, em comparação com o grupo controle ($p<0,05$). A iNOS catalisa a produção de óxido nítrico (NO), principal e fonte primária das RNS, a partir de L-arginina (Checa e Aran, 2020; Juan et al., 2021). Essa conversão é realizada por enzimas da família óxido nítrico sintase (NOS), porém a isoforma iNOS é induzida por citocinas inflamatórias e LPS bacteriano no local da inflamação. O LPS é um potencializador de NO por meio da ativação NF-κB e ativação da iNOS (Napetschnig e Wu, 2013). Nesse contexto, sabe-se que baixos níveis de NO podem ter papel positivo na estimulação e diferenciação odontogênica (Sonoda et al., 2018), porém a ativação exagerada de NF-κB e super expressão de NO inibiu a diferenciação osteogênica de células-tronco mesenquimais (Chang et al., 2013). Nesse contexto, a supressão do desenvolvimento das lesões periapicais pela inibição da atividade NF-κB observada no trabalho de Kaneko e colaboradores (2019) pode ser consequência também da menor expressão de iNOS por essa via. Sabe-se que as lesões

periapicais, de características microscópicas de cronificação nos períodos mais tardios de avaliação (21 e 42 dias), apresentam como microbiota predominante os micro-organismos Gram-negativos que apresentam LPS na sua parede celular (Stashenko e Wang, 1992; Assed et al., 1996; Bezerra da Silva, 2018). Esse LPS, liberado quando do stress, morte ou multiplicação desses micro-organismos pode ter contribuído para maior expressão dessa enzima nesses grupos.

A marcação de iNOS foi previamente observada em células como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e fibroblastos em granulomas periodontais (Hama et al., 2006; Hama et al., 2007; Kabashima et al., 2007; Cassanta et al., 2017) e também em vários tipos celulares de cistos periapicais, sendo essa expressão relacionada a sua patogênese (Matsumoto e Ribeiro, 2007; Cassanta et al., 2017). Além disso, a superexpressão de iNOS em ceratocistos odontogênicos pode contribuir para seu comportamento agressivo (Swetha et al., 2014) e sua expressão em macrófagos e linfócitos foi considerada mediadora de destruição do tecido periapical e causadora de inflamação crônica e expansão da lesão periapical (Suzuki et al., 2002). Adicionalmente, Cintra et al. (2016) detectaram imunomarcação moderada de iNOS após 30 dias de exposição pulpar. Nossos resultados de análise imunohistoquímica corroboram com esses estudos, uma vez que a imunorreatividade dessa enzima foi moderada a severa nos períodos mais crônicos de 21 e 42 dias, coincidindo com a progressão da lesão periapical observada nesses grupos, com diferença estatística apenas entre o grupo de 2 e 5 dias, 5 e 7 dias e 7 e 42 dias. Adicionalmente, a polarização dos macrófagos está relacionada ao metabolismo da arginina, sendo o aumento de iNOS um estímulo para a ativação do fenótipo pró-inflamatório M1. Já o aumento da transcrição de arginase-1 promove a polarização M2, favorecendo o reparo, a remodelação tecidual e angiogênese (Koh et al., 2018; Morris et al., 2022). No presente estudo, uma vez que o estímulo infeccioso não foi removido, o aumento de iNOS aos 21 e 42 dias pode sugerir a presença do perfil de macrófagos M1 exacerbando a inflamação, nesses períodos experimentais com necrose celular e destruição tecidual.

Vários estudos têm avaliado o papel da iNOS e NO na reabsorção óssea, porém seu papel ainda não está claro. Camundongos *knockout* para a enzima iNOS apresentaram lesões periapicais maiores, maior recrutamento de células

inflamatórias, formação de abscessos periapicais (Fukada et al., 2008), além de níveis mais elevados de IL-1 β , TNF- α , RANK e RANKL, podendo o NO regular negativamente a formação de osteoclastos (Silva et al., 2012). No entanto, o uso de um inibidor seletivo do iNOS durante o tratamento endodôntico de dentes com lesões periapicais induzidas experimentalmente em gatos acelerou a cicatrização periapical, mostrando um papel prejudicial do NO no processo de reparo periapical (Farhad et al., 2011). Já Wang e colaboradores (2020), mostraram que o uso de metformina suprimiu a expressão de iNOS e reduziu a reabsorção óssea na periodontite apical induzida experimentalmente em ratos. No presente estudo, o iNOS teve correlação positiva moderada com o tamanho da lesão, pois quanto maior foi o tamanho da lesão, maior foi a expressão gênica dessa enzima, sugerindo seu papel na atividade osteoclástica e destruição óssea e cementária.

No período de 42 dias, além do aumento pró-oxidante gerado pelo iNOS, a enzima antioxidante SOD voltou a expressar níveis elevados semelhantes ao período de 5 dias. Apesar de não ter apresentado diferença estatística entre os grupos, a imunomarcagem de SOD também foi predominantemente moderada e severa na lesão periapical nos períodos de 21 e 42 dias. Alguns estudos encontraram maior marcação imuno-histoquímica de SOD decorrente de uma resposta inflamatória no tecido pulpar de dentes com preparo cavitário profundo, em comparação com controles sem cavidade (Baumgardner et al., 1999; Varvara et al., 2012). Nosso trabalho se concentrou em avaliar a marcação na região periapical, talvez isso explique a marcação leve observada durante a inflamação aguda, pois há mais respostas no tecido pulpar, pela grande quantidade de células encontradas no infiltrado inflamatório, em comparação à região periapical. Essas células possuem a principal fonte de O $_2^-$, o complexo enzimático NADPH oxidase (Herb e Schramm, 2021; Tauffenberger e Magistretti, 2021), que pode ter estimulado a atividade de SOD. À medida que aumenta o infiltrado inflamatório na região periapical com o estabelecimento da lesão, como observado nos nossos achados, a atividade da SOD é maior nessa região. O O $_2^-$ também pode ser gerado pelas células osteoclásticas, que estão presentes de forma intensa nesse grupo todo, e está envolvido na degradação da matriz óssea (Key et al., 1994). A formação de O $_2^-$ na interface

osteoclasto-osso, pode ter estimulado novamente o aumento de SOD, como também a presença de elevada de NO. Pois, na presença de NO, o O_2^- reage rapidamente com ele, antes mesmo de se dismutar, para formar o $ONOO^-$. Logo, o NO pode estimular a expressão da SOD para evitar a formação desse oxidante forte (Wang et al., 2018).

De uma maneira geral, a estimulação de citocinas inflamatórias, recrutamento de leucócitos e stress oxidativo indicam uma resposta inicial frente ao agente agressor. Essa maior atividade inflamatória faz parte da resposta aguda (Graves et al., 2011; Arulselvan et al., 2016). Os resultados encontrados na expressão gênica no 5º dia após a indução periapical, estão de acordo com essa resposta, refletindo nos níveis altos de O_2^- , H_2O_2 e a formação de HOCl nesse período, provavelmente ainda no tecido pulpar com infiltrado inflamatório moderado/severo nesse período. A elevada formação de ROS encontradas na fase aguda, podem contribuir para necrose desse tecido pois causam danos às células que induzem a sua apoptose ou necrose (Higuchi, 2003; Manzanero et al., 2013; Fan et al., 2021). Além disso, medeiam a produção do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B (RANKL), envolvido na osteoclastogênese, a expressão e ativação de MMPs, liberação de citocinas inflamatórias e destruição óssea (Hernández-Ríos et al., 2017). A destruição óssea encontrada na fase crônica, a partir de 21 dias após a indução da lesão periapical, pode ter sido resultado do stress oxidativo inicial e da exposição prolongada a essas ROS observadas nos grupos de 21 e 42 dias. Assim como a presença do infiltrado inflamatório severo, osteoclastos e as áreas extensas da lesão periapical encontradas nesses grupos podem estar associadas ao stress oxidativo. Pois mesmo tentando respostas anti-inflamatórias e antioxidantes, como não foi feito o tratamento do canal radicular e o patógeno esteve presente, esses períodos mostraram exacerbação da inflamação na região periapical associadas a destruição óssea e necrose.

Embora alguns trabalhos tenham encontrado danos causados pela oxidação de biomoléculas ou a expressão de algumas enzimas redox, destacando o stress oxidativo na patogênese das lesões periapicais (Dezerega et al., 2012; Vengerfeldt et al., 2017; Jakovljevic et al., 2018; Georgiou et al., 2021), esse é o primeiro que

caracteriza e descreve as respostas oxidativas e antioxidantes durante a infecção endodôntica ao longo do desenvolvimento da lesão periapical, buscando entender sua dinâmica, vias de ativação e respostas celulares.

CONCLUSÃO

A progressão da lesão periapical foi acompanhada da expressão das enzimas oxidantes e antioxidantes de forma dinâmica. Pode-se observar, ainda, o aumento da expressão gênica de oxidantes e a regulação compensatória dos antioxidantes nos períodos iniciais do desenvolvimento da lesão periapical e a exposição prolongada de ROS, observadas pela imunomarcção, nas lesões crônicas. O aumento da expressão de iNOS após 21 e 42 dias apresentou correlação com o tamanho das lesões periapicais. A marcação de iNOS, aos 42 dias, parece estar associada à destruição óssea e cementária, sugerindo o importante papel da atividade redox como mecanismo de defesa e na patogênese das lesões periapicais.

CAPÍTULO 2 - RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE REDOX E ARMADILHAS

EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS NA GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL

CAPÍTULO 2 - RELAÇÃO ENTRE ATIVIDADE REDOX E ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS NA GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL

INTRODUÇÃO

A patogênese da periodontite apical é complexa uma vez que sua etiologia é polimicrobiana com predominância de micro-organismos Gram-negativos, os quais estimulam uma intensa reação de defesa do hospedeiro na tentativa de limitar a infecção (Stashenko et al., 1989; 1990; Čolić et al., 2009; AAE, 2020; Galler et al., 2021). Com a persistência dessa infecção ocorre o estabelecimento de um processo inflamatório crônico associado a reabsorção óssea e cementária (Čolić et al., 2009; Karamifar et al., 2020; Cavalla et al., 2009; al., 2021; Galler et al., 2021; Goldman et al., 2021).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegar no local da infecção na tentativa de eliminar os patógenos por meio da fagocitose, a partir da geração rápida e massiva de espécies reativas de oxigênio (ROS), pelo *oxidative burst*, e da liberação de enzimas a partir de seus grânulos (Alberts et al., 2014; Galli et al., 2011; Uribe-Querol e Rosales, 2020; Burn et al., 2021). Além da atividade antimicrobiana, as ROS atuam como moléculas mensageiras em vias de sinalização e regulam fatores de transcrição pró e anti-inflamatórios (Balaban et al., 2005; Senoner e Dichtl, 2019; Sies et al., 2022). Apesar de serem geradas para proteger o hospedeiro, a formação exagerada e/ou prolongada de ROS leva ao stress oxidativo, resultando na oxidação de biomoléculas, desencadeando alterações nas funções celulares e danos nos tecidos e na exacerbação da inflamação (Fois et al., 2018; Daenen et al., 2019; Forman e Zhang, 2021; Sies et al., 2022). Por isso, o corpo possui sistemas antioxidantes na tentativa de manter os níveis de ROS ideais para desempenhar seu papel na defesa do hospedeiro (Balaban et al., 2005; Senoner e Dichtl, 2019; Sies et al., 2022). Ainda, no tecido pulpar, as ROS também são encontradas, produzidas em níveis fisiológicos, e mediadas por células dentárias para promover reparo. Porém, em níveis elevados, possuem efeitos deletérios que promovem a morte celular pulpar ou necrose desse tecido (Duncan e Cooper, 2020; Gallorini et al., 2021; Zhang et al., 2021). Alguns estudos mostraram a participação do stress oxidativo no desenvolvimento de lesões periapicais

(Inchingolo et al., 2013; Hernández-Ríos et al., 2017; Jakovljevic et al., 2018; Loureiro et al., 2021; Zivanovic et al., 2021; Loureiro et al., 2022), estando associado à dor e reabsorção óssea (Vengerfeldt et al., 2017). Adicionalmente, um estudo recente demonstrou, por meio de análise proteômica, menores níveis de proteínas relacionadas ao stress oxidativo em abscessos apicais agudos em comparação a amostras de dentes com periodontite apical crônica (Loureiro et al., 2022).

Adicionalmente, a liberação de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) é uma outra estratégia antimicrobiana, atuando como barreira física aos patógenos e também na resolução de infecções (White et al., 2016; Brinkmann, 2018; Thiam et al., 2020). A formação de NETs pode ser estimulada por vários sinais moleculares internos, dentre eles ROS, e/ou derivados de patógenos (Fokam e Hoskin, 2020; Hidalgo et al., 2022; Morris et al., 2022). Além disso, as ROS participam da maioria de cascatas de reações envolvidas no processo de formação de NETs, chamado NETose (Stoiber et al., 2015; Al-Shehri; 2021; Hidalgo et al., 2022; Morris et al., 2022). As NETs, resultam da extrusão das cadeias de DNA dos neutrófilos associadas a histonas e proteínas granulares, como mieloperoxidase (MPO), elastase de neutrófilos (NE), catepsina G, lisozimas, proteinase-3, defensinas, calprotectina, catelicidinas (Brinkmann, 2018; Burgener e Schroder, 2020; Tan et al., 2021). Esses componentes citotóxicos e oxidantes presentes em suas extensões, têm papel antimicrobiano, mas também intensificam a resposta inflamatória (Fousert et al., 2020; Singhal e Kumar et al., 2022). Pois, respostas imunológicas desequilibradas, podem resultar na liberação desregulada de NETs causando danos ao hospedeiro (Fousert et al., 2020; Singhal e Kumar, 2022; Huang e O'Sullivan, 2022).

Na Odontologia, alguns estudos relacionaram a formação das NETs com a inflamação periodontal, podendo estar associada à gravidade da doença periodontal (White et al., 2016; Vitkov et al., 2017; Kumar et al., 2018; Kaneko et al., 2018; Magán-Fernández et al., 2019, 2020; Moonen et al., 2020; Vitkov et al., 2021; Wang et al., 2021). Na Endodontia, poucos estudos objetivaram avaliar as NETs no contexto das patologias pulpares e periapicais destacando as armadilhas como possíveis marcadores e/ou alvo terapêuticos (Cooper et al., 2017; Holder et al., 2019; Duncan e Cooper, 2020; Fujii et al., 2021; Contreras et al., 2023). Um estudo

do nosso grupo de pesquisa avaliou a participação das armadilhas extracelulares de neutrófilos durante a formação e progressão de lesões periapicais em camundongos. Os resultados deste estudo permitiram evidenciar a presença das armadilhas extracelulares de neutrófilos nas lesões periapicais, especialmente nos períodos tardios de avaliação, concomitantemente com maior número de neutrófilos. Adicionalmente, as proteínas PAD4 e CTSG também estiveram presentes durante a progressão da lesão periapical, sugerindo ação na degradação tecidual, potencializando a resposta inflamatória e a progressão da lesão periapical (Massoni, 2023).

Desse modo, o importante papel, tanto das NETS como das ROS, foi evidenciado em diferentes patologias (Jayaprakash et al., 2015; Hirschfeld et al., 2017; Schönrich et al., 2020; Mingoti et al., 2022). Estudos têm demonstrado que o influxo sustentado de neutrófilos e a liberação persistente de NETs estão relacionados a várias condições inflamatórias (Euler et al., 2019; Huang et al., 2020; Lai et al., 2023) como sepse (Denning et al., 2019; Silva et al., 2021; Zhang et al., 2023), lesões pulmonares (Lefrançais et al., 2018; Uddin et al., 2019; Scozzi et al., 2022) e doenças autoimunes (Fresneda et al., 2021; Wang et al., 2022). Além disso, a produção excessiva de ROS/RNS esteve relacionada a doenças cardiovasculares (Steven et al., 2019; Chang et al., 2020; Donia e Khamis, 2021; Krzemińska et al., 2022; Hou et al., 2023), diabetes mellitus (Rendra et al., 2019; Yaribeygi et al., 2020; Ramos-Riera et al., 2023), lesões pulmonares (Xu et al., 2020; Zuo e Wijegunawardana, 2021; Barnes, 2022) e doenças autoimunes (Smallwood et al., 2018; Wójcik et al., 2021; He et al., 2022).

Tendo em vista a relevante atuação das ROS e a ativação de neutrófilos para liberação de NETs em patologias inflamatórias sistêmicas, além do papel isolado de ROS e NETs em patologias bucais, estudos são necessários para evidenciar a relação entre a expressão de espécies reativas de oxigênio e antioxidantes e a liberação das armadilhas extracelulares de neutrófilos na patogênese da lesão tecidual periapical.

PROPOSIÇÃO

Objetivo Geral

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar a relação espécies reativas de

oxigênio e antioxidantes e a liberação de NETs na formação e desenvolvimento de lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos *wild-type* (WT).

Objetivos Específicos

- Análise microscópica para descrição das características do canal radicular e das regiões apical e periapical, para contagem de neutrófilos e histomorfometria para mensuração das áreas correspondentes às lesões periapicais, por meio de coloração em hematoxilina e eosina (HE);
- Avaliação microscópica da formação de NETs, por meio da co-localização da elastase de neutrófilo (NE) com a histona H3 citrulinada (H3Cit) e também por meio da mieloperoxidase (MPO) com a histona H3 citrulinada (H3Cit), e para avaliação do stress oxidativo, por meio da marcação para as enzimas oxidantes mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintase (iNOS) e antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT), por meio de imunohistoquímica;
- Relacionar a quantidade de neutrófilos e marcadores de oxidantes/antioxidantes e de NETs por meio da técnica de imunohistoquímica;
- Avaliar a expressão gênica de MPO, iNOS, SOD, GR, CAT, NE e H3Cit por meio da técnica de qRT-PCR.

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, foi realizado cálculo amostral para definição do número de animais. Em seguida, o projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo - FORP/USP (Processo nº 0009/2021 - ANEXO A). Todos os procedimentos realizados nos animais foram conduzidos de acordo com o guia ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) para estudos em animais (Kilkenny et al., 2010; Percie du Sert et al., 2020) e guia PRIASE 2021 para estudos em Endodontia (Nagendrababu et al., 2021). Os cuidados com o bem-estar dos animais seguiram as normas e princípios éticos adotados pela CEUA/FORP-USP e as Resoluções Normativas do Conselho Nacional do Controle de Experimentação Animal (CONCEA), regulamentadas pela Constituição Federal Brasileira na Lei nº 11.794 de 8 de outubro de 2008.

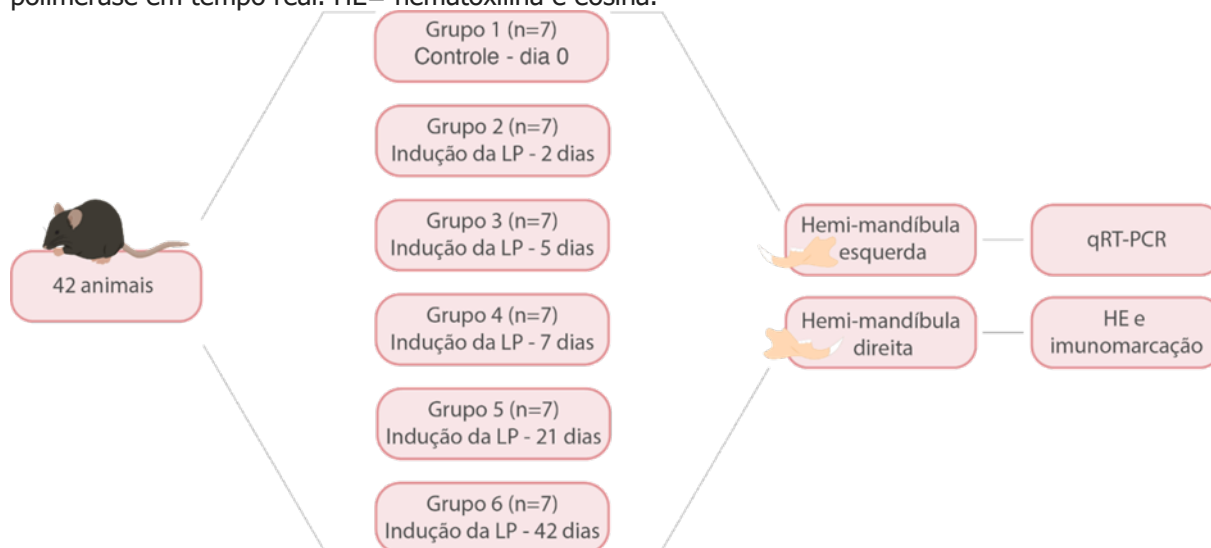
Obtenção das amostras

Procedimentos Operatórios

Foram utilizados 42 camundongos *wild-type* (WT) machos que apresentaram como *background* a linhagem C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 20 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP) – Campus de Ribeirão Preto. Os animais foram mantidos no Biotério I da FORP/USP com ração padrão e livre acesso à água. Para cada período experimental de 0, 2, 5, 7, 21 e 42 dias foram utilizados 7 animais para todas as análises. Enquanto no período experimental inicial (dia 0) os dentes estavam hígidos (sem indução de lesão periapical), nos períodos subsequentes (2, 5, 7, 21 e 42 dias) todos os animais tiveram lesão periapical induzida.

A Figura 24 demonstra a divisão dos grupos utilizados, bem como períodos experimentais, o número de animais e as análises que foram realizadas em cada grupo.

Figura 24. Descrição da divisão dos grupos, períodos experimentais, número de animais para cada grupo e as análises que foram realizadas. LP = lesão periapical. qRT-PCR= reação em cadeia da polimerase em tempo real. HE= hematoxilina e eosina.



Indução das lesões periapicais

A indução de lesão periapical foi realizada em todos os animais dos grupos nos tempos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. A indução foi realizada de acordo com método já empregado em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa (Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; Oliveira et al., 2015; De Rossi et al., 2016; Barreiros et al., 2018; Pucinelli et al., 2022).

Inicialmente, os animais foram anestesiados por injeção intramuscular na coxa traseira com Ketamina (150 mg/Kg de peso corporal) e Xilazina (7,5 mg/Kg de peso corporal). Em seguida, imobilizados em uma mesa de retração da mandíbula, de forma que permaneceram com a boca aberta para adequada visualização dos molares inferiores (esquerdo e direito). Então foi realizada a abertura coronária com o auxílio de uma broca esférica em baixa rotação (nº ¼ - KG Sorensen, São Paulo, Brasil), montada em motor de baixa rotação e contra-ângulo (Dabi Atlante Equipamentos Odontológicos, Ribeirão Preto, Brasil) para acesso aos canais radiculares. O tecido pulpar dos primeiros molares inferiores foi exposto à cavidade bucal e a polpa radicular foi removida parcialmente com uma lima endodôntica tipo K número 8 (Maillefer S/A, Suíça). Os dentes não receberam selamento coronário.

Decorridos os períodos experimentais de 0, 2, 5, 7, 21, e 42 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados em câmara de gás carbônico (CO₂), sendo as mandíbulas dissecadas para o processamento histotécnico e análise por biologia molecular.

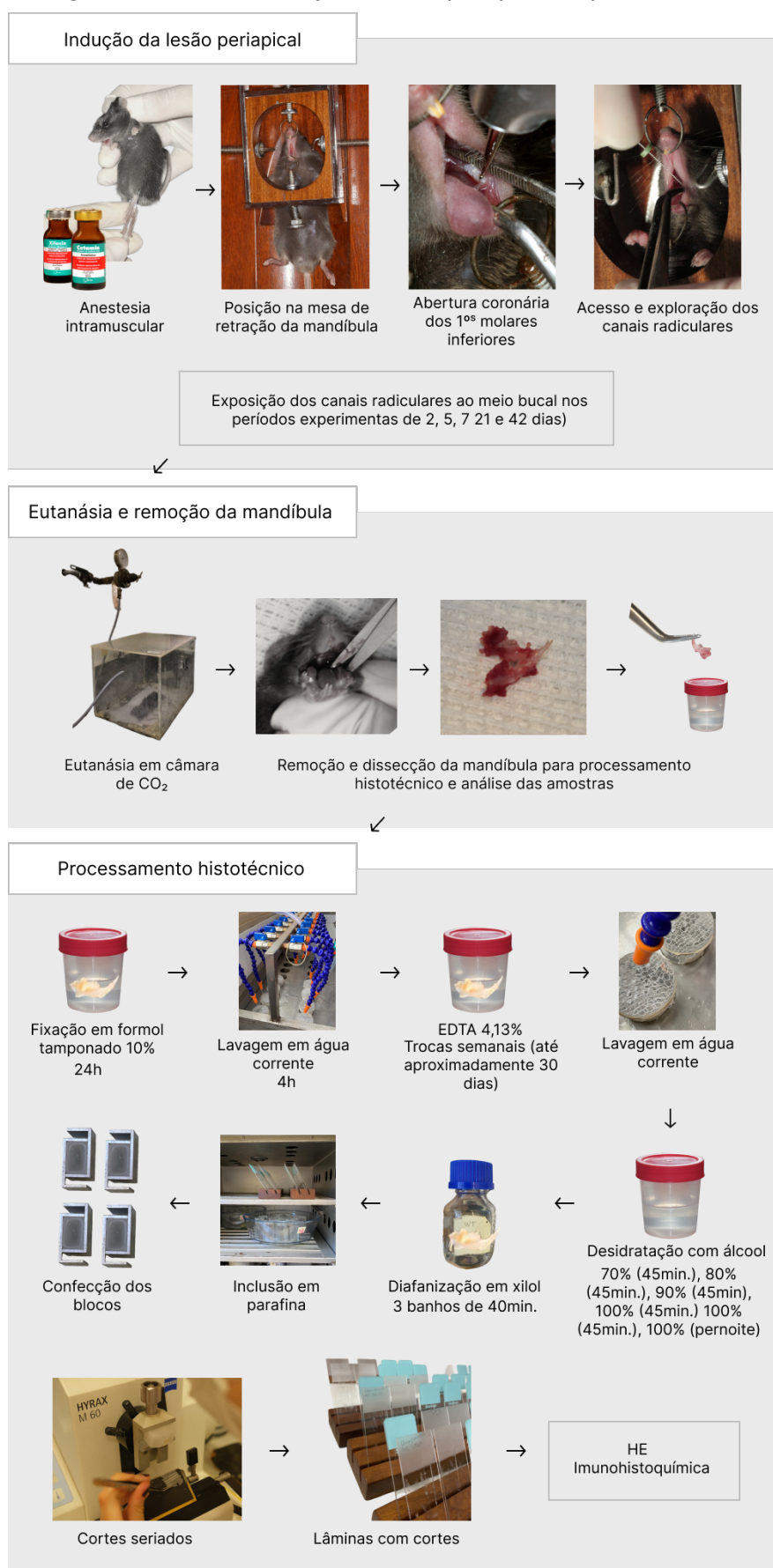
Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica

Para a realização da análise microscópica em hematoxilina e eosina (HE) e imunomarcação foram utilizadas as hemi-mandíbulas direitas dos animais em todos os períodos de avaliação.

Assim, as amostras foram fixadas por imersão em formol tamponado a 10% por 24 horas à temperatura ambiente e, em seguida, lavadas por, aproximadamente, 4 horas em água corrente. Em seguida, para a desmineralização, as peças foram mantidas na solução à base de EDTA a 4,13%, à temperatura ambiente, trocada semanalmente, até sua completa desmineralização que ocorreu, em média, após 30 dias. O grau de desmineralização das estruturas mineralizadas foi testado por meio da penetração de uma agulha nos tecidos, para verificação da sua consistência. Após a desmineralização, as peças foram submetidas ao processamento histotécnico de rotina, sendo lavadas em água corrente por 2 horas, desidratadas em álcool de concentrações crescentes (70%, 80%, 95% por 45 minutos cada; 2 trocas de 100% por 45 minutos cada e 1 troca de álcool 100% pernoite), diafanizadas em xilol (3 banhos de 40 minutos) e incluídas em parafina.

Os blocos contendo os dentes foram cortados longitudinalmente em micrótomo (Leica RM2145; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Alemanha) no sentido méso-distal. Cortes seriados de 4 μ m foram obtidos em toda a extensão da lesão periapical. Por amostra, foram obtidas de 5 a 15 lâminas, com 3 cortes em cada lâmina. A indução da lesão periapical e o processamento histotécnico estão esquematizados na Figura 25.

Figura 25. Fluxograma ilustrando a indução da lesão periapical e o processamento histotécnico.



Os cortes de cada grupo experimental e controle foram corados com HE, submetidos à análise em microscopia óptica convencional para descrição do canal radicular e das regiões apical e periapical. Assim, foram selecionados os cortes que apresentaram a raiz distal dos primeiros molares inferiores mostrando simultaneamente os terços coronário, médio e apical do canal radicular, o forame apical e o osso alveolar. Essa análise objetivou uma descrição dos aspectos microscópicos envolvidos no desenvolvimento da lesão periapical, assim como a realização de possíveis correlações com os resultados obtidos na imuno-histoquímica. Além disso, esses cortes tiveram função metodológica, uma vez que os cortes utilizados para a imunomarcação foram escolhidos após análise dos cortes corados com HE.

Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical

Para essa análise, foi utilizado o microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) e realizada por um único avaliador experiente, sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado. As características das regiões apicais e periapicais de cada grupo foram descritas e classificadas de acordo com os seguintes parâmetros avaliados (Silva et al., 2010; Silva et al., 2012):

- Tecido pulpar: com aspecto de normalidade, alteração suave do tecido (necrose parcial), necrose moderada no tecido ou necrose severa (necrose total da polpa).
- Infiltrado inflamatório do ligamento periodontal: ausente, suave, moderado e severo.
- Espessura do ligamento periodontal apical: normal, aumento suave, moderado e severo.
- Osso alveolar: ausência de reabsorção/presença de reabsorção.
- Cimento apical: ausência de reabsorção/presença de reabsorção.

Contagem de neutrófilos

Nos espécimes corados com HE, também foi realizada a contagem do

número de neutrófilos. A contagem foi realizada na região central da lesão periapical, em um campo microscópico de aproximadamente 0,01mm². Os neutrófilos foram identificados com base nas suas características morfológicas, de células escuramente coradas com núcleos multilobulados em formato de ferradura (De Rossi et al., 2008; da Silva et al., 2012) em microscopia de luz convencional com o auxílio do microscópio Axio Imager.M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha), com câmera AxioCam MRc5 acoplada (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) no aumento de 40x. Para a captura das imagens, foi utilizado o software de análise de imagens ZEN 3.4 (Zeiss ZEN lite). Os resultados foram expressos em número de células.

Mensuração das Lesões Periapicais

Foi realizada a avaliação morfométrica das lesões periapicais nos espécimes corados em HE com o auxílio do microscópio Axio Imager.M1 no aumento de 10x (Silva et al. 2019). As imagens foram transferidas para o software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, EUA), onde as áreas das lesões periapicais foram delineadas e medidas em mm². A delimitação da lesão excluiu as estruturas intactas (ligamento periodontal, cimento e osso alveolar).

Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas por meio da técnica da imunoperoxidase para marcação de elastase de neutrófilo (NE) e histona H3 (H3Cit) e para do stress oxidativo, com marcação para as enzimas oxidantes mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintase (iNOS) e antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase (GR) e catalase (CAT).

Os cortes histológicos foram desparafinizados, sendo os epítomos antigênicos recuperados com calor utilizando tampão citrato (pH=6,0) ativado em forno de micro-ondas (cinco vezes de 10 segundos). Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas 2 vezes por 10 minutos com PBS e 1 vez com solução PBS/Triton a 0,5% (Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA), pelo mesmo período. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com peróxido de hidrogênio a 3%, por 20 minutos. A seguir, as lâminas foram novamente lavadas

com PBS e PBS/Triton conforme descrito anteriormente.

O bloqueio das ligações inespecíficas foi realizado com solução de 1% BSA (albumina de soro bovino)/PBS, por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram incubadas overnight em geladeira com os anticorpos primários (Quadro 3) diluídos em BSA 1%. Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário biotilado adequado, por 1 hora à temperatura ambiente. Depois de nova lavagem, foi colocado o complexo avidina-biotina-peroxidase (ABC kit, Vecstain; Vector Laboratories Inc.) por 30 minutos. A seguir, as lâminas foram lavadas com PBS e PBS/Triton e foi efetuada a revelação da reação com solução de diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich Corporation, Saint Louis, EUA) e H₂O₂ a 3% em PBS por 1 minuto. As lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 10 segundos, lavadas em água corrente, lavadas em água amoniacal por 30 segundos, lavadas em água corrente, diafanizadas, desidratadas e montadas.

Para análise dos marcadores oxidantes (MPO e iNOS) e antioxidantes (SOD, CAT e GR), os resultados foram expressos de maneira qualitativa, levando-se em consideração a presença/ausência da marcação por meio de escores (0: ausência de marcação; 1: marcação suave; 2: marcação moderada e 3: marcação intensa) e a localização das marcações.

Para a visualização da formação de NETs, foi realizada a co-localização imuno-histoquímica dos marcadores da elastase de neutrófilos com a histona H3 citrulinada, como também da mieloperoxidase com histona H3 citrulinada. Para isso, foi feita a coloração imuno-histoquímica desses marcadores em cortes subsequentes da mesma lâmina, buscando evidenciar a co-localização de ambos os marcadores (Berger-Achituv et al., 2013; Bertasso et al., 2020; Polanco et al., 2021). Essa análise foi realizada em aumentos de 10x, 40x e 100x (Gonçalves et al., 2012). No aumento de 10x, foram escolhidas as áreas que apresentavam maior quantidade de células imunomarcadas. No aumento de 40x, foram capturadas imagens representativas de cada espécime com o auxílio do software de análise de imagens ZEN 3.4 (Zeiss ZEN lite) para realizar a marcação e contagem extracelular de cada marcador (destacados com pontos vermelhos a marcação de MPO e NE e amarelos a da histona). As imagens subsequentes foram sobrepostas com auxílio do software Adobe Photoshop

(Adobe Systems Incorporated) e o número de pontos sobrepostos positivos para marcação extracelular foi contado. Os resultados expressos em número de pontos sobrepostos por espécime. No aumento de 100x, foram fotografadas regiões da lesão periapical representativas, evidenciando marcações extracelulares e formação das armadilhas extracelulares de neutrófilos. Todas as análises foram realizadas por um único avaliador experiente, sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado utilizando um microscópio Axio Imager. M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) sob luz convencional.

Quadro 3. Anti-corpos utilizados e suas respectivas diluições e especificações para as reações de imuno-histoquímica.

Anti-corpo	Diluição	Empresa (nº catálogo)
Anti-Elastase de neutrófilos	1:25	Abcam (ab68672)
Anti-Histona H3	1:200	Abcam (ab5103)
Anti-iNOS	1:800	ABclonal (A0312)
Anti-SOD1	1:200	ABclonal (A0274)
Anti-Catalase	1:100	Bioss (bs-6874R)
Anti-GLUR	1:50	Bioss (bs-0837R)
Anti-Mieloperoxidase	1:4000	ABclonal (A1374)

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

Foram utilizadas as hemi-mandíbulas esquerdas de todos os animais em todos os períodos.

Extração de RNA total

As hemi-arcadas foram submetidas à extração de RNA usando o protocolo do fabricante do kit PureLink RNA Mini Kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A quantidade de RNA extraído foi estimada com o auxílio do NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE).

Síntese de cDNA

A partir de 1µg de RNA total foi confeccionada a fita de DNA complementar (cDNA) por uma reação de transcrição reversa, baseado no protocolo proposto pelo fabricante do kit High Capacity (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA).

Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

A reação de amplificação de cada gene foi constituída por primers específicos de cDNA, sonda fluorescente específica, o sistema de fluorescência TaqMan (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), e reagente MasterMix (Applied Biosystems). A expressão dos genes gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase (Gapdh) e β-actina (Actb) foi analisada como genes constitutivos (*housekeeping*). Com esta técnica, foi avaliada a expressão de RNAm de elastase de neutrófilo (NE) e histona H3 (H3Cit) e para do stress oxidativo, com marcação para as enzimas oxidantes mieloperoxidase (MPO) e óxido nítrico sintase (iNOS) e antioxidantes, superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase (GR) e catalase (CAT) (Quadro 4).

Quadro 4. Descrição dos genes utilizados para a reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Função do gene	Símbolo	Nome do gene	Assay ID
Formação de ROS e RNS	MPO	Mpo	Mm 01298424_m1
	iNOS	Nos2	Mm 00440502_m1
Produção de antioxidantes	CAT	Cat	Mm 00437992_m1
	SOD	Sod1	Mm 01344233_g1
	GR	Gsr	Mm 00439154_m1
Formação de NETs	NE	Elane	Mm 00469310_m1
	H3Cit	H3f3a	Mm 1612808_g1
Genes constitutivos	ACTB	Actb	Mm 02619580_g1
	GAPDH	Gapdh	Mm 99999915_g1

A análise quantitativa da expressão de RNAm foi realizada por meio do StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA), sob condições de 95°C (2 minutos), seguidas por 40 ciclos de 95°C (1 segundo) e 60°C (20 segundos). As reações foram realizadas em duplicata para cada amostra. Após a amplificação das amostras, a quantificação relativa foi realizada por meio do método 2-ΔΔCt.

Análise Estatística

A comparação da extensão da área da lesão periapical e da quantidade de neutrófilos entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e dos resultados da imuno-histoquímica pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e de Mann-Whitney, por meio do programa computacional GraphPad Prism 9 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

A inferência e os testes de hipótese dos dados da expressão gênica foram realizados através do ANOVA com pós teste utilizando contrastes ortogonais assumindo e considerando a normalidade dos resíduos, para este caso foi utilizado o software SAS/STAT® em sua versão online (Van Rossum e Drake, 2013; Montgomery, 2017). O nível de significância adotado para todas as análises foi de 5%.

RESULTADOS

Análise Microscópica Descritiva do Conteúdo do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical

No grupo de dentes hígidos sem indução de lesão periapical, o tecido pulpar se apresentava sadio e o ligamento periodontal se encontrava com aspecto de normalidade, tanto na espessura como em suas características, com ausência de infiltrado inflamatório. A média da área do ligamento periodontal foi de $0,03\text{mm}^2$, compatível com um tecido saudável. Além disso, as superfícies cementária e osso alveolar estavam regulares e íntegras.

Após 2 dias da indução da lesão periapical, o tecido pulpar se mostrava alterado, já com necrose parcial e o ligamento periodontal apresentava espessura normal, com infiltrado inflamatório suave e apresentando média de $0,04\text{mm}^2$. O osso alveolar e a superfície cementária apresentavam com ausência de reabsorções.

No grupo de 5 dias, o tecido pulpar também se encontrava alterado, com necrose parcial. Porém, o ligamento periodontal se apresentava variando de normal a aumentado, com infiltrado inflamatório suave. A média da extensão da área apical foi de $0,06\text{mm}^2$. Foi observada ausência de reabsorção do osso alveolar e da superfície cementária.

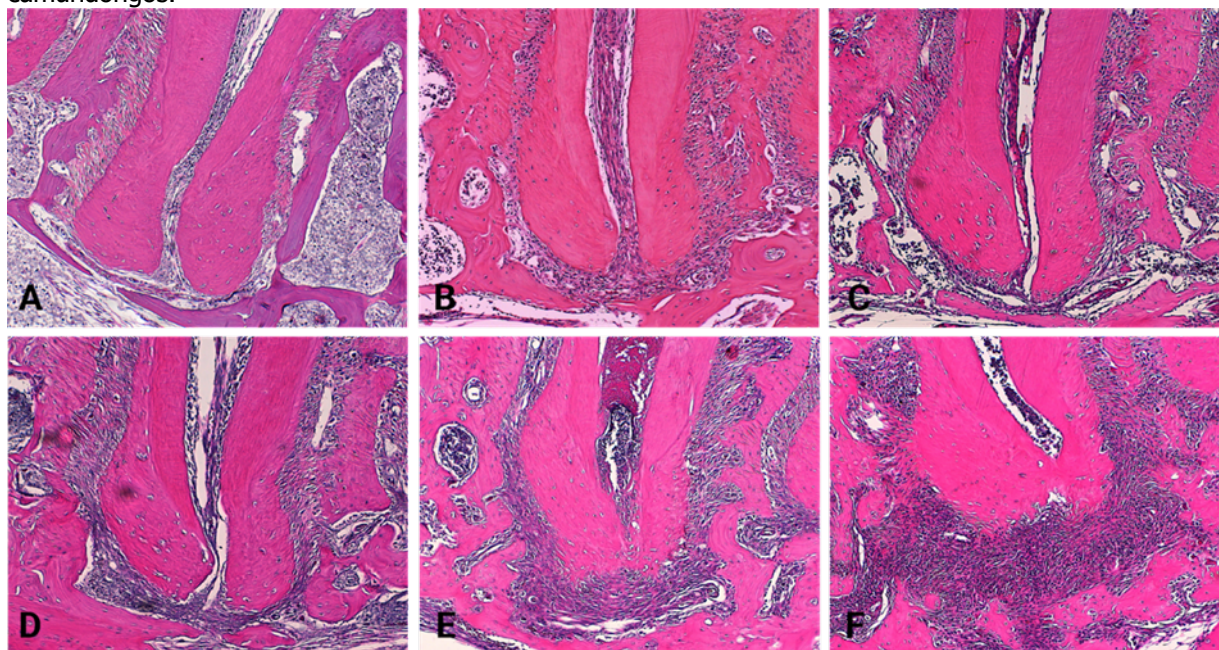
No período de 7 dias, o tecido pulpar já se encontrava totalmente necrosado. O ligamento periodontal estava suave e moderadamente aumentado, com infiltrado inflamatório de suave a moderado. A média da lesão foi $0,09\text{mm}^2$. O osso alveolar e a superfície cementária apresentaram ausência de reabsorção.

Aos 21 dias, o tecido pulpar estava totalmente necrosado e a espessura do ligamento periodontal moderadamente ou severamente aumentado, com infiltrado inflamatório, moderado ou severo. A média da lesão periapical foi de $0,14\text{mm}^2$. O osso alveolar apresentava presença de reabsorção. Entretanto, foi observada ausência de reabsorção na superfície cementária.

Após 42 dias, todos os espécimes apresentavam o tecido pulpar totalmente necrosado. O ligamento periodontal se apresentava severamente aumentado, com infiltrado inflamatório também severo. A média do tamanho da lesão periapical progrediu apresentando $0,22\text{mm}^2$. Tanto o osso alveolar, como a superfície cementária apresentavam reabsorção.

A Figura 26 ilustra as imagens representativas obtidas após análise em HE dos grupos controle (hígido) e dos grupos experimentais que demonstram a progressão da lesão periapical ao longo dos tempos experimentais de 2, 7, 14, 21 e 42 dias.

Figura 26. Fotomicrografias representativas após coloração com HE das amostras provenientes do grupo controle (dente hígido – A) e dos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em dentes de camundongos.



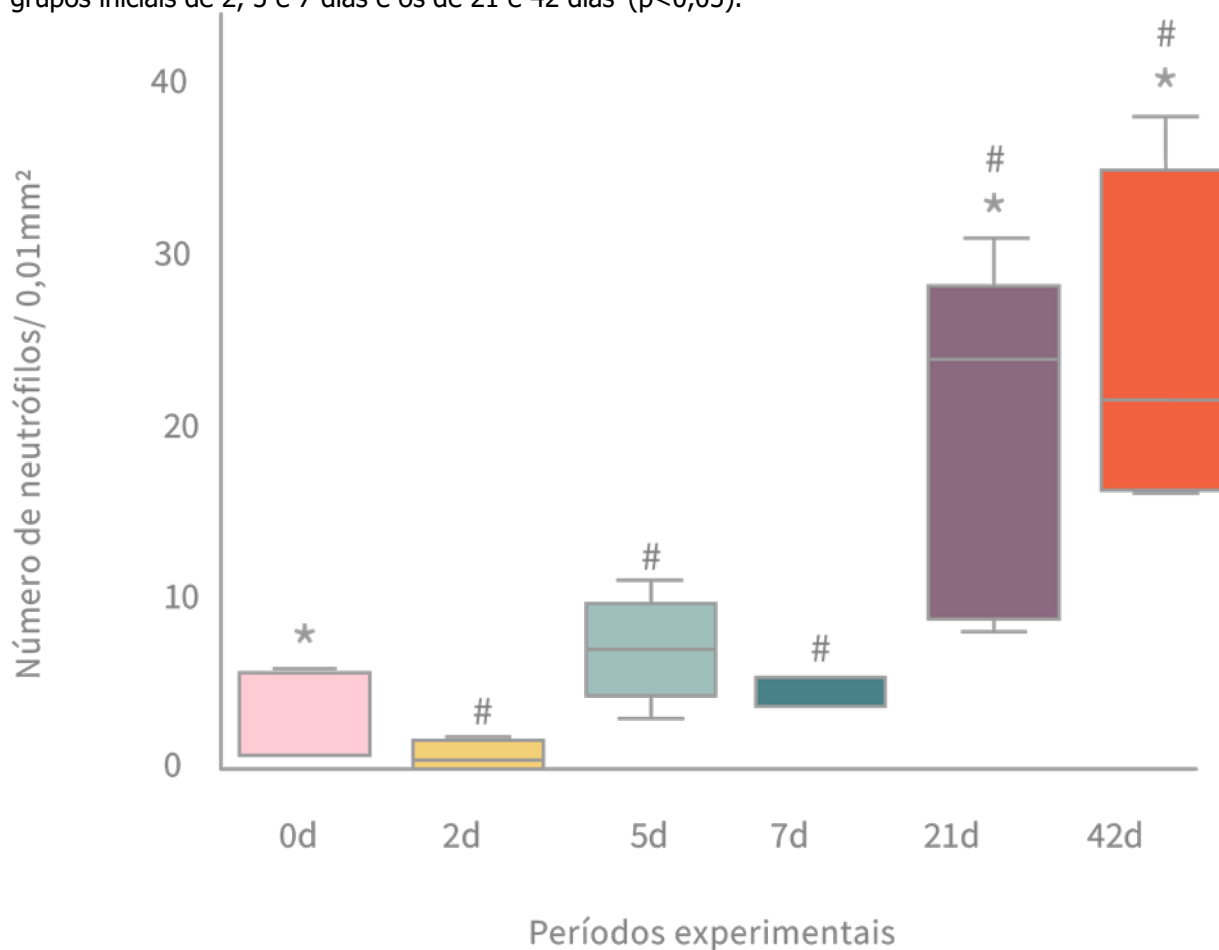
De uma maneira geral, os resultados obtidos na análise microscópica descritiva permitiram evidenciar que:

- Os períodos iniciais de 2 e 5 dias apresentavam necrose pulpar parcial e a partir dos 7 dias a havia necrose total da polpa.
- A partir dos 2 dias, houve aumento progressivo do espaço do ligamento periodontal, de normal até severamente aumentado aos 42 dias.
- Infiltrado inflamatório na região periapical aumentou progressivamente, presente aos 2 dias de forma leve até severo aos 42 dias.
- A reabsorção óssea esteve presente a partir dos 21 dias.
- A reabsorção cementária esteve presente apenas aos 42 dias.

Contagem de neutrófilos

A Figura 27 representa os dados obtidos ao longo do tempo, nos diferentes períodos experimentais, com relação ao número de neutrófilos. Os períodos de 21 e 42 dias apresentaram maior quantidade de neutrófilos, com diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$) e aos demais períodos de 2, 5 e 7 dias após indução da lesão periapical ($p < 0,05$).

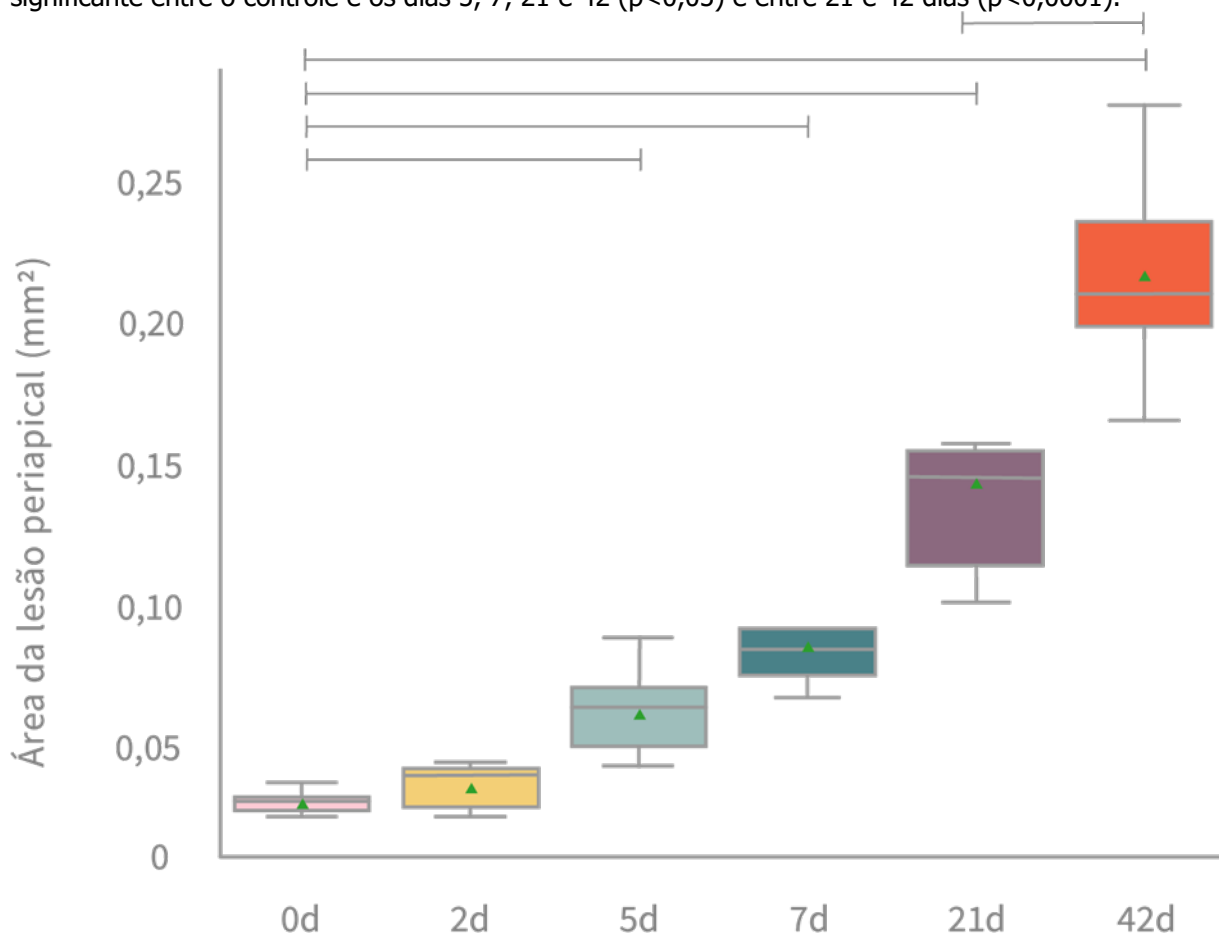
Figura 27. Representação gráfica do número de neutrófilos na região periapical nos períodos experimentais de 0, 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Asterisco (*) significa diferença estatística significativa entre o grupo controle e o de 21 e 42 dias ($p < 0,05$). Hashtag (#) significa diferença significativa entre os grupos iniciais de 2, 5 e 7 dias e os de 21 e 42 dias ($p < 0,05$).



Mensuração das Lesões Periapicais

A análise morfométrica das lesões periapicais nos diferentes períodos experimentais permitiu evidenciar um aumento gradativo do tamanho ao longo do tempo. A área da lesão periapical apresentou aumento estatisticamente significativo a partir dos 5 dias ($p = 0,01$), em comparação ao grupo controle, progredindo nos períodos de 7, 21 e 42 dias também com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle ($p \leq 0,0001$). O período de 42 dias apresentou o maior tamanho da lesão, com diferença significativa de todos os outros grupos ($p < 0,0001$) (Figura 28).

Figura 28. Representação gráfica da comparação entre o grupo controle e os períodos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias com relação à área das lesões periapicais. Diferença estatisticamente significativa entre o controle e os dias 5, 7, 21 e 42 ($p < 0,05$) e entre 21 e 42 dias ($p < 0,0001$).

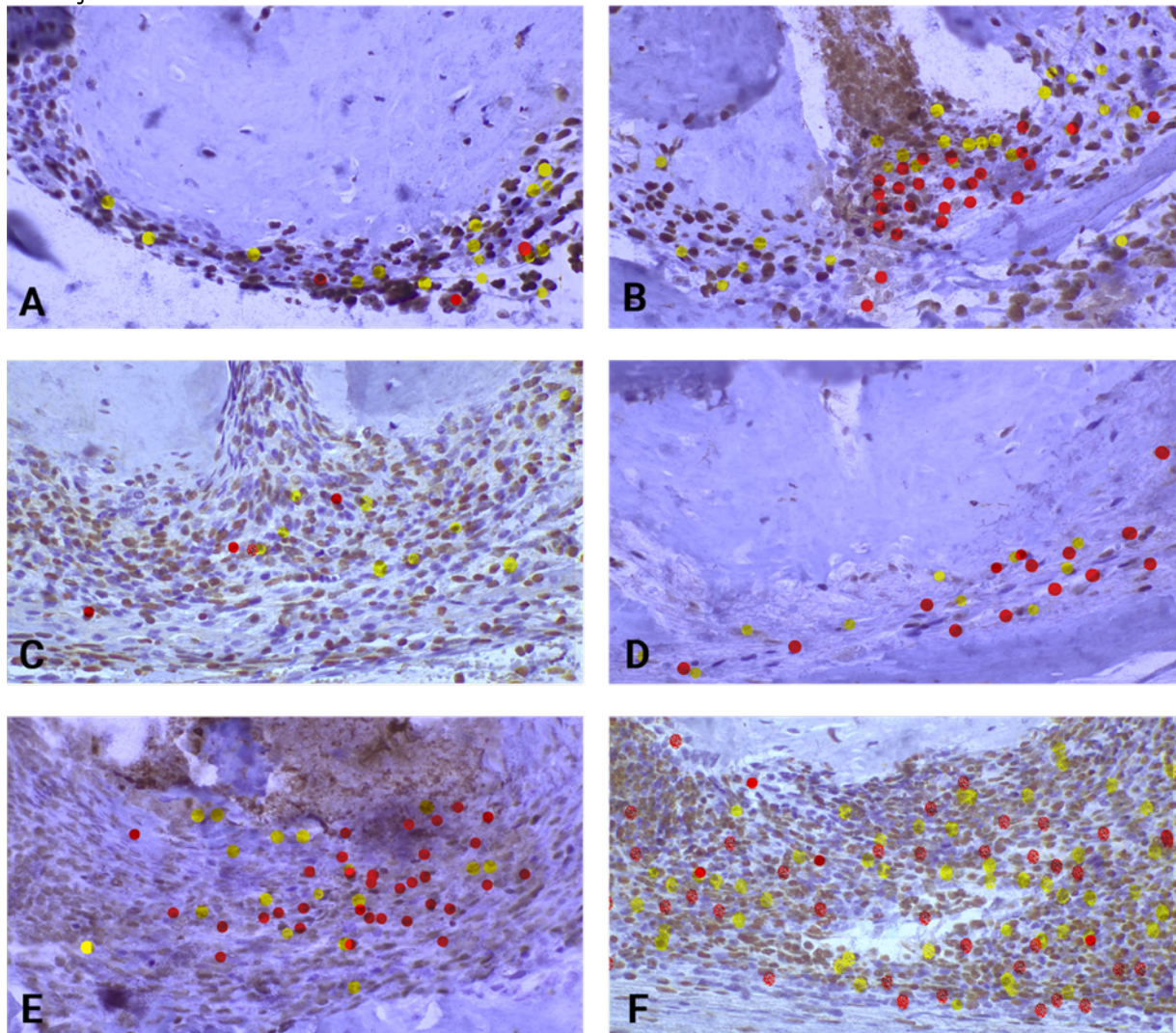


Imuno-histoquímica

Imunomarcacão de NETs (MPO+H3Cit)

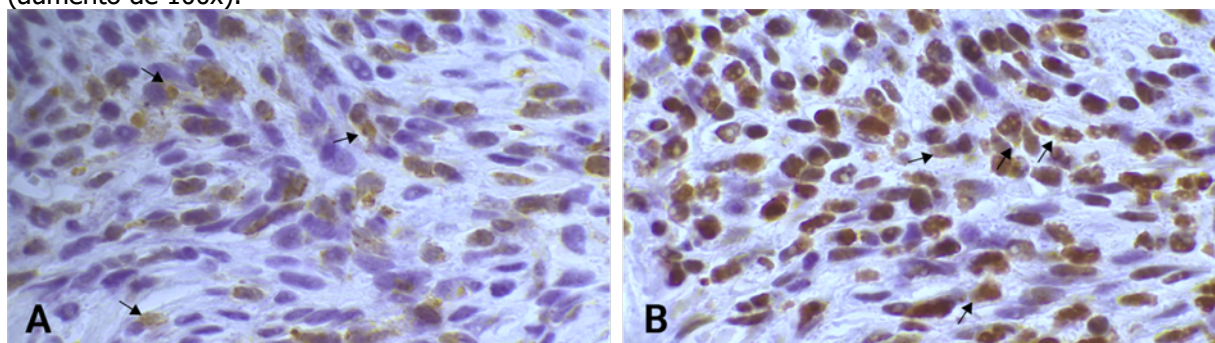
A co-localização imuno-histoquímica das enzimas mieloperoxidase (MPO) e histona H3 citrulinada (H3Cit) aumentou ao longo dos períodos experimentais, presente próximo ao forame apical e no ligamento periodontal nos períodos de 2, 5 e 7 dias, sendo observado maior sobreposição desses marcadores nos grupos de 21 e 42 dias nas lesões periapicais (Figura 29).

Figura 29. Fotomicrografias representativas da expressão dos marcadores MPO e H3Cit em cortes subsequentes na lesão periapical nos dias 0 (A), 2 (B), 5 (C), 7 (D), 21 (E) e 42 (F) (aumento de 40x. As marcações em vermelho indicam MPO extracelular e as marcações amarelas indicam H3Cit extracelular. A sobreposição de ambos os marcadores indicam regiões de co-localização, sugerindo a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos.



Foi observada a co-localização da proteína enzimática MPO e histona H3 citrulinada, marcadas no meio extracelular como demonstrado na Figura 30.

Figura 30. Fotomicrografia representativa para evidenciar a marcação extracelular (setas pretas). (A) imunomarcção de MPO. (B) imunomarcção de H3Cit, presentes na lesão periapical aos 42 dias (aumento de 100x).



Observou-se diferença estatística entre os períodos ($p=0,0049$) pelo teste de Kruskal-Wallis e entre o grupo controle e o de 42 dias ($p<0,05$) com o pós-teste de Dunn. Quando comparado dois a dois, pelo teste de Mann Whitney, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os grupos de 21 e 42 dias ($p=0,0265$), entre o grupo de 42 dias e os de 2, 5 e 7 dias ($p<0,05$) e entre o grupo de 21 dias e o de 5 e 7 dias ($p<0,05$).

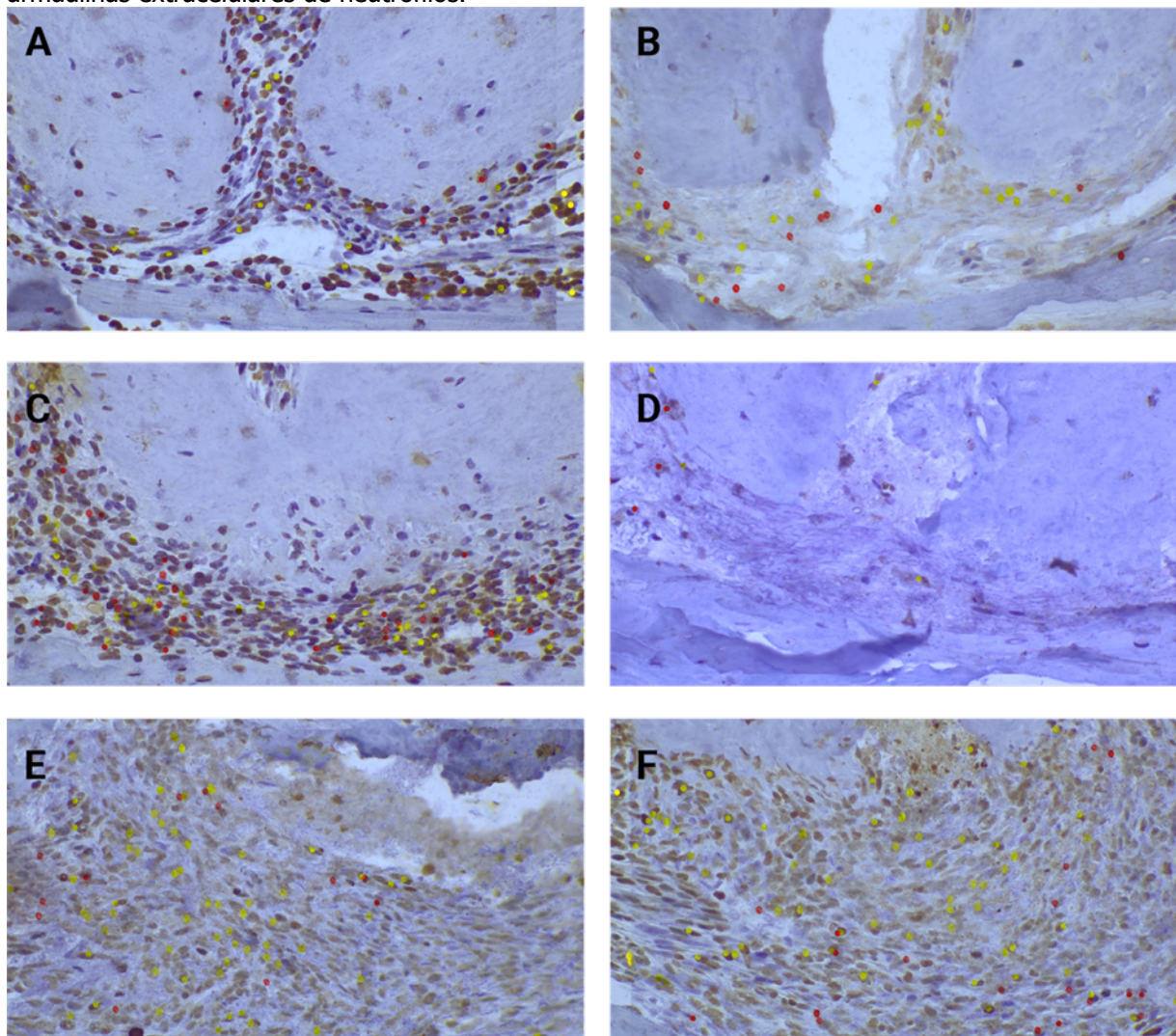
Imunomarcção de NETs (NE+H3Cit)

Foi observada a co-localização das enzimas elastase de neutrófilos (NE) e histona H3 citrulinada (H3Cit) no ligamento periodontal e na lesão periapical nos períodos de 5 dias, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical. Não houve co-localização desses marcadores nos períodos de 2 e 7 dias.

Houve diferença estatística significativa entre os períodos ($p=0,0247$) pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando comparados dois a dois, pelo teste de Mann Whitney, observou-se diferença entre o grupo controle e o de 21 ($p=0,0319$) e 42 dias ($p=0,0207$). Além disso esses grupos (21 e 42 dias) também apresentaram diferença dos grupos de 2 e 7 dias ($p<0,05$). Os demais períodos não foram estatisticamente diferentes entre si.

Os achados microscópicos observados na imuno-histoquímica para esses marcadores estão representados na Figura 31.

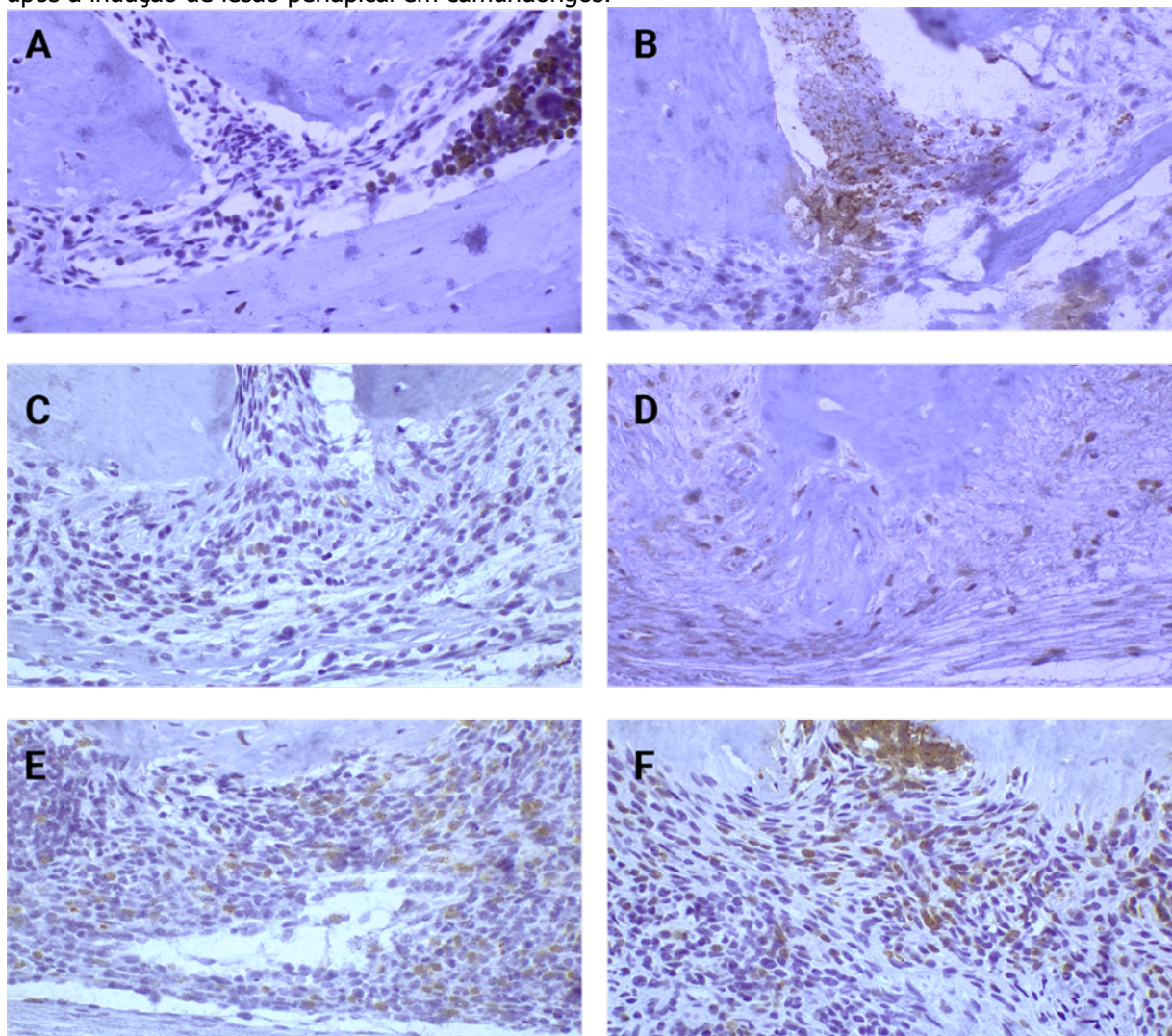
Figura 31. Fotomicrografias representativas da expressão dos marcadores NE e H3Cit em cortes subsequentes na lesão periapical nos dias 0 (A), 2 (B), 5 (C), 7 (D), 21 (E) e 42 (F) (aumento de 40x). As marcações em vermelho indicam NE extracelular e as amarelas indicam H3Cit extracelular. A sobreposição de ambos os marcadores indicam regiões de co-localização, sugerindo a formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos.



Imunomarcacão das enzimas oxidantes (MPO e iNOS)

A mieloperoxidase (MPO) esteve presente em todos os grupos, sendo encontrada no ligamento periodontal de forma leve no grupo controle (dente hígido) e nos períodos iniciais (2, 5 e 7 dias) (Figura 32A-D). Foi observada marcação significativamente maior nos períodos de 21 e 42 dias em relação aos demais grupos ($p < 0,05$), sendo a marcação nesses períodos crônicos moderada no forame apical e na lesão periapical (Figura 32E e 32F).

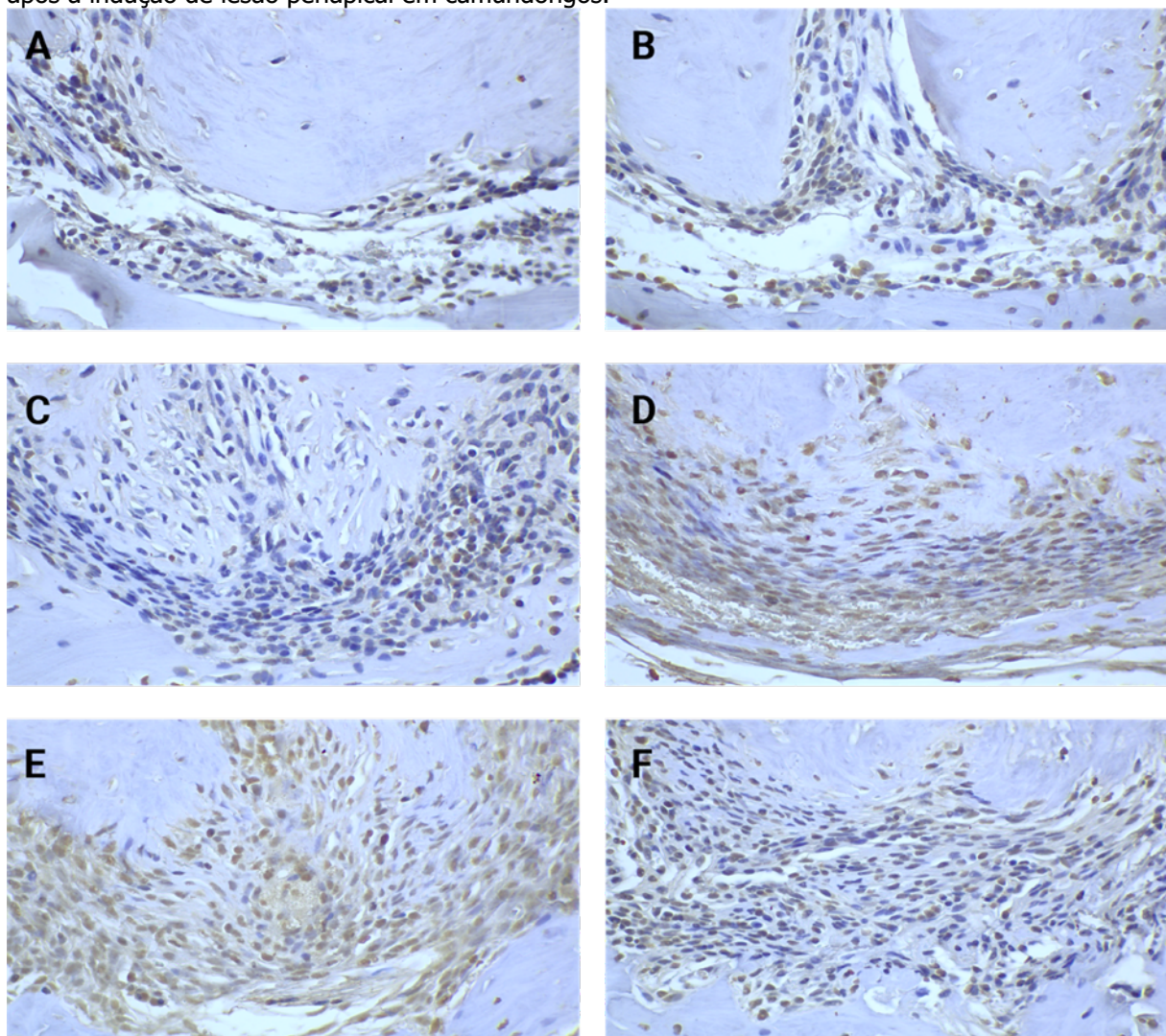
Figura 32. Fotomicrografias representativas após imunomarcacão com anticorpo anti-mieloperoxidase de amostras provenientes do grupo controle (dente hígido – A) e dos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.



A imunomarcacão de óxido nítrico sintase (iNOS) esteve presente em todos os períodos experimentais. Observou-se que a marcação aumentou ao longo do tempo, sendo no grupo controle (dente hígido) e de 2 dias leve a moderada no terço apical do canal radicular e ao longo do ligamento periodontal (Figura 33 A e B). No grupo de 5 dias, a marcação se apresentou leve a severa próximo ao forame apical, no ligamento periodontal e próximo ao osso alveolar (Figura 33C). Já aos 7 dias, a marcação foi moderada no ligamento periodontal e próximo ao osso alveolar (Figura 33D). Nos períodos mais tardios (21 e 42 dias), as células presentes na lesão periapical e próximas ao osso alveolar dos grupos estavam marcadas de forma moderada a severa (Figura 33 E e F).

Quando comparados os grupos dois a dois pelo teste de Mann Whitney, o período do dia 5 apresentou diferença estatística significativa do grupo de 2 ($p=0,05$) e 7 dias ($p=0,01$) e o grupo de 7 dias foi diferente do período de 42 dias ($0,03$).

Figura 33. Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo anti-óxido nítrico sintase induzível de amostras provenientes do grupo controle (dente hígido – A) e dos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.

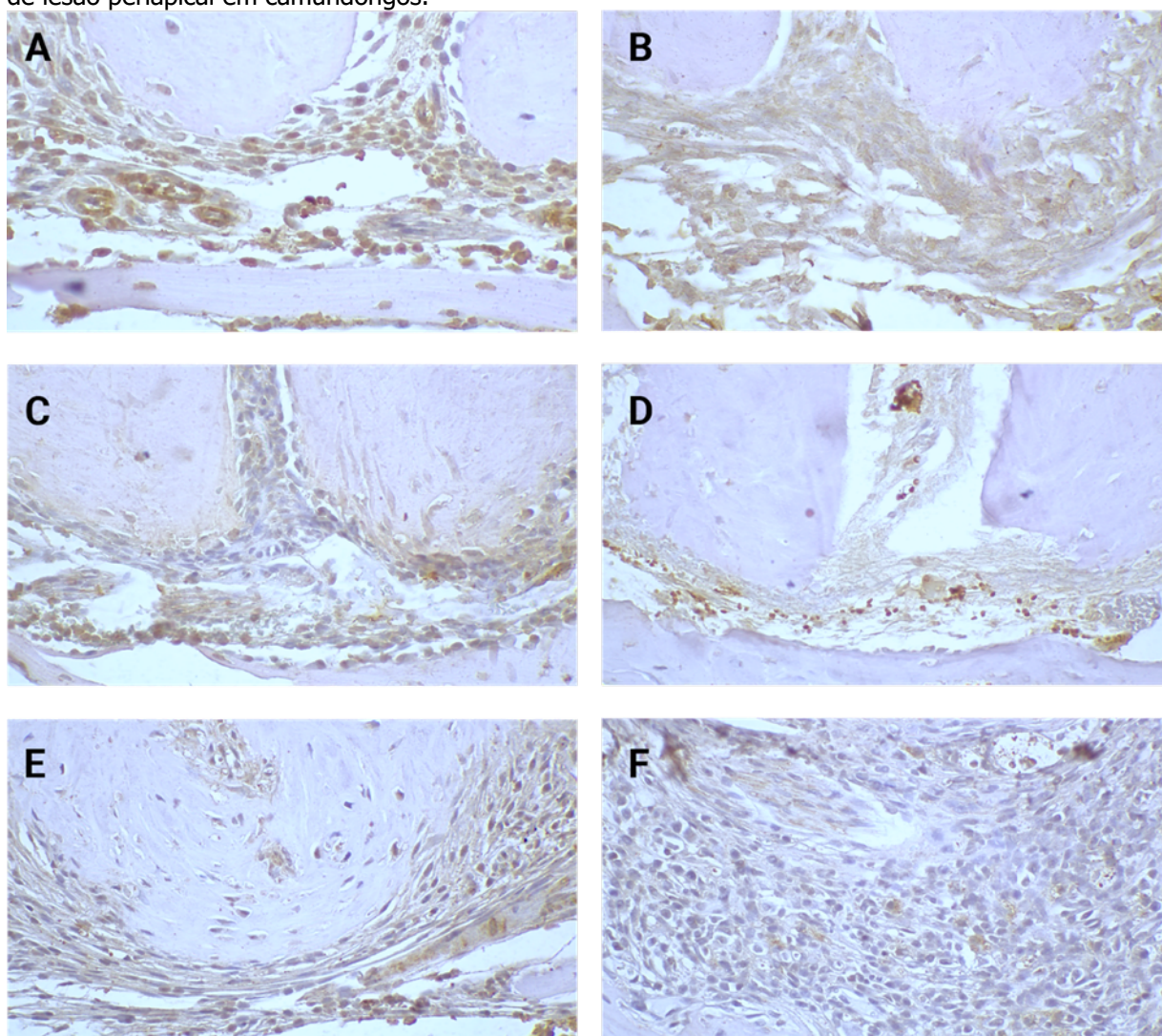


Imunomarcção das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GR)

A marcação de superóxido dismutase (SOD) esteve presente em todos os grupos, sendo predominantemente leve, mas também foi encontrada de forma moderada, tanto no terço apical do canal radicular como no ligamento periodontal dos grupos Controle e de 2 dias (Figura 34 A e B). Aos 5 e 7 dias, a marcação foi leve a moderada no terço apical do canal radicular e na região apical (Figura 34 C e

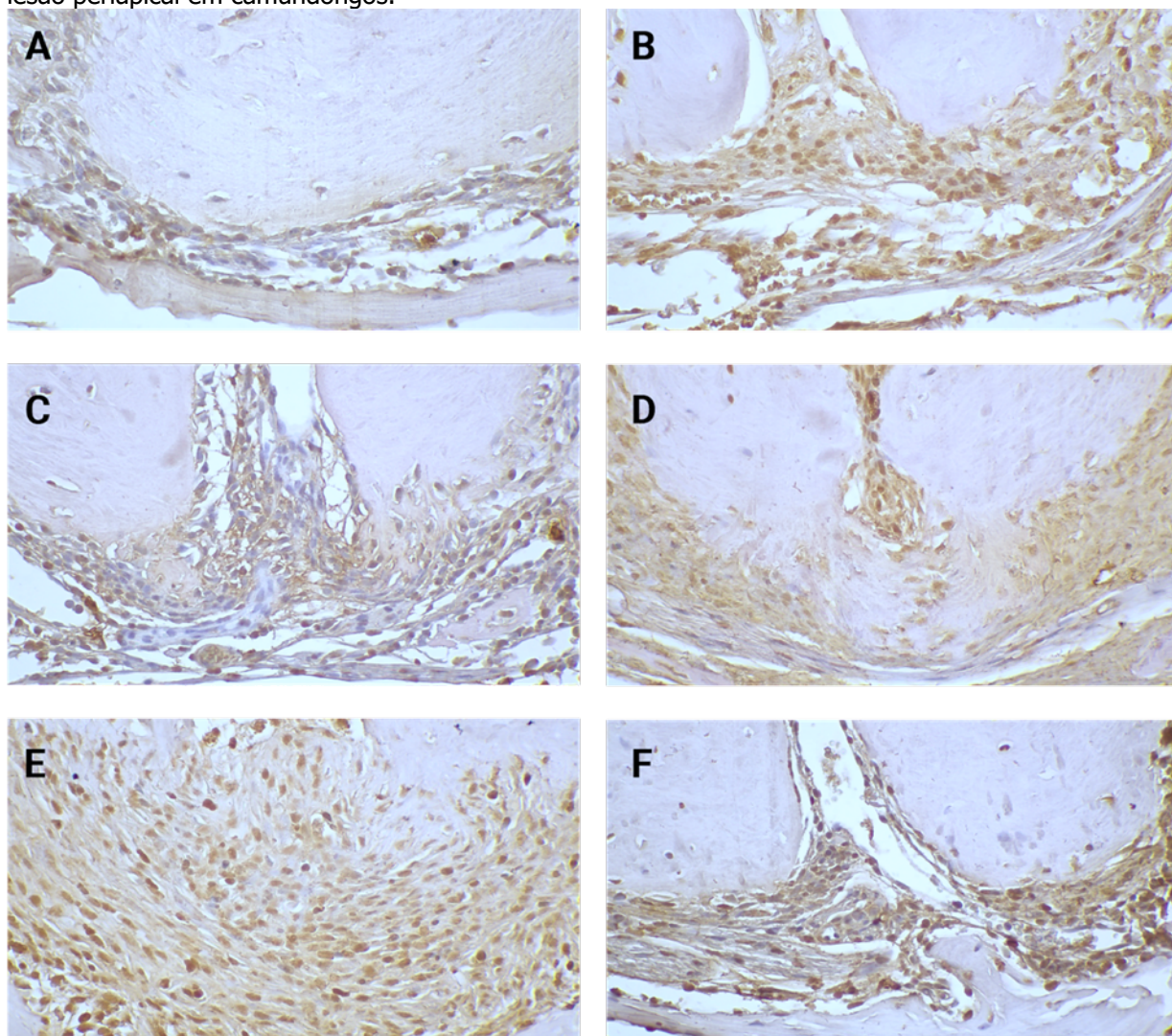
D). Aos 21 e 42 dias, embora tenha sido observada algumas marcações leves, a marcação moderada a severa foi predominante na lesão periapical (Figura 34 E e F). Porém, não foi observada diferença estatística entre os períodos experimentais pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn ($p > 0,05$).

Figura 34. Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo anti-superóxido dismutase de amostras provenientes do grupo controle (dente hígado – A) e dos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.



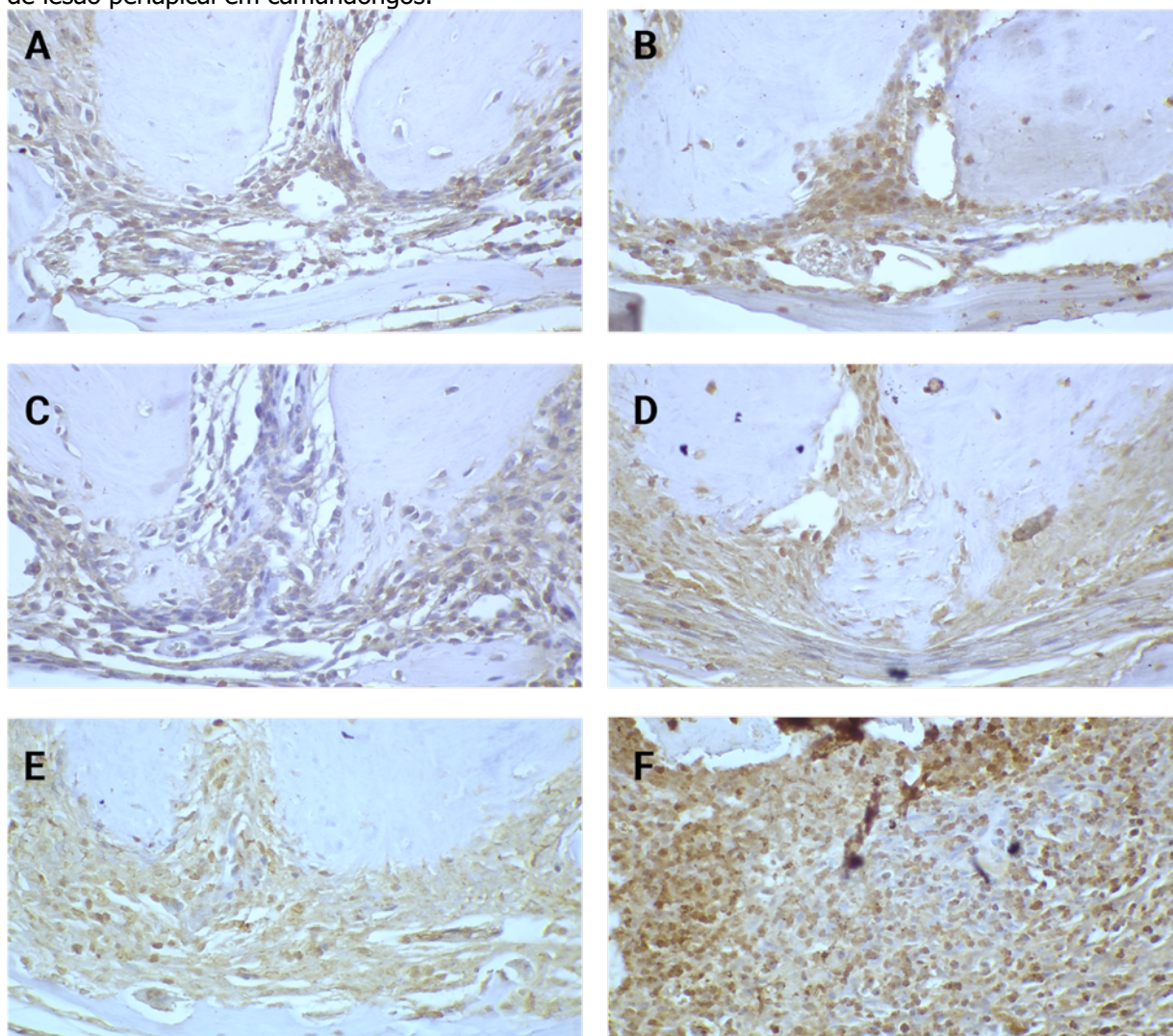
A catalase (CAT) esteve presente no ligamento periodontal do grupo controle e no terço apical do canal radicular aos 2, 5 e 7 dias de forma moderada a severa (Figura 35 A-D). Aos 21 e 42 dias, a marcação também foi de moderada a severa, com marcações mais severas na lesão (Figura 35 E e F). Não houve diferença estatística entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p > 0,05$).

Figura 35. Fotomicrografias representativas após imunomarcação com anticorpo anti-catalase de amostras provenientes do grupo controle (dente hígido – A) e dos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.



Observou-se a marcação de glutathiona redutase (GR) de forma leve a moderada nos grupos controle e aos 2, 5 e 7 dias, presente no terço apical do canal radicular e ligamento periodontal (Figura 36 A-D). No forame apical e na lesão periapical dos grupos de 21 e 42 dias houve marcação predominante moderada a severa, apesar de algumas marcações leves também (Figura 36 E e F), não apresentando diferenças entre os períodos experimentais pelo teste de Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn ($p > 0,05$).

Figura 36. Fotomicrografias representativas após imunomarcção com anticorpo anti-glutationa redutase de amostras provenientes do grupo controle (dente hígido – A) e dos grupos experimentais nos diferentes períodos de 2 dias (B), 5 dias (C), 7 dias (D), 21 dias (E) e 42 dias (F) após a indução de lesão periapical em camundongos.



De forma geral, os resultados obtidos após a realização do ensaio de imunohistoquímica para formação de NETs (H3Cit+NE e H3Cit+MPO), para as enzimas oxidantes (MPO, iNOS) e antioxidantes (CAT, GR e SOD) permitiram evidenciar que:

- A co-localização de NE e H3Cit esteve presente nos períodos de 5, 21 e 42 dias e ausente nos períodos de 2 e 7 dias.
- A co-localização de MPO e H3Cit esteve presente em todos os períodos experimentais avaliados, sendo maiores nos períodos de 21 e 42 dias.
- Todas as enzimas oxidantes e antioxidantes propostas no presente estudo estiveram presentes em todos os períodos experimentais avaliados.
- A MPO (oxidante) apresentou imunomarcção preferencialmente leve tanto no

- grupo controle quanto nos períodos de 2, 5, e 7 dias, aumentando sua nos períodos de 21 e 42 dias.
- A iNOS (oxidante) apresentou imunomarcção de leve a moderada nos grupos controle e 2 dias, aumentando progressivamente a intensidade de sua marcação nos períodos subsequentes.
 - A SOD (antioxidante) apresentou imunomarcção leve tanto no grupo controle quanto no período de 2 dias, aumentando a intensidade, com marcação leve a moderada aos 5 e 7 dias e moderada a severa aos 21 e 42 dias.
 - A CAT (antioxidante) apresentou imunomarcção de moderada a severa tanto no grupo controle como nos demais grupos (2, 5, 7, 1 e 42 dias).
 - A GR (antioxidante) apresentou imunomarcção leve tanto no grupo controle como nos grupos iniciais (2, 5 e 7 dias), aumentando sua intensidade para moderada a severa nos períodos de 21 e 42 dias.

Expressão gênica - qRT-PCR

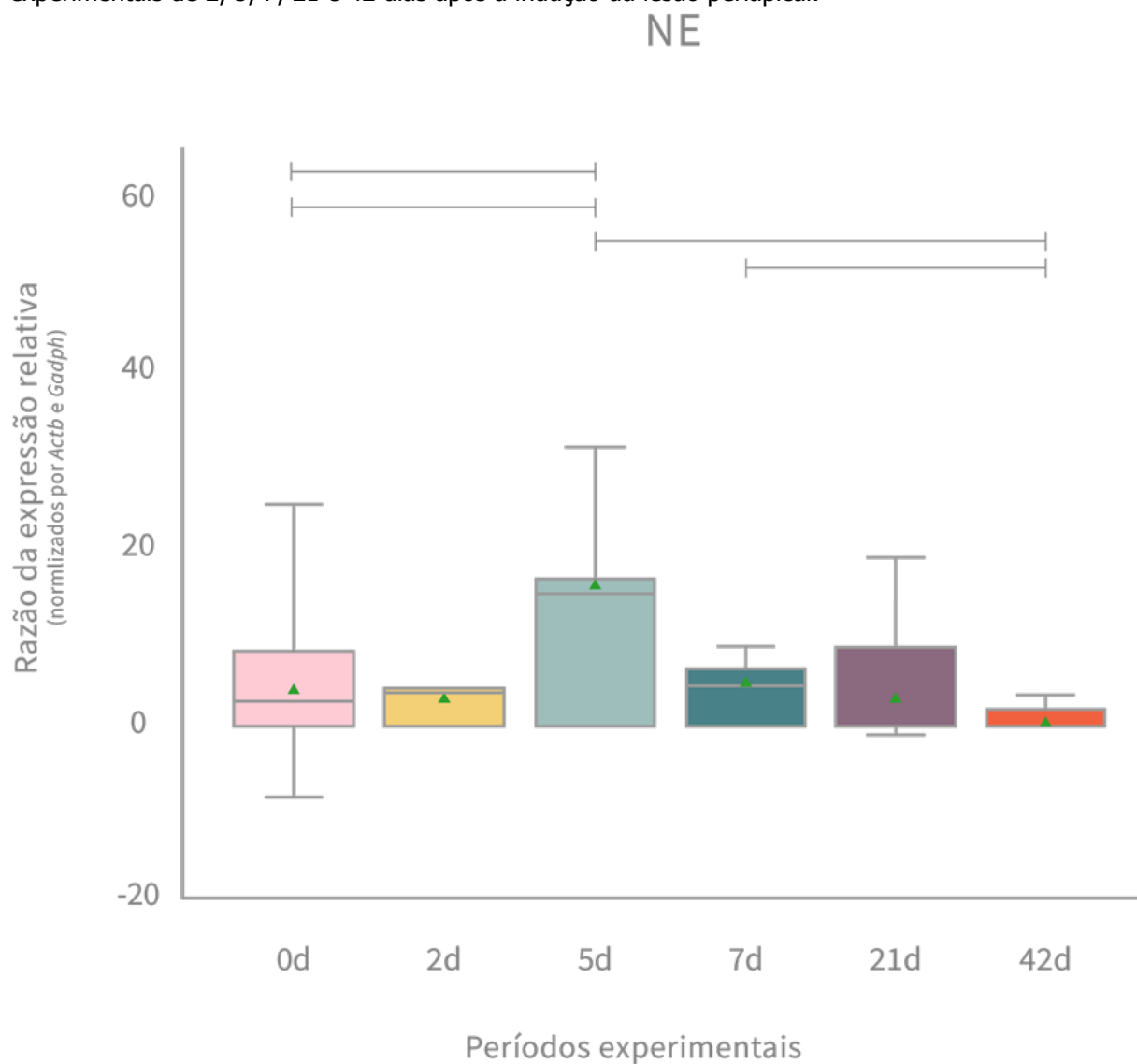
Com o objetivo de avaliar a expressão de NETs, enzimas oxidantes e antioxidantes em função do tempo, foram coletadas amostras nos tempos 0 dia (controle), 2, 5, 7, 21 e 42 dias, para análise por PCR em tempo real.

Marcadores de NETs (NE e H3Cit)

A expressão gênica de elastase de neutrófilo (NE) e histona H3 (H3Cit), relacionados à formação de NETs, variou ao longo do tempo. Ambos os genes apresentaram o pico da expressão no grupo de 5 dias após a indução da lesão periapical.

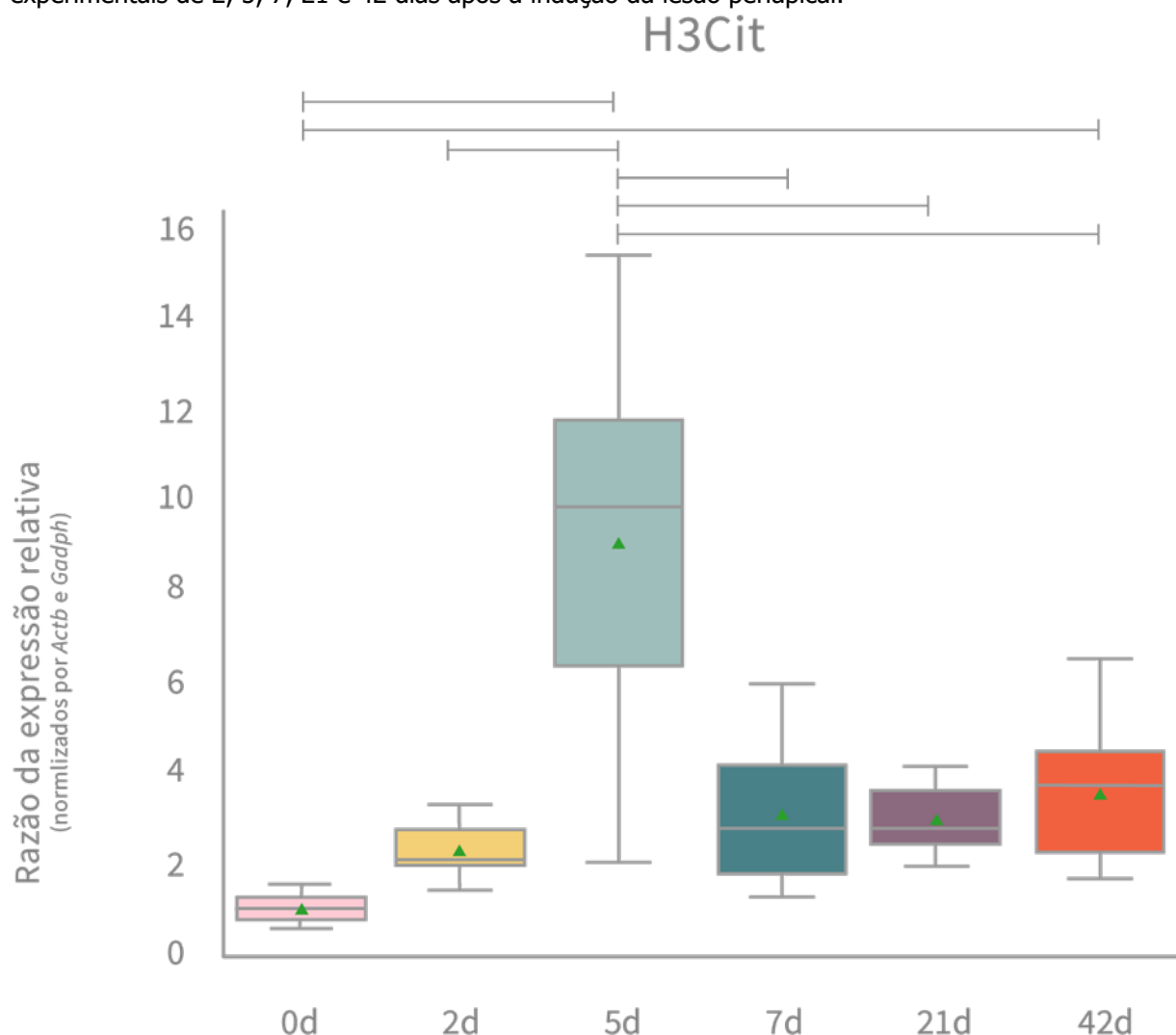
Com relação à NE, houve diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os períodos de 5 e 7 dias ($p < 0,05$). Além disso, esses períodos experimentais apresentaram diferença estatística do período de 42 dias ($p < 0,05$), que apresentou menor expressão desse gene (Figura 37).

Figura 37. Representação gráfica da expressão gênica de NE para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical.



A expressão de H3Cit foi significativamente maior nos períodos de 5 e 42 dias em comparação com o grupo controle ($p < 0,05$). O grupo de 5 dias apresentou diferença estatística significativa entre todos os grupos experimentais ($p < 0,0001$) (Figura 38).

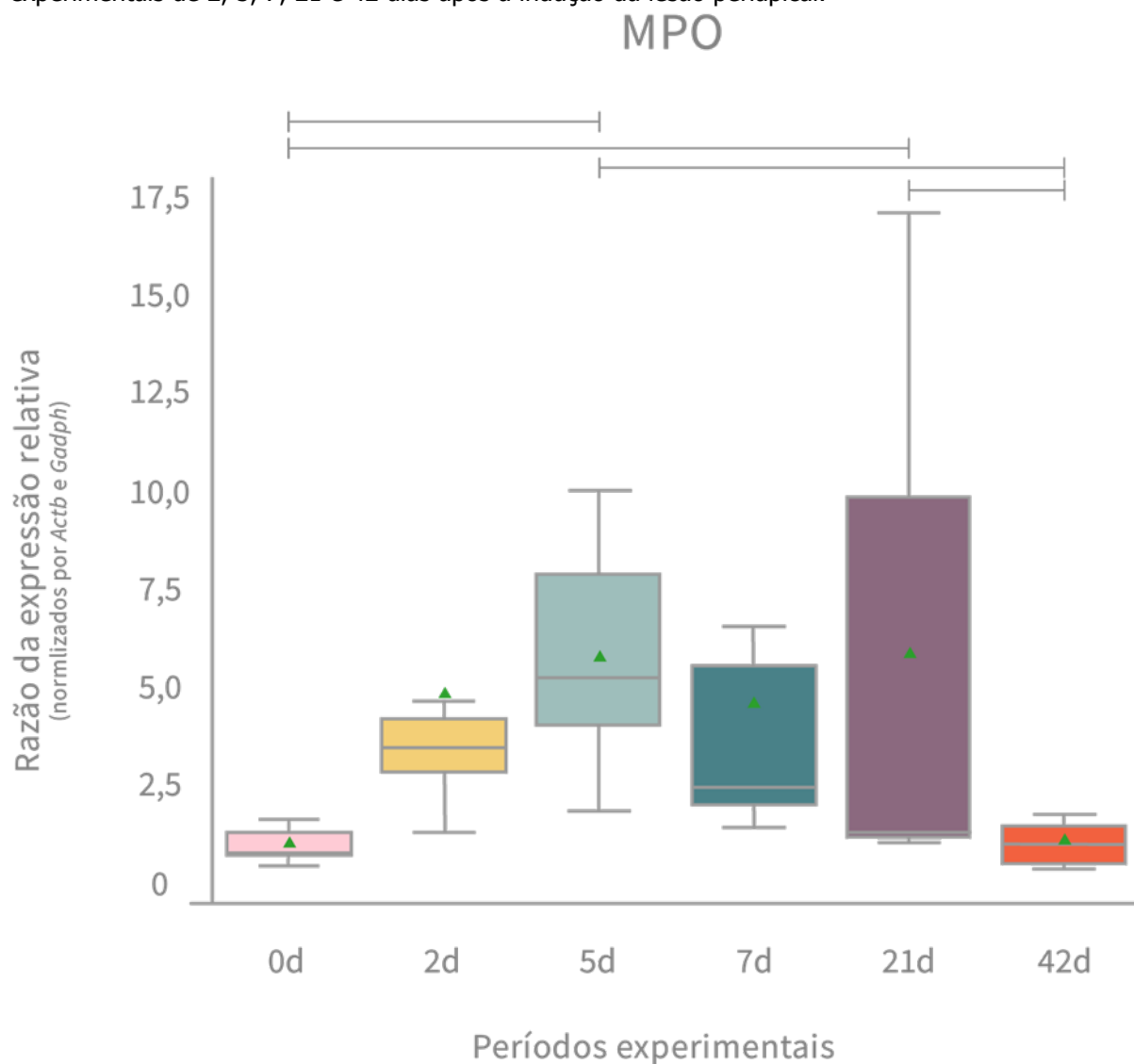
Figura 38. Gráfico representativo da expressão gênica de H3Cit para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical.



Marcadores Oxidantes Mieloperoxidase (MPO) e Óxido Nítrico Sintase (iNOS)

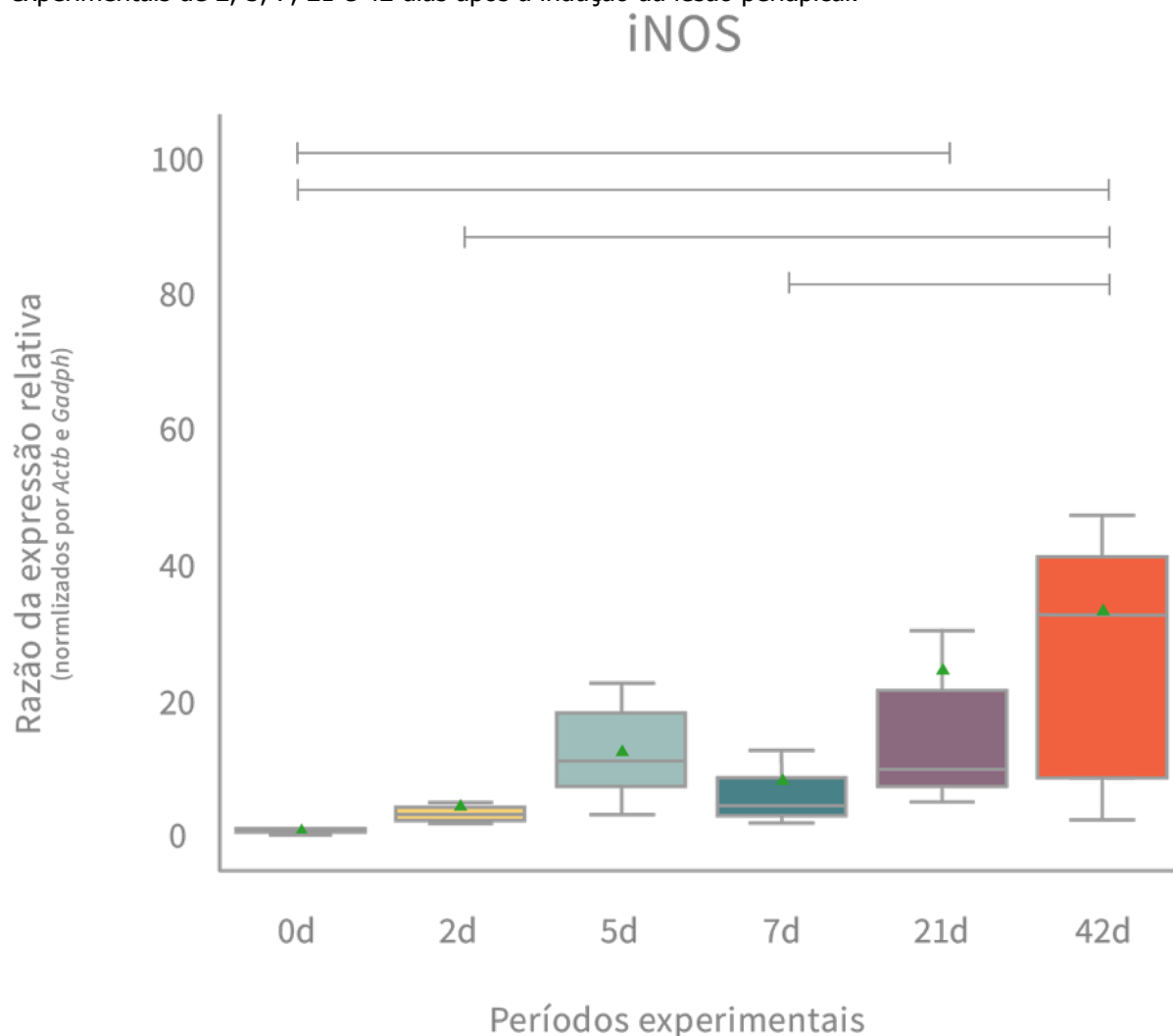
Foi observada maior expressão gênica da enzima oxidante MPO nos períodos de 5 e 21 dias após a indução da lesão periapical, com diferença estatística significativa em relação ao grupo controle e o período de 42 dias ($p < 0,05$) (Figura 39).

Figura 39. Gráfico representativo da expressão gênica de MPO para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical.



A enzima oxidante iNOS apresentou expressão significativamente maior nos períodos de 21 e 42 dias, quando comparada ao grupo controle ($p=0,03$). No grupo de 42 dias, houve também diferença estatística dos grupos de 2 dias ($p=0,01$) e 7 dias ($p=0,02$) (Figura 40).

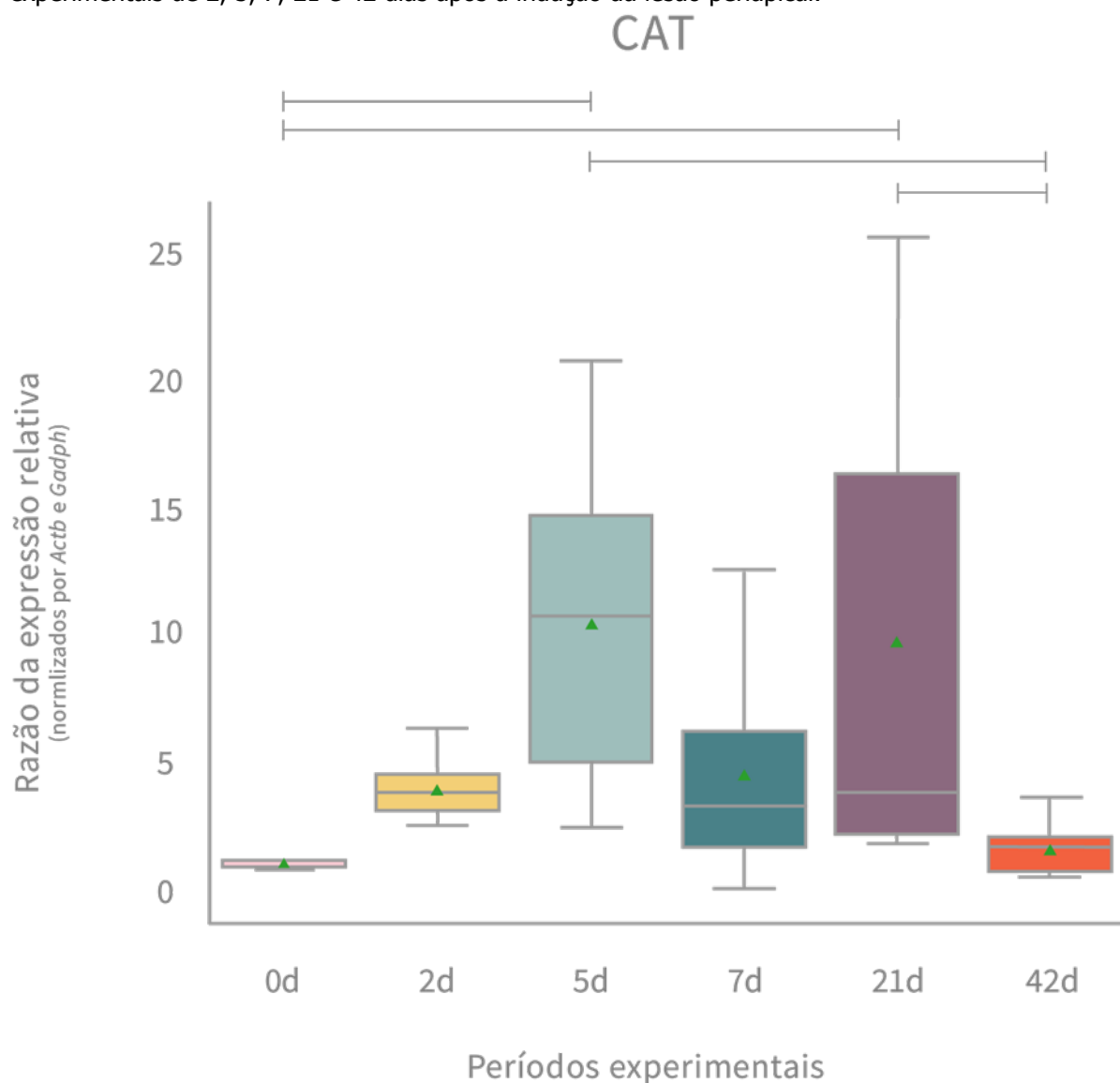
Figura 40. Gráfico representativo da expressão gênica de iNOS para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical.



Marcadores Antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione Redutase (GR) e Catalase (CAT)

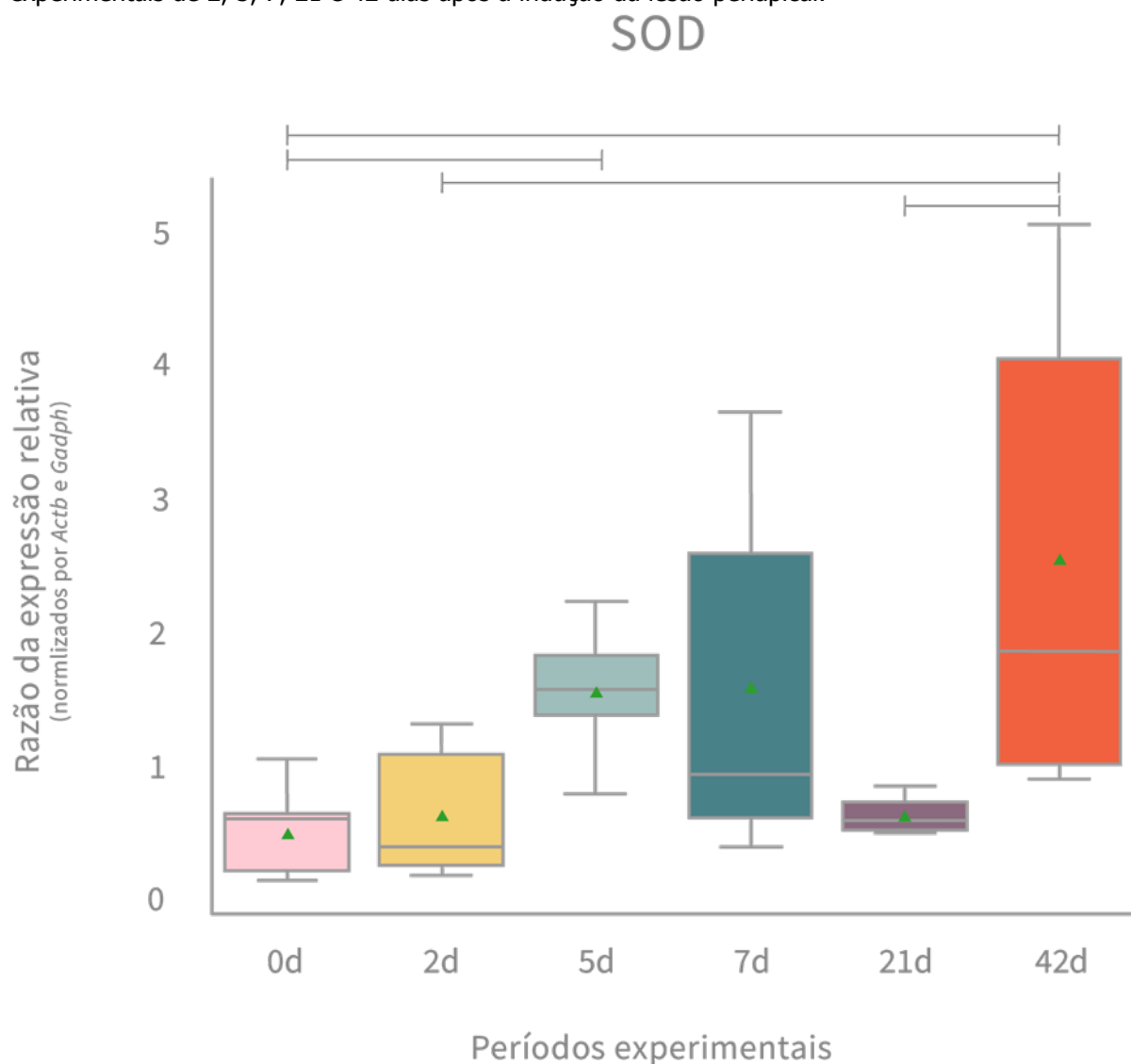
A expressão da enzima CAT foi maior nos períodos de 5 e 21 dias, comparados ao grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, esses períodos apresentaram diferença estatística significativa em comparação com o grupo de 42 dias ($p = 0,005$) (Figura 41).

Figura 41. Gráfico representativo da expressão gênica de CAT para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical.



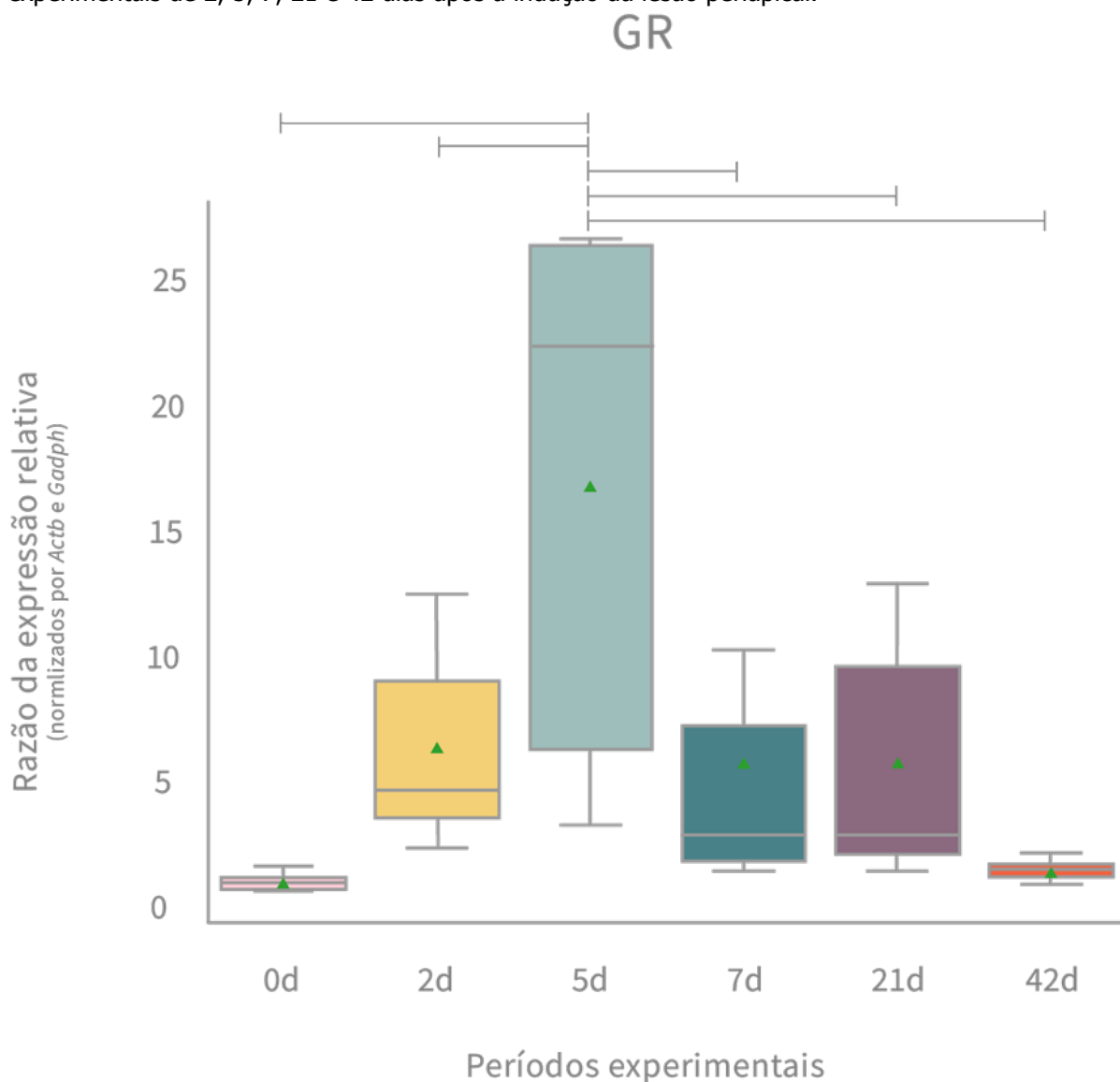
Foi observada a maior expressão da enzima antioxidante SOD aos 5 e 42 dias em relação ao grupo de dentes hígidos ($p < 0,05$). Além disso, o grupo de 42 dias apresentou diferença significativa em relação aos períodos de 2 e 21 dias ($p = 0,01$) (Figura 42).

Figura 42. Gráfico representativo da expressão gênica de SOD para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical.



A expressão de GR apresentou pico máximo aos 5 dias, com diferença significativa dos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 43). Após esse pico, sua expressão diminuiu ao longo do tempo, sendo menor no período de 42 dias.

Figura 43. Gráfico representativo da expressão gênica de GR para os grupos controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução da lesão periapical.



De uma maneira geral, os resultados obtidos após a análise de expressão gênica permitiram evidenciar que:

- A elastase de neutrófilo teve pico aos 5 dias e a expressão foi menor aos 42 dias.
- A H3Cit teve pico aos 5 dias e continuou aumentada aos 42 dias.
- A GR teve pico aos 5 dias.
- A MPO e a CAT aumentaram aos 5 e 21 dias e diminuíram aos 42 dias.
- A SOD esteve aumentada aos 5 e 42 dias, porém aos 21 dias sua expressão foi diminuída.
- A iNOS apresentou expressão maior nos períodos finais de 21 e 42 dias.

DISCUSSÃO

Evidências crescentes têm identificado o stress oxidativo juntamente com a inflamação crônica como potencialmente responsáveis pela patogênese de diferentes doenças inflamatórias e autoimunes (Forman e Zhang, 2021; Tanabe et al., 2022; Hou et al., 2023).

As ROS, envolvidas no stress oxidativo, também participam da liberação de NETs, seja como um estímulo inicial ou como parte da via de sinalização da NETose Lítica (Brinkmann et al., 2004; Palmer et al., 2012; Burgener e Schroder, 2020; Hidalgo et al., 2022; Block et al., 2022). À semelhança das ROS, diversas patologias inflamatórias e autoimunes estão associadas à atividade exacerbada de neutrófilos e à formação de NETs (Schönrich et al., 2020; Scozzi et al., 2022; Zhang et al., 2023). Sabendo que a lesão periapical é consequência tanto de uma infecção, como da resposta inflamatória crônica progressiva, o presente estudo buscou avaliar a relação entre a expressão de ROS e liberação das NETs durante a formação e desenvolvimento das lesões periapicais.

Para esse objetivo, foi utilizado um modelo clássico para indução de lesão periapical experimentalmente em camundongos, no qual a câmara pulpar foi exposta para contaminação pelos micro-organismos da cavidade bucal do animal (Stashenko e Yu, 1989; Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; de Oliveira et al., 2015; De Rossi et al., 2016; Barreiros et al., 2018; Silva et al., 2020; Petean et al., 2022). Essas lesões periapicais apresentam uma fase de desenvolvimento mais rápida, ativa até o 15º dia após a exposição, que se estabiliza e é mais lenta a partir do 21º dia, com o estabelecimento de uma lesão crônica (Stashenko et al., 1994; Corotti et al., 2009). Nossos resultados microscópicos mostraram que houve o desenvolvimento da lesão periapical em função do tempo, com o aumento progressivo significativo da espessura do ligamento periodontal a partir do 5º dia até o 42º ($p < 0,05$) e características microscópicas como infiltrado inflamatório mais severo e reabsorção óssea e cementária nos períodos crônicos de 21 e 42 dias.

Os neutrófilos fazem parte da resposta inflamatória inicial desencadeada por bactérias e seus produtos, e são os primeiros leucócitos a chegarem no local da infecção. A função dessas células está ligada à fagocitose, geração de MPO e ROS, liberação do conteúdo granular, produção de citocinas e formação de NETs. Alguns

trabalhos clássicos relataram o influxo de neutrófilos entre os dias 0 e 3 após a exposição da polpa experimentalmente (Kawashima et al., 1996; Stashenko et al., 1998). Porém, outros trabalhos também observaram elevada formação dessas células na lesão periapical crônica (Yu e Stashenko, 1987; Stashenko et al., 1998), sendo os neutrófilos o segundo tipo celular mais predominante aos 15, 20, 30 e 90 dias após a indução (Stashenko et al., 1994). Renard et al. (2016) mostraram aumento significativo de leucócitos após 9h em lesões periapicais induzidas por LPS, voltando à linha de base após 3 dias da indução, no entanto, não avaliou períodos crônicos. Paralelamente, estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram a presença de neutrófilos tanto em períodos mais iniciais quanto em períodos mais tardios do desenvolvimento de lesões periapicais (da Silva et al., 2012; Taira et al., 2019; Bezerra da Silva et al., 2014; De Rossi et al., 2020a; De Rossi et al., 2020b; Paula-Silva et al., 2020).

Pelo acima exposto, nosso estudo avaliou períodos iniciais (2 e 5 dias), intermediários (7 dias) e mais tardios (21 e 42 dias) após a indução da lesão periapical. Os nossos resultados demonstraram maiores números de neutrófilos nos períodos de 21 e 42 dias, com diferença estatística entre esses períodos, assim como os dias iniciais de 0, 2 e 5 dias ($p < 0,05$). Esses achados estão de acordo com dados recentes que ressaltam a função dos neutrófilos além da infecção aguda, visto que estímulos pró-inflamatórios persistentes permitem ativação contínua e longevidade aumentada de neutrófilos, participando também da resposta inflamatória crônica (Kolaczowska e Kubes, 2013; Liew e Kubes, 2019; Rosales, 2020; Singhal e Kumar, 2022). Hajishengallis (2019) destacou a participação dos neutrófilos como um dos principais atores na periodontite crônica e seus números elevados correlacionaram com a gravidade da periodontite.

A ativação dos neutrófilos, na inflamação aguda e crônica, regula positivamente a expressão de proteinases e enzimas oxidativas para combater os patógenos, podendo também degradar componentes da matriz extracelular (Havemann e Gramse, 1984; Ujiie et al., 2007; Pu et al., 2016). Dentre as proteases, a elastase neutrofílica (NE) é liberada dos grânulos azurófilos de neutrófilos, podendo ser encontrada no exsudato periapical de pacientes sintomáticos e assintomáticos (Alptekin et al., 2005). A NE pode clivar uma variedade de proteínas, como a

elastina, proteoglicanos e colágeno (Havemann Gramsci, 1984), estando relacionada à reabsorção óssea e progressão das lesões periapicais (Morimoto et al., 2008; Silva et al., 2012). Os resultados do presente estudo corroboram esses achados, uma vez que, após o pico da expressão de NE aos 5 dias, o aumento do número de neutrófilos, e portanto, a manutenção do processo inflamatório nos períodos mais tardios de avaliação, esteve acompanhado da contínua presença da enzima NE e da progressão da destruição tecidual periapical.

Além disso, a liberação da enzima NE pode ser resultado da degranulação, fagocitose ou da liberação de NETs (Castanheira e Kubes, 2019; Hidalgo et al., 2022; Huang e O'Sullivan, 2022). A via clássica de liberação de NETs, mais estudada e onhecida até o momento, é mediada pela geração de ROS, que ativam a enzima PAD4 e a desintegração dos grânulos com liberação tanto da NE, como também da enzima oxidante mieloperoxidase (MPO). A PAD4 atua descondensando a cromatina por meio da citrulinização das histonas (Burgener e Schroder, 2020; Tan et al., 2021) e a MPO e NE vão para o núcleo, auxiliando no relaxamento da cromatina (Papayannopoulos et al., 2010; Björnsdottir et al., 2015; Castanheira e Kubes, 2019). Por isso, a formação de NETs é observada pela conjugação das proteínas granulares dos neutrófilos (NE e MPO) e do DNA extracelular, principalmente da histona citrulinada H3 (H3Cit) (de Buhr e von Köckritz-Blickwede, 2016; Tan et al., 2021; Hidalgo et al., 2022). Nos tecidos, as NETs podem ser visualizadas pela co-localização desses seus componentes com marcação imuno-histoquímica, seja por detecção cromogênica ou fluorescente (de Buhr e von Köckritz-Blickwede, 2016; Tan et al., 2021). Nesse sentido, avaliamos a co-expressão imuno-histoquímica dessas enzimas (NE e MPO) com a H3Cit na região apical e periapical ao longo do desenvolvimento da lesão periapical. Nos períodos de 2 e 7 dias, a formação de NETs não pode ser evidenciada pela co-localização de NE e H3Cit mas apresentou uma expressão leve, evidenciada pela co-localização de MPO e H3Cit. A marcação menor ou ausente de NETs nesses períodos iniciais no tecido periapical pode ter ocorrido pela presença de um infiltrado inflamatório mais suave nessa região em comparação com o encontrado no tecido pulpar, sugerindo uma maior formação de NETs no tecido pulpar nesses períodos. Essa hipótese pode ser corroborada pela formação de NETs no tecido pulpar de dentes com pulpite observada pela co-localização

de NE e DNA por imunofluorescência (Holder et al., 2019). Ainda, um estudo recente de Contreras e colaboradores (2023) observou grande quantidade de neutrófilos, com morfologia semelhante a liberação de NETs e marcação de NE na câmara pulpar de dentes com pulpíte irreversível assintomática. Paralelamente, nas regiões apical e periapical, a co-localização de MPO e H3Cit, comprovando a liberação de NETs, foi observada no período de 14 dias (Fujii et al., 2021). Adicionalmente, um estudo do nosso grupo de estudo avaliando a formação de NETs no desenvolvimento da lesão periapical, observou a co-localização de MPO e NE com H3Cit nos períodos crônicos (Massoni, 2023). Estes trabalhos corroboram com os nossos achados, onde a formação de NETs foi maior nos períodos de 21 e 42 dias ($p < 0,05$). A maior quantidade de neutrófilos observada nesses mesmos períodos pode explicar a liberação aumentada de NET.

As funções dos neutrófilos são fortemente influenciadas pela atividade redox celular, ou seja, pela produção de RNS/ROS e antioxidantes (Morris et al., 2022). Além disso, a elevada formação de ROS/RNS é uma parte integrante da maioria das cascatas de reações que envolvem liberação de NETs (Papayannopoulos et al., 2010; Stoiber et al., 2015; Hidalgo et al., 2022). Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos produzem o ânion superóxido, fonte primária das ROS, que pode ser desmutado espontaneamente ou pela ação da enzima antioxidantes superóxido dismutase (SOD) em H_2O_2 , uma ROS menos reativa (Checa e Aran, 2020; Juan et al., 2021). Esse H_2O_2 pode ser neutralizado pela enzima catalase (CAT) ou pelo sistema antioxidante da glutatona (Aratani, 2018; Al-Shehri, 2021), como também pode ativar a enzima oxidante mieloperoxidase (MPO), presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, as quais ativam a NE e vão para o núcleo auxiliar clivando as histonas para formação das NETs (Papayannopoulos et al., 2010; Björnsdottir et al., 2015; Castanheira e Kubes, 2019). Nossos resultados demonstraram expressão gênica das enzimas MPO, GR, CAT e SOD com aumento significativo no período de 5 dias ($p < 0,05$), o que pode sugerir stress oxidativo neste período de inflamação aguda. Esses achados estão de acordo com os trabalhos sugerem que durante a resposta inflamatória os antioxidantes aumentam como regulação compensatória positiva, diante da formação exagerada de ROS pelas enzimas oxidantes (Davis et al., 1991; Baumgardner e Sulfaro, 2001; Morrocco et al., 2017). No presente estudo,

ainda, as enzimas MPO e CAT continuaram com expressão aumentada no período de 21 dias em relação ao controle ($p < 0,05$), enquanto a SOD aumentou novamente aos 42 dias ($p < 0,05$), períodos prolongados de stress oxidativo, visto que o estímulo patogênico não foi removido.

Apesar dos resultados encontrados no período de 5 dias, na marcação imuno-histoquímica, as enzimas MPO, CAT, SOD e GR tiveram marcação positiva de leve a moderada na região periapical. Já nos períodos mais crônicos, de 21 e 42 dias, essas enzimas apresentaram imunomarcações mais severas. A enzima GR faz parte do sistema da glutathiona e é induzível no stress oxidativo uma vez que atua regenerando a glutathiona reduzida (GSH), após ela ser oxidada (GSSG), como mecanismo antioxidante, na presença de H_2O_2 (Perricone et al., 2009; Couto et al., 2016; Li et al., 2020). Carrera-Quintanar e colaboradores (2020) relataram que a atividade prolongada dos neutrófilos esgota os níveis de GSH devido a produção de MPO durante a inflamação e stress oxidativo crônicos, o que pode ser uma explicação para nossos achados imuno-histoquímicos para essa enzima, pois nesses períodos também foi encontrado maior quantidade de neutrófilos e expressão da MPO na lesão periapical.

Além dessas enzimas, no presente estudo foi avaliada a enzima oxidante óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que teve expressão gênica com aumento significativo e imunomarcações mais intensas nos períodos de 21 e 42 dias em relação ao grupo controle e períodos iniciais ($p < 0,05$). A liberação da iNOS é estimulada por LPS e citocinas inflamatórias (Marrocco et al., 2017; Checa e Aran, 2020; Juan et al., 2021) e atua produzindo óxido nítrico (NO) por meio da L-arginina (Checa e Aran, 2020; Juan et al., 2021). A regulação positiva de NO inibiu a adesão e migração de neutrófilos, devido à regulação negativa de fatores de adesão (Spiller et al., 2019; Morris et al., 2022). Entretanto, isso não ocorreu no presente estudo visto que o período de maior formação de iNOS e NO foi correspondente àqueles de maior quantidade de neutrófilos na lesão periapical. Por outro lado, a formação de NO pela iNOS foi observada estimulando a liberação de NETs em neutrófilos de crianças asmáticas *in vitro* (Li et al., 2020) e também foi relatada como indutores da liberação de NETs em processos dependentes de MPO, NE e formação de O_2^- (Manda-Handzlik et al., 2020). Isso apoia nossos achados, relacionando a presença dessa

enzima com a formação de NETs observada nos mesmos períodos.

Pelo exposto, no presente estudo, a maior atividade redox, juntamente com a maior quantidade de neutrófilos e formação de NETs observadas nos períodos de 21 e 42 dias podem estar relacionados entre si e com as características microscópicas presentes nesses períodos, como aumento do infiltrado inflamatório e do tamanho da lesão periapical, com destruição óssea e cementária aos 42 dias. Esses resultados indicam para a regulação redox na formação das NETs no contexto da formação da lesão periapical, ainda pouco explorada, destacando a necessidade de mais estudos, especialmente com animais transgênicos, a fim de se aprofundar o conhecimento em torno do tema, assim como a modulação da resposta do hospedeiro, auxiliando na formulação de alvos terapêuticos.

CONCLUSÃO

Observou-se maior atividade redox, sugestiva de stress oxidativo, bem como maior atividade de neutrófilos e formação de NETs nos períodos mais crônicos do desenvolvimento da lesão periapical. Esses achados podem indicar que houve relação entre a formação de ROS e a liberação de NETs e que esses mecanismos de defesa podem ter contribuído para destruição tecidual periapical. Mais estudos são necessários para compreender o papel das NETs e ROS, bem como as vias de liberação de NETs na lesão periapical.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- Abderrazak A, Syrovets T, Couchie D, El Hadri K, Friguet B, Simmet T, Rouis M. NLRP3 inflammasome: From a danger signal sensor to a regulatory node of oxidative stress and inflammatory diseases. *Redox Biol.* 2015;4:296-307.
- Abdulkhaleq LA, Assi MA, Abdullah R, Zamri-Saad M, Taufiq-Yap YH, Hezmee MNM. The crucial roles of inflammatory mediators in inflammation: A review. *Vet World.* 2018 May;11(5):627-635.
- Acker HV, Coenye T. The Role of Reactive Oxygen Species in Antibiotic-Mediated Killing of Bacteria. *Trends Microbiol.* 2017;25(6):456-466.
- Acquier AB, De Couto Pita AK, Busch L, Sánchez GA. Parameters of oxidative stress in saliva from patients with aggressive and chronic periodontitis. *Redox Rep.* 2017;22(3):119-126.
- Agidigbi TS, Kim C. Reactive oxygen species in osteoclast differentiation and possible pharmaceutical targets of ros-mediated osteoclast diseases. *Int J Mol Sci.* 2019 Jul 22;20(14):3576.
- Akalin FA, Toklu E, Renda N. Analysis of superoxide dismutase activity levels in gingiva and gingival crevicular fluid in patients with chronic periodontitis and periodontally healthy controls. *J Clin Periodontol.* 2005 Mar;32(3):238-43.
- Al-Kuraishy HM, Al-Gareeb AI, Al-Hussaniy HA, Al-Harcen NAH, Alexiou A, Batiha GE. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) and Covid-19: A new frontiers for therapeutic modality. *Int Immunopharmacol.* 2022 Mar;104:108516.
- Al-Shehri SS. Reactive oxygen and nitrogen species and innate immune response. *Biochimie.* 2021 Feb;181:52-64.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Robert K, Walter P. *Molecular Biology of the cell.* 6a ed. Garland Science; 2014.
- Alfakry H, Malle E, Koyani CN, Pussinen PJ, Sorsa T. Neutrophil proteolytic activation cascades: a possible mechanistic link between chronic periodontitis and coronary heart disease. *Innate Immun.* 2016 Jan;22(1):85-99.
- Alizadehgharib S, Östberg AK, Dahlstrand Rudin A, Dahlgren U, Christenson K. The effects of the dental methacrylates TEGDMA, Bis-GMA, and UDMA on neutrophils in vitro. *Clin Exp Dent Res.* 2020 Aug;6(4):439-447.
- Alptekin NO, Ari H, Ataoglu T, Haliloglu S, Alptekin T, Serpek B. Neutrophil elastase levels in periapical exudates of symptomatic and asymptomatic teeth. *J Endod.* 2005 May;31(5):350-3.
- Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. *Annual Review of Immunology.* 2012;30(1):459–89.

Aratani Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch Biochem Biophys*. 2018 Feb 15;640:47-52.

Araújo AA, Pereira ASBF, Medeiros CACX, Brito GAC, Leitão RFC, Araújo LS, Guedes PMM, Hiyari S, Pirih FQ, Araújo Júnior RF. Effects of metformin on inflammation, oxidative stress, and bone loss in a rat model of periodontitis. *PLoS One*. 2017 Aug 28;12(8):e0183506.

Arreiros ALBS, David JM, David JP. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Quím. Nova*. 2006;29(1):113-123.

Arulselvan P, Fard MT, Tan WS, Gothai S, Fakurazi S, Norhaizan ME, Kumar SS. Role of antioxidants and natural products in inflammation. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:5276130.

Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LA, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Endod Dent Traumatol*. 1996 Apr;12(2):66-9.

Aslantas EE, Buzoglu HD, Muftuoglu SF, Atilla P, Karapinar SP, Aksoy Y. Effects of aging and inflammation on catalase activity in human dental pulp. *Arch Oral Biol*. 2022 Sep;141:105482.

Bai XC, Lu D, Liu AL, Zhang ZM, Li XM, Zou ZP, Zeng WS, Cheng BL, Luo SQ. Reactive oxygen species stimulates receptor activator of NF- κ B ligand expression in osteoblast. *J Biol Chem*. 2005 Apr 29;280(17):17497-506.

Balaban, RS, Nemoto, S, Finkel T. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell*, 2005;120, 483–95.

Banerjee S, Ghosh S, Mandal A, Ghosh N, Sil PC. ROS-associated immune response and metabolism: a mechanistic approach with implication of various diseases. *Arch Toxicol*. 2020 Jul;94(7):2293-2317.

Barcelos RCS, Rosa HZ, Roversi K, Tibúrcio-Machado CDS, Inchaki PT, Burger ME, Bier CAS. Apical periodontitis induces changes on oxidative stress parameters and increases Na⁺/K⁺-ATPase activity in adult rats. *Arch Oral Biol*. 2020 Oct;118:104849.

Barnes BJ, Adrover JM, Baxter-Stoltzfus A, Borczuk A, Cools-Lartigue J, Crawford JM, Daßler-Plenker J, Guerci P, Huynh C, Knight JS, Loda M, Looney MR, McAllister F, Rayes R, Renaud S, Rousseau S, Salvatore S, Schwartz RE, Spicer JD, Yost CC, Weber A, Zuo Y, Egeblad M. Targeting potential drivers of COVID-19: Neutrophil extracellular traps. *J Exp Med*. 2020;217(6):e20200652.

Barnes PJ. Oxidative Stress in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Antioxidants (Basel)*. 2022 May 13;11(5):965.

Barreiros D, Nelson P Filho, Paula-Silva FWG, Oliveira KMH, Lucisano MP, Rossi A, Silva LAB, Küchler EC, Silva RAB. MMP2 and MMP9 are Associated with Apical Periodontitis Progression and Might be Modulated by TLR2 and MyD88. *Braz Dent J*. 2018;29(1):43-47.

Baumgardner KR, Law AS, Gebhart GF. Localization and changes in superoxide dismutase immunoreactivity in rat pulp after tooth preparation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 Oct;88(4):488-95.

Baumgardner KR, Sulfaro MA. The anti-inflammatory effects of human recombinant copper-zinc superoxide dismutase on pulp inflammation. *J Endod.* 2001 Mar;27(3):190-5.

Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, Kühn LI, Ben-Ezra J, Elhasid R, Zychlinsky A. A proposed role for neutrophil extracellular traps in cancer immunoediting. *Front Immunol.* 2013 Mar 6;4:48.

Bergqvist C, Safi R, El Hasbani G, Abbas O, Kibbi A, Nassar D. Neutrophil extracellular traps are present in immune-complex-mediated cutaneous small vessel vasculitis and correlate with the production of reactive oxygen species and the severity of vessel damage. *Acta Derm Venereol.* 2020 Oct 6;100(17):adv00281.

Bertasso AS, Léon JE, Silva RAB, Silva LAB, de Queiroz AM, Pucinelli CM, Romualdo PC, Nelson-Filho P. Immunophenotypic quantification of M1 and M2 macrophage polarization in radicular cysts of primary and permanent teeth. *Int Endod J.* 2020;53(5):627-635.

Bezerra da Silva LA. Tratado de Odontopediatria Tomo 2. 2a ed. Venezuela: AMOLCA; 2018.

Bezerra da Silva RA, Nelson-Filho P, Lucisano MP, De Rossi A, de Queiroz AM, Bezerra da Silva LA. MyD88 knockout mice develop initial enlarged periapical lesions with increased numbers of neutrophils. *Int Endod J.* 2014 Jul;47(7):675-86.

Bhagat S, Singh P, Parihar AS, Kaur G, Takkar H, Rela R. Assessment of levels of plasma oxidative stress in patient having aggressive periodontitis before and after full mouth disinfection. *J Pharm Bioallied Sci.* 2021 Jun;13(Suppl 1):S432-S435.

Björnsdóttir H, Welin A, Michaëlsson E, Osla V, Berg S, Christenson K, Sundqvist M, Dahlgren C, Karlsson A, Bylund J. Neutrophil NET formation is regulated from the inside by myeloperoxidase-processed reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2015;89:1024-35.

Block H, Rossaint J, Zarbock A. The Fatal Circle of NETs and NET-Associated DAMPs Contributichento Organ Dysfunction. *Cells.* 2022 Jun 14;11(12):1919.

Bödör C, Matolcsy A, Bernáth M. Elevated expression of Cu, Zn-SOD and Mn-SOD mRNA in inflamed dental pulp tissue. *Int Endod J.* 2007 Feb;40(2):128-32.

Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, Cichon I, Clancy DM, Desai J, Dumych T, Dwivedi N, Gordon RA, Hahn J, Hidalgo A, Hoffmann MH, Kaplan MJ, Knight JS, Kolaczowska E, Kubes P, Leppkes M, Manfredi AA, Martin SJ, Maueröder C, Maugeri N, Mitroulis I, Munoz LE, Nakazawa D, Neeli I, Nizet V, Pieterse E, Radic MZ, Reinwald C, Ritis K, Rovere-Querini P, Santocki M, Schauer C, Schett G, Shlomchik MJ, Simon HU, Skendros P, Stojkov D, Vandenabeele P, Berghe

TV, van der Vlag J, Vitkov L, von Köckritz-Blickwede M, Yousefi S, Zarbock A, Herrmann M. To NET or not to NET: current opinions and state of the science regarding the formation of neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2019 Mar;26(3):395-408.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004 Mar 5;303(5663):1532-5.

Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun.* 2018;10:414-421.

Burgener SS, Schroder K. Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020 Jul 1;12(7):a037028.

Burn GL, Foti A, Marsman G, Patel DF, Zychlinsky A. The Neutrophil. *Immunity.* 2021 Jul 13;54(7):1377-1391.

Carr AC, Winterbourn CC. Oxidation of neutrophil glutathione and protein thiols by myeloperoxidase-derived hypochlorous acid. *Biochem J.* 1997 Oct 1;327 (Pt 1)(Pt 1):275-81.

Carrera-Quintanar L, Funes L, Herranz-López M, Martínez-Peinado P, Pascual-García S, Sempere JM, et al. A suplementação antioxidante modula a resposta inflamatória dos neutrófilos ao estresse induzido pelo exercício. *Antioxidantes (Basileia).* 2020;9:1242.

Cassanta LTC, Rodrigues V, Violatti-Filho JR, Teixeira Neto BA, Tavares VM, Bernal ECBA, Souza DM, Araujo MS, de Lima Pereira SA, Rodrigues DBR. Modulation of Matrix Metalloproteinase 14, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 3, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 4, and Inducible Nitric Oxide Synthase in the Development of Periapical Lesions. *J Endod.* 2017 Jul;43(7):1122-1129.

Castanheira FVS, Kubes P. Neutrophils and NETs in modulating acute and chronic inflammation. *Blood.* 2019 May 16;133(20):2178-2185.

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.

Cavalla F, Osorio C, Paredes R, Valenzuela MA, García-Sesnich J, Sorsa T, Tervahartiala T, Hernández M. Matrix metalloproteinases regulate extracellular levels of SDF-1/CXCL12, IL-6 and VEGF in hydrogen peroxide-stimulated human periodontal ligament fibroblasts. *Cytokine.* 2015 May;73(1):114-21.

Chang J, Liu F, Lee M, Wu B, Ting K, Zara JN, Soo C, Al Hezaimi K, Zou W, Chen X, Mooney DJ, Wang CY. NF- κ B inhibits osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by promoting β -catenin degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013 Jun 4;110(23):9469-74.

Chapman EA, Lyon M, Simpson D, Mason D, Beynon RJ, Moots RJ, Wright HL. Caught in a Trap? Proteomic Analysis of Neutrophil Extracellular Traps in Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Front Immunol.* 2019 Mar 11;10:423.

Checa J, Aran JM. Reactive Oxygen Species: Drivers of Physiological and Pathological Processes. *J Inflamm Res.* 2020 Dec 2;13:1057-1073.

Chen M, Cai W, Zhao S, Shi L, Chen Y, Li X, Sun X, Mao Y, He B, Hou Y, Zhou Y, Zhou Q, Ma J, Huang S. Oxidative stress-related biomarkers in saliva and gingival crevicular fluid associated with chronic periodontitis: A systematic review and meta-analysis. *J Clin Periodontol.* 2019;46(6):608-622.

Chen T, Li Y, Sun R, Hu H, Liu Y, Herrmann M, Zhao Y, Muñoz LE. Receptor-Mediated NETosis on Neutrophils. *Front Immunol.* 2021 Nov 4;12:775267.

Chen XQ, Tu L, Tang Q, Huang L, Qin YH. An Emerging Role for Neutrophil Extracellular Traps in IgA Vasculitis: A Mini-Review. *Front Immunol.* 2022 Jun 21;13:912929.

Cheng Z, Xia NL, Chen Z, Li M, Tang Z, Wu H, Yan X, Wang Y, Wang Y, Tang X, Zhang H, Sun L. SHIP1 is required for the formation of neutrophil extracellular traps in rheumatoid arthritis. *Int Immunopharmacol.* 2022 Dec 29;115:109625.

Cintra LT, Samuel RO, Azuma MM, de Queiróz AO, Ervolino E, Sumida DH, de Lima VM, Gomes-Filho JE. Multiple Apical Periodontitis Influences Serum Levels of Cytokines and Nitric Oxide. *J Endod.* 2016 May;42(5):747-51.

Clark SR, Ma AC, Tavener SA, McDonald B, Goodarzi Z, Kelly MM, Patel KD, Chakrabarti S, McAvoy E, Sinclair GD, Keys EM, Allen-Vercoe E, Devinney R, Doig CJ, Green FH, Kubes P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007;13(4):463-9.

Claushuis TAM, van der Donk LEH, Luitse AL, van Veen HA, van der Wel NN, van Vught LA, Roelofs JJTH, de Boer OJ, Lankelma JM, Boon L, de Vos AF, van't Veer C, van der Poll T. Role of Peptidylarginine Deiminase 4 in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Host Defense during *Klebsiella pneumoniae*-Induced Pneumonia-Derived Sepsis. *The J Immunol.* 2018;201(4):1241-52.

Čolić M, Gazivoda D, Vučević D, Vasilijić S, Rudolf R, Lukić A. Proinflammatory and immunoregulatory mechanisms in periapical lesions. *Molecular Immunology.* 2009;47:101-13.

Contreras C, Cádiz B, Schmachtenberg O. Determination of the Severity of Pulpitis by Immunohistological Analysis and Comparison with the Clinical Picture. *J Endod.* 2023 Jan;49(1):26-35.

Cooper PR, Chicca IJ, Holder MJ, Milward MR. Inflammation and Regeneration in the Dentin-pulp Complex: Net Gain or Net Loss? *J Endod.* 2017 Sep;43(9S):S87-S94.

Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol*. 2009 Aug;54(8):764-71.

Couto N, Wood J, Barber J. The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. *Free Radic Biol Med*. 2016 Jun;95:27-42.

Crotty GF, Ascherio A, Schwarzschild MA. Targeting urate to reduce oxidative stress in Parkinson disease. *Exp Neurol*. 2017;298(Pt B):210-224.

da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 May;109(5):779-87.

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.

Daenen K, Andries A, Mekahli D, Van Schepdael A, Jouret F, Bammens B. Oxidative stress in chronic kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2019;34(6):975-991.

Dandekar A, Mendez R, Zhang K. Cross talk between ER stress, oxidative stress, and inflammation in health and disease. *Methods Mol Biol*. 2015;1292:205-214.

Davis WL, Jacoby BH, Craig KR, Wagner G, Harrison JW. Copper-zinc superoxide dismutase activity in normal and inflamed human dental pulp tissue. *J Endod*. 1991 Jul;17(7):316-8.

de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How neutrophil extracellular traps become visible. *J Immunol Res*. 2016;2016:4604713.

de Las Heras N, Martín Giménez VM, Ferder L, Manucha W, Lahera V. Implications of oxidative stress and potential role of mitochondrial dysfunction in covid-19: therapeutic effects of vitamin D. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Sep 21;9(9):897.

de Oliveira KM, da Silva RA, De Rossi A, Fukada SY, Feres M, Nelson-Filho P, da Silva LA. Absence of interleukin 22 affects the oral microbiota and the progression of induced periapical lesions in murine teeth. *Int Endod J*. 2015;48(1):46-59.

De Rossi A, Fukada SY, De Rossi M, da Silva RA, Queiroz AM, Nelson-Filho P, da Silva LA. Cementocytes Express Receptor Activator of the Nuclear Factor Kappa-B Ligand in Response to Endodontic Infection in Mice. *J Endod*. 2016 Aug;42(8):1251-7.

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

De Rossi A, Huamán SD, León JE, Saraiva MCP, Fukada SY, da Silva RAB, de Carvalho F, Nelson-Filho P. Fibroblast growth factor receptor 2 expression in apical periodontitis in mice. *Int Endod J*. 2020 Aug;53(8):1111-1119. (a)

De Rossi A, Lucisano MP, De Rossi M, Nelson-Filho P, Silva RAB, Silva LAB, Saraiva MCP, Fukada SY. Effect of intercellular adhesion molecule 1 deficiency on the development of apical periodontitis. *Int Endod J*. 2020 Mar;53(3):354-365. (b)

Delves PJ, Roitt IM, Mackay IR, Rosen FS. The Immune System. *N Engl J Med* 2000; 343:108-117.

Denning NL, Aziz M, Gurien SD, Wang P. DAMPs and NETs in Sepsis. *Front Immunol*. 2019 Oct 30;10:2536.

Dezerega A, Madrid S, Mundi V, Valenzuela MA, Garrido M, Paredes R, García-Sesnich J, Ortega AV, Gamonal J, Hernández M. Pro-oxidant status and matrix metalloproteinases in apical lesions and gingival crevicular fluid as potential biomarkers for asymptomatic apical periodontitis and endodontic treatment response. *J Inflamm (Lond)*. 2012 Mar 21;9(1):8.

Dickson KB, Zhou J. Role of reactive oxygen species and iron in host defense against infection. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2020 Mar 1;25:1600-1616.

Dinauer MC. Chronic granulomatous disease and other disorders of phagocyte function. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2005;89-95.

Donia T, Khamis A. Management of oxidative stress and inflammation in cardiovascular diseases: mechanisms and challenges. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2021 Jul;28(26):34121-34153.

Douda DN, Khan MA, Grasemann H, Palaniyar N. SK3 channel and mitochondrial ROS mediate NADPH oxidase-independent NETosis induced by calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(9):2817-22.

du Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, Brownie WJ, Clark A, Cuthill IC, Dirnagl U, Emerson M, Garner P, Holgate ST, Howells DW, Karp NA, Lazic SE, Lidster K, MacCallum CJ, Macleod M, Pearl EJ, Petersen OH, Rawle F, Reynolds P, Rooney K, Sena ES, Silberberg SD, Steckler T, Würbel H. The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 18(7): e3000410.

Duncan HF, Cooper PR. Pulp Innate Immune Defense: Translational Opportunities. *J Endod*. 2020 Sep;46(9S):S10-S18.

Dunn D J, Alvarez LAJ, Zhang X, Soldati T. Reactive oxygen species and mitochondria: A nexus of cellular homeostasis. *Redox Biol*. 2015;6:472-485.

Esposito P, Varvara G, Caputi S, Perinetti G. Catalase activity in human healthy and inflamed dental pulps. *Int Endod J*. 2003 Sep;36(9):599-603.a

- Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A, Caputi S. Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide. *Eur J Oral Sci.* 2003 Oct;111(5):454-6.
- Euler M, Hoffmann MH. The double-edged role of neutrophil extracellular traps in inflammation. *Biochem Soc Trans.* 2019 Dec 20;47(6):1921-1930.
- Fan ZQ, Bai SC, Xu Q, Li ZJ, Cui WH, Li H, Li XH, Zhang HF. Oxidative Stress Induced Osteocyte Apoptosis in Steroid-Induced Femoral Head Necrosis. *Orthop Surg.* 2021 Oct;13(7):2145-2152.
- Farhad AR, Razavi SM, Nejad PA. The use of aminoguanidine, a selective inducible nitric oxide synthase inhibitor, to evaluate the role of nitric oxide on periapical healing. *Dent Res J (Isfahan).* 2011 Oct;8(4):197-202.
- Feitosa CM, da Silva Oliveira GL, do Nascimento Cavalcante A, Morais Chaves SK, Rai M. Determination of parameters of oxidative stress in vitro models of neurodegenerative diseases-a review. *Curr Clin Pharmacol.* 2018;13(2):100-109.
- Finkel T. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol.* 2011; 194(1): 7–15.
- Fois AG, Paliogiannis P, Sotgia S, Mangoni AA, Zinellu E, Pirina P, Carru C, Zinellu A. Evaluation of oxidative stress biomarkers in idiopathic pulmonary fibrosis and therapeutic applications: a systematic review. *Respir Res.* 2018;19(1):51.
- Fokam D, Hoskin D. Instrumental role for reactive oxygen species in the inflammatory response. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2020 Mar 1;25:1110-1119.
- Forman HJ, Zhang H. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2021 Sep;20(9):689-709.
- Fousert E, Toes R, Desai J. Neutrophil Extracellular Traps (NETs) Take the Central Stage in Driving Autoimmune Responses. *Cells.* 2020 Apr 8;9(4):915.
- Franchina DG, Dostert C, Brenner D. Reactive Oxygen Species: Involvement in T Cell Signaling and Metabolism. *Trends Immunol.* 2018 Jun;39(6):489-502.
- Franco C, Patricia HR, Timo S, Claudia B, Marcela H. Matrix Metalloproteinases as Regulators of Periodontal Inflammation. *Int J Mol Sci.* 2017 Feb 17;18(2):440.
- Fresneda Alarcon M, McLaren Z, Wright HL. Neutrophils in the Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus: Same Foe Different M.O. *Front Immunol.* 2021 Mar 4;12:649693.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, et al. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2007;176(2):231-241.

- Fuchs TA, Brill A, Duerschmied D, Schatzberg D, Monestier M, Myers DD Jr, Wroblewski SK, Wakefield TW, Hartwig JH, Wagner DD. Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(36):15880-5.
- Fujii Y, Monteiro N, Sah SK, et al. Tlr2/4-Mediated Hyperinflammation Promotes Cherubism-Like Jawbone Expansion in Sh3bp2 (P416R) Knockin Mice. *JBMR Plus*. 2021;6(1):e10562.
- Fujita H, Ochi M, Ono M, Aoyama E, Ogino T, Kondo Y, Ohuchi H. Glutathione accelerates osteoclast differentiation and inflammatory bone destruction. *Free Radic Res*. 2019 Feb;53(2):226-236.
- Fukada SY, Silva TA, Saconato IF, Garlet GP, Avila-Campos MJ, Silva JS, Cunha FQ. iNOS-derived nitric oxide modulates infection-stimulated bone loss. *J Dent Res*. 2008 Dec;87(12):1155-9.
- Hama S, Takeichi O, Saito I, Ito K. Involvement of inducible nitric oxide synthase and receptor for advanced glycation end products in periapical granulomas. *J Endod*. 2007 Feb;33(2):137-41.
- Fullard N, O'Reilly S. Role of innate immune system in systemic sclerosis. *Semin Immunopathology*. 2015;37:511-7.
- Galler KM, Weber M, Korkmaz Y, Widbiller M, Feuerer M. Inflammatory Response Mechanisms of the Dentine-Pulp Complex and the Periapical Tissues. *Int J Mol Sci*. 2021 Feb 2;22(3):1480.
- Galli SJ, Borregaard N, Wynn TA. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: Macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*. 2011;12(11):1035-44.
- Gallorini M, Widbiller M, Bolay C, Carradori S, Buchalla W, Cataldi A, Schweikl H. Relevance of cellular redox homeostasis for vital functions of human dental pulp cells. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Dec 23;11(1):23.
- García N, Zazueta C, Aguilera-Aguirre L. Oxidative stress and inflammation in cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2017: 5853238.
- Georgiou AC, Cornejo Ulloa P, Van Kessel GMH, Crielaard W, Van der Waal SV. Reactive oxygen species can be traced locally and systemically in apical periodontitis: A systematic review. *Arch Oral Biol*. 2021 Sep;129:105167.
- Goldman E, Reich E, Roshihotzki B, Saketkhou M, Wald S, Goldstein A, Klein Y, Abramovitz I, Klutstein M. A Mouse Model for Studying the Development of Apical Periodontitis with Age. *Cells*. 2021 Mar 17;10(3):671.
- Goncalves CK, Fregnani ER, Leon JE, Silva-Souza YT, Peres DE. Immunohistochemical expression of p63, epidermal growth factor receptor (EGFR) and notch-1 in radicular cysts, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Braz Dent J*. 2012; 23(4):337-43.

Gorrini C, Harris IS, Mak TW. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(12):931-47.

Guiducci E, Lemberg C, Küng N, Schraner E, Theocharides APA, LeibundGut-Landmann S. Candida albicans-induced NETosis is independent of peptidylarginine deiminase 4. *Front Immunol*. 2018;9:1.

Häger M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med*. 2010 Jul;268(1):25-34.

Hajishengallis G. New developments in neutrophil biology and periodontitis. *Periodontol 2000*. 2020 Feb;82(1):78-92.

Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, et al. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(21):9813-8.

Hama S, Takeichi O, Hayashi M, Komiyama K, Ito K. Co-production of vascular endothelial cadherin and inducible nitric oxide synthase by endothelial cells in periapical granuloma. *Int Endod J*. 2006 Mar;39(3):179-84.

Harwood DT, Kettle AJ, Winterbourn CC. Production of glutathione sulfonamide and dehydroglutathione from GSH by myeloperoxidase-derived oxidants and detection using a novel LC-MS/MS method. *Biochem J*. 2006 Oct 1;399(1):161-8.

Havemann K, Gramse M. Physiology and pathophysiology of neutral proteinases of human granulocytes. *Adv Exp Med Biol*. 1984;167:1-20.

He S, Xu J, Wu J. The Promising Role of Chemokines in Vitiligo: From Oxidative Stress to the Autoimmune Response. *Oxid Med Cell Longev*. 2022 Jan 19;2022:8796735.

Herb M, Schramm M. Functions of ROS in Macrophages and Antimicrobial Immunity. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Feb 19;10(2):313.

Hernández-Ríos P, Pussinen PJ, Vernal R, Hernández M. Oxidative Stress in the Local and Systemic Events of Apical Periodontitis. *Front Physiol*. 2017;8:869.

Herre M, Cedervall J, Mackman N, Olsson AK. Neutrophil extracellular traps in the pathology of cancer and other inflammatory diseases. *Physiol Rev*. 2023 Jan 1;103(1):277-312.

Hidalgo A, Libby P, Soehnlein O, Aramburu IV, Papayannopoulos V, Silvestre-Roig C. Neutrophil extracellular traps: from physiology to pathology. *Cardiovasc Res*. 2022 Oct 21;118(13):2737-2753.

Higuchi Y. Chromosomal DNA fragmentation in apoptosis and necrosis induced by oxidative stress. *Biochem Pharmacol*. 2003 Oct 15;66(8):1527-35.

Hirschfeld J, White PC, Milward MR, Cooper PR, Chapple ILC. Modulation of Neutrophil Extracellular Trap and Reactive Oxygen Species Release by Periodontal Bacteria. *Infect Immun*. 2017 Nov 17;85(12):e00297-17.

Ho YC, Huang FM, Chang YC. Cytotoxicity of formaldehyde on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007 Nov;83(2):340-4.

Holder MJ, Wright HJ, Couve E, Milward MR, Cooper PR. Neutrophil Extracellular Traps Exert Potential Cytotoxic and Proinflammatory Effects in the Dental Pulp. *J Endod*. 2019;45(5):513-520.

Holzerová E, Prokisch H. Mitochondria: Much ado about nothing? How dangerous is reactive oxygen species production?. *Int J Biochem Cell Bio*. 2015;63:16-20.

Hrycay EG, Bandiera SM. Involvement of Cytochrome P450 in Reactive Oxygen Species Formation and Cancer. *Adv Pharmacol*. 2015;74:35-84.

Huang J, Hong W, Wan M, Zheng L. Molecular mechanisms and therapeutic target of NETosis in diseases. *MedComm* (2020). 2022 Aug 19;3(3):e162.

Huang SU, O'Sullivan KM. The Expanding Role of Extracellular Traps in Inflammation and Autoimmunity: The New Players in Casting Dark Webs. *Int J Mol Sci*. 2022 Mar 30;23(7):3793.

Huh YJ, Kim JM, Kim H, Song H, So H, Lee SY, Kwon SB, Kim HJ, Kim HH, Lee SH, Choi Y, Chung SC, Jeong DW, Min BM. Regulation of osteoclast differentiation by the redox-dependent modulation of nuclear import of transcription factors. *Cell Death Differ*. 2006 Jul;13(7):1138-46.

Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*. 2018;54(4):287-293.

Inchingolo F, Marrelli M, Annibali S, Cristalli MP, Dipalma G, Inchingolo AD, Palladino A, Inchingolo AM, Gargari M, Tatullo M. Influence of endodontic treatment on systemic oxidative stress. *Int J Med Sci*. 2013 Dec 6;11(1):1-6.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science*. 2010;327(5963):291-5.

Jakovljevic A, Andric M, Nikolic N, Coric V, Krezovic S, Carkic J, Knezevic A, Beljic-Ivanovic K, Pljesa-Ercegovac M, Miletic M, Soldatovic I, Radosavljevic T, Jovanovic T, Simic T, Ivanovic V, Milasin J. Levels of oxidative stress biomarkers and bone resorption regulators in apical periodontitis lesions infected by Epstein-Barr virus. *Int Endod J*. 2018;51(6):593-604.

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 Oct;30(5):361-75.

Jiang Q, Zhao Y, Shui Y, Zhou X, Cheng L, Ren B, Chen Z, Li M. Interactions Between Neutrophils and Periodontal Pathogens in Late-Onset Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021 Mar 12;11:627328.

Juan CA, Pérez de la Lastra JM, Plou FJ, Pérez-Lebeña E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. *Int J Mol Sci.* 2021 Apr 28;22(9):4642.

Kabashima H, Nagata K, Maeda K, Iijima T. Interferon-gamma-producing cells and inducible nitric oxide synthase-producing cells in periapical granulomas. *J Oral Pathol Med.* 1998 Mar;27(3):95-100.

Kaneko C, Kobayashi T, Ito S, Sugita N, Murasawa A, Nakazono K, Yoshie H. Circulating levels of carbamylated protein and neutrophil extracellular traps are associated with periodontitis severity in patients with rheumatoid arthritis: A pilot case-control study. *PLoS One.* 2018 Feb 2;13(2):e0192365.

Kaneko T, Myo Zaw SY, Sueyama Y, Katsube KI, Kaneko R, Nör JE, Okiji T. Inhibition of Nuclear Factor Kappa B Prevents the Development of Experimental Periapical Lesions. *J Endod.* 2019 Feb;45(2):168-173.

Kanzaki H, Shinohara F, Kajiya M, Fukaya S, Miyamoto Y, Nakamura Y. Nuclear Nrf2 induction by protein transduction attenuates osteoclastogenesis. *Free Radic Biol Med.* 2014 Dec;77:239-48.

Karamifar K, Tondari A, Saghiri MA. Endodontic Periapical Lesion: An Overview on the Etiology, Diagnosis and Current Treatment Modalities. *Eur Endod J.* 2020 Jul 14;5(2):54-67.

Kattoor AJ, Pothineni NVK, Palagiri D, Mehta JL. Oxidative Stress in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep.* 2017;19(11):42.

Kawashima N, Okiji T, Kosaka T, Suda H. Kinetics of macrophages and lymphoid cells during the development of experimentally induced periapical lesions in rat molars: a quantitative immunohistochemical study. *J Endod.* 1996 Jun;22(6):311-6.

Keir HR, Chalmers JD. Neutrophil extracellular traps in chronic lung disease: implications for pathogenesis and therapy. *Eur Respir Rev.* 2022 Feb 22;31(163):210241.

Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, Brinkmann V, Bernuth HV, Zychlinsky A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017 Jun 2;6:e24437.

Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, Brinkmann V, Bernuth HV, Zychlinsky A. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *Elife.* 2017 Jun 2;6:e24437.

Kessenbrock K, Krumbholz M, Schönerner U, Back W, Gross WL, Werb Z, Gröne HJ, Brinkmann V, Jenne DE. Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med*. 2009 Jun;15(6):623-5.

Key LL Jr, Wolf WC, Gundberg CM, Ries WL. Superoxide and bone resorption. *Bone*. 1994 Jul-Aug;15(4):431-6.

Kilkenny C, Browne WJ, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG. Improving bioscience research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol*. 2010;8(6):e1000412.

Kimball JS, Johnson JP, Carlson DA. Oxidative Stress and Osteoporosis. *J Bone Joint Surg Am*. 2021 Aug 4;103(15):1451-1461. doi: 10.2106/JBJS.20.00989. PMID: 34014853.

Koh YC, Yang G, Lai CS, Weerawatanakorn M, Pan MH. Chemopreventive Effects of Phytochemicals and Medicines on M1/M2 Polarized Macrophage Role in Inflammation-Related Diseases. *Int J Mol Sci*. 2018 Jul 28;19(8):2208.

Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75.

Krzemińska J, Wronka M, Młynarska E, Franczyk B, Rysz J. Arterial Hypertension-Oxidative Stress and Inflammation. *Antioxidants (Basel)*. 2022 Jan 17;11(1):172.

Laforge M, Elbim C, Frère C, Hémadi M, Massaad C, Nuss P, Benoliel JJ, Becker C. Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nat Rev Immunol*. 2020 Sep;20(9):515-516.

Lai HJ, Doan HT, Lin EY, Chiu YL, Cheng YK, Lin YH, Chiang HS. Histones of Neutrophil Extracellular Traps Directly Disrupt the Permeability and Integrity of the Intestinal Epithelial Barrier. *Inflamm Bowel Dis*. 2023 Jan 6:izac256.

Lai HJ, Doan HT, Lin EY, Chiu YL, Cheng YK, Lin YH, Chiang HS. Histones of Neutrophil Extracellular Traps Directly Disrupt the Permeability and Integrity of the Intestinal Epithelial Barrier. *Inflamm Bowel Dis*. 2023 Jan 6:izac256.

Lee NK, Choi YG, Baik JY, Han SY, Jeong DW, Bae YS, Kim N, Lee SY. A crucial role for reactive oxygen species in RANKL-induced osteoclast differentiation. *Blood*. 2005;106(3):852-9.

Lee TH, Hu CC, Lee SS, Chou MY, Chang YC. Cytotoxicity of chlorhexidine on human osteoblastic cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J*. 2010 May;43(5):430-5.

Lefrançois E, Mallavia B, Zhuo H, Calfee CS, Looney MR. Maladaptive role of neutrophil extracellular traps in pathogen-induced lung injury. *JCI Insight*. 2018 Feb 8;3(3):e98178.

- Lewis HD, Liddle J, Coote JE, Atkinson SJ, Barker MD, Bax BD, Bicker KL, Bingham RP, Campbell M, Chen YH, Chung CW, Craggs PD, Davis RP, Eberhard D, Joberty G, Lind KE, Locke K, Maller C, Martinod K, Patten C, Polyakova O, Rise CE, Rüdiger M, Sheppard RJ, Slade DJ, Thomas P, Thorpe J, Yao G, Drewes G, Wagner DD, Thompson PR, Prinjha RK, Wilson DM. Inhibition of PAD4 activity is sufficient to disrupt mouse and human NET formation. *Nat Chem Biol.* 2015;11(3):189-91.
- Li H, Zhao L, Wang Y, Zhang MC, Qiao C. Roles, detection, and visualization of neutrophil extracellular traps in acute pancreatitis. *Front Immunol.* 2022 Aug 5;13:974821.
- Li WX, Wang F, Zhu YQ, Zhang LM, Zhang ZH, Wang XM. Inhibitors of nitric oxide synthase can reduce extracellular traps from neutrophils in asthmatic children in vitro. *Pediatr Pulmonol.* 2020 Jan;55(1):68-75.
- Li X, Ni M, Xu X, Chen W. Characterisation of naturally occurring isothiocyanates as glutathione reductase inhibitors. *J Enzyme Inhib Med Chem.* 2020 Dec;35(1):1773-1780.
- Liew PX, Kubes P. The Neutrophil's Role During Health and Disease. *Physiol Rev.* 2019 Apr 1;99(2):1223-1248.
- Likidilid A, Patchanans N, Peerapatdit T, Sriratanasathavorn C. Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in erythrocytes of type 2 diabetic patients. *J Med Assoc Thai.* 2010 Jun;93(6):682-93.
- Lorenzen I, Mullen L, Bekeschus S, Hanschmann EM. Redox Regulation of Inflammatory Processes Is Enzymatically Controlled. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:8459402.
- Loureiro C, Buzalaf MAR, Moraes FRN, Ventura TMO, Pelá VT, Pessan JP, Jacinto RC. Quantitative proteomic analysis in symptomatic and asymptomatic apical periodontitis. *Int Endod J.* 2021 Jun;54(6):834-847.
- Loureiro C, Buzalaf MAR, Pessan JP, Ventura TMO, Pelá VT, Ribeiro APF, Jacinto RC. Proteomic analysis of infected root canals with apical periodontitis in patients with type 2 diabetes mellitus: A cross-sectional study. *Int Endod J.* 2022 Sep;55(9):910-922.
- Magán-Fernández A, O'Valle F, Abadía-Molina F, Muñoz R, Puga-Guil P, Mesa F. Characterization and comparison of neutrophil extracellular traps in gingival samples of periodontitis and gingivitis: A pilot study. *J Periodontal Res.* 2019 Jun;54(3):218-224
- Magán-Fernández A, Rasheed Al-Bakri SM, O'Valle F, Benavides-Reyes C, Abadía-Molina F, Mesa F. Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Cells.* 2020 Jun 19;9(6):1494.
- Maia LM, Espaladori MC, Diniz JMB, Tavares WLF, de Brito LCN, Vieira LQ, Sobrinho APR. Clinical endodontic procedures modulate periapical cytokine and chemokine gene expressions. *Clin Oral Investig.* 2020 Oct;24(10):3691-3697.

- Manda-Handzlik A, Bystrzycka W, Cieloch A, Glodkowska-Mrowka E, Jankowska-Steifer E, Heropolitanska-Pliszka E, Skrobot A, Muchowicz A, Ciepela O, Wachowska M, Demkow U. Nitric oxide and peroxyxynitrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cell Mol Life Sci.* 2020 Aug;77(15):3059-3075.
- Manzanero S, Santro T, Arumugam TV. Neuronal oxidative stress in acute ischemic stroke: sources and contribution to cell injury. *Neurochem Int.* 2013 Apr;62(5):712-8.
- Marrocco I, Altieri F, Peluso I. Measurement and Clinical Significance of Biomarkers of Oxidative Stress in Humans. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:6501046.
- Martínez Leo EE, Segura Campos MR. Systemic oxidative stress: a key point in neurodegeneration - A review. *J Nutr Health Aging.* 2019;23(8):694-699.
- Matsumoto MA, Ribeiro DA. Inducible nitric oxide expression correlates with the level of inflammation in periapical cysts. *Eur J Dent.* 2007 Oct;1(4):212-5.
- McCord JM, Edeas MA. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomed Pharmacother.* 2005;59(4):139-142.
- Mei LX, Jiang Y, Zhao CH, Liu Z, Zhang P. [Relationships between periapical lesion and IL-1, TNF-alpha gene expression in rat]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2003 Sep;38(5):345-7. Chinese.
- Meng J, Lv Z, Zhang Y, Wang Y, Qiao X, Sun C, Chen Y, Guo M, Han W, Ye A, Xie T, Chu B, Shi C, Yang S, Chen C. Precision redox: the key for antioxidant pharmacology. *Antioxid Redox Signal.* 2021 May 10;34(14):1069-1082.
- Meng W, Paunel-Görgülü A, Flohé S, Hoffmann A, Witte I, MacKenzie C, Baldus SE, Windolf J, Lögters TT. Depletion of neutrophil extracellular traps in vivo results in hypersusceptibility to polymicrobial sepsis in mice. *Crit Care.* 2012;16(4):R137.
- 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 E, Petrey AC, Beswick EJ, Caulin AF, Iovino A, Abegglen LM, Weyrich AS, Rondina MT, Egeblad M, Schiffman JD, Yost CC. Neutrophil extracellular traps (NETs) contribute to immunothrombosis in COVID-19 acute respiratory distress syndrome. *Blood.* 2020;2020007008.
- Mikolai C, Branitzki-Heinemann K, Ingendoh-Tsakmakidis A, Stiesch M, von Köckritz-Blickwede M, Winkel A. Neutrophils exhibit an individual response to different oral bacterial biofilms. *J Oral Microbiol.* 2020 Dec 9;13(1):1856565.
- Minczykowski A, Woszczyk M, Szczepanik A, Lewandowski L, Wysocki H. Hydrogen peroxide and superoxide anion production by polymorphonuclear neutrophils in patients with chronic periapical granuloma, before and after surgical treatment. *Clin Oral Investig.* 2001 Mar;5(1):6-10.

- Mingoti MED, Bertollo AG, Simões JLB, Francisco GR, Bagatini MD, Ignácio ZM. COVID-19, oxidative stress, and neuroinflammation in the depression route. *J Mol Neurosci*. 2022 Jun;72(6):1166-1181.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 1;20(7):1126-67.
- Montgomery, DC. Design and analysis of experiments. John Wiley & Sons, 2017.
- Moonen CG, Buurma KG, Faruque MR, Balta MG, Liefferink E, Bizzarro S, Nicu EA, Loos BG. Periodontal therapy increases neutrophil extracellular trap degradation. *Innate Immun*. 2020 Jul;26(5):331-340.
- Morgan MJ, Liu ZG. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Res*. 2011 Jan;21(1):103-15.
- Morimoto T, Yamasaki M, Nakata K, Tsuji M, Nakamura H. The expression of macrophage and neutrophil elastases in rat periradicular lesions. *J Endod*. 2008 Sep;34(9):1072-6.
- Morris G, Gevezova M, Sarafian V, Maes M. Redox regulation of the immune response. *Cell Mol Immunol*. 2022 Oct;19(10):1079-1101.
- Mullen L, Mengozzi M, Hanschmann EM, Alberts B, Ghezzi P. How the redox state regulates immunity. *Free Radic Biol Med*. 2020 Sep;157:3-14.
- Mutua V, Gershwin LJ. A Review of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Disease: Potential Anti-NETs Therapeutics. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021 Oct;61(2):194-211.
- Nagendrababu V, Kishen A, Murray PE, Nekoofar MH, de Figueiredo JAP, Priya E, Jayaraman J, Pulikkotil SJ, Camilleri J, Silva RM, Dummer PMH. PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *Int Endod J*. 2021 Jun;54(6):848-857.
- Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov 1;15(6):348-81.
- Napetschnig J, Wu H. Molecular basis of NF- κ B signaling. *Annu Rev Biophys*. 2013;42:443-68.
- 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;179(1):199-210.
- Ndrepepa G. Myeloperoxidase - A bridge linking inflammation and oxidative stress with cardiovascular disease. *Clin Chim Acta*. 2019;493:36-51.
- Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan AU, Yan A, Cheung GSP. Biofilms in endodontics - Current status and future directions. *Int J Mol Sci*. 2017; 11;18(8):1748.

- Novakovic N, Todorovic T, Rakic M, Milinkovic I, Dozic I, Jankovic S, Aleksic Z, Cacic S. Salivary antioxidants as periodontal biomarkers in evaluation of tissue status and treatment outcome. *J Periodontal Res.* 2014;49(1):129–136.
- Oliveira SR, de Arruda JAA, Schneider AH, Carvalho VF, Machado CC, Corrêa JD, Moura MF, Duffles LF, de Souza FFL, Ferreira GA, Costa FO, Abreu LG, Taba Júnior M, Fukada SY, de Oliveira RDR, Louzada-Júnior P, Cunha FQ, Silva TA. Are neutrophil extracellular traps the link for the cross-talk between periodontitis and rheumatoid arthritis physiopathology? *Rheumatology (Oxford).* 2021 Dec 24;61(1):174-184.
- Ou Z, Dolmatova E, Lassègue B, Griendling KK. β 1- and β 2-integrins: central players in regulating vascular permeability and leukocyte recruitment during acute inflammation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2021 Feb 1;320(2):H734-H739.
- Palathingal P, Mahendra J, Annamalai PT, Varma SS, Mahendra L, Thomas L, Baby D, Jose A, Srinivasan S, R A. A Cross-sectional study of serum glutathione peroxidase: an antioxidative marker in chronic periodontitis and chronic kidney disease. *Cureus.* 2022 Feb 8;14(2):e22016.
- Palmer LJ, Cooper PR, Ling MR, Wright HJ, Huissoon A, Chapple ILC. Hypochlorous acid regulates neutrophil extracellular trap release in humans. *Clin Exp Immunol.* 2012;167(2):261-8.
- Pan W, Xin Q, Xu J, He J, Chen Z, Hu X, Li T, Zhu Y, Wei W, Wu Y. IgD enhances the release of neutrophil extracellular traps (NETs) via Fc γ R in rheumatoid arthritis patients. *Int Immunopharmacol.* 2023 Jan;114:109484.
- Panigrahy D, Gilligan MM, Serhan CN, Kashfi K. Resolution of inflammation: An organizing principle in biology and medicine. *Pharmacol Ther.* 2021 Nov;227:107879.
- Papayannopoulos V, Metzler KD, Hakkim A, Zychlinsky A. Neutrophil elastase and myeloperoxidase regulate the formation of neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol.* 2010;191(3):677–91.
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol.* 2018;18:134–147.
- Park SH, Ye L, Love RM, Farges JC, Yumoto H. Inflammation of the Dental Pulp. *Mediators Inflamm.* 2015:980196.
- Parker H, Dragunow M, Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Requirements for NADPH oxidase and myeloperoxidase in neutrophil extracellular trap formation differ depending on the stimulus. *J Leukoc Biol.* 2012 Oct;92(4):841-9.
- Paula-Silva FWG, Ribeiro-Santos FR, Petean IBF, et al. Root canal contamination or exposure to lipopolysaccharide differentially modulate prostaglandin E 2 and leukotriene B 4 signaling in apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190699.
- Perricone C, De Carolis C, Perricone R. Glutathione: a key player in autoimmunity. *Autoimmun Rev.* 2009 Jul;8(8):697-701.

Pilsczek FH, Salina D, Poon KK, Fahey C, Yipp BG, Sibley CD, Robbins SM, Green FH, Surette MG, Sugai M, Bowden MG, Hussain M, Zhang K, Kubes P. A novel mechanism of rapid nuclear neutrophil extracellular trap formation in response to *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*. 2010;185(12):7413-25.

Pinchuk I, Shoal H, Dotan Y, Lichtenberg D. Evaluation of antioxidants: scope, limitations and relevance of assays. *Chem Phys Lipids*. 2012 Sep;165(6):638-47.

Pitocco D, Tesauro M, Alessandro R, Ghirlanda G, Cardillo C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. *Int J Mol Sci*. 2013;14(11): 21525–21550.

Polanco XBJ, Bertasso AS, Silveira HA, Yamamoto de Almeida L, Almeida LKY, da Silva RAB, da Silva LAB, de Rossi A, Nelson-Filho P, León JE. IgG4-positive plasma cells are more often detected in chronic periapical lesions arising from permanent rather than primary teeth. *Int Endod J*. 2021 May;54(5):682-692.

Poprac P, Jomova K, Simunkova M, Kollar V, Rhodes CJ, Valko M. Targeting free radicals in oxidative stress-related human diseases. *Trends Pharmacol Sci*. 2017;38(7):592-607.

Pu J, Guardia CM, Keren-Kaplan T, Bonifacino JS. Mechanisms and functions of lysosome positioning. *J Cell Sci*. 2016;129(23):4329-4339.

Pucinelli CM, Lima RB, Almeida LKY, Lucisano MP, Córdoba AZ, Marchesan JT, da Silva LAB, da Silva RAB. Interferon-gamma inducible protein 16 and type I interferon receptors expression in experimental apical periodontitis induced in wild-type mice. *Int Endod J*. 2022 Oct;55(10):1042-1052.

Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br Med Bull*. 1993 Jul;49(3):556-65.

Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC, Moreau A, Alliot-Licht B. Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *J Dent Res*. 2016 Feb;95(2):196-205.

Rendra E, Riabov V, Mossel DM, Sevastyanova T, Harmsen MC, Kzhyshkowska J. Reactive oxygen species (ROS) in macrophage activation and function in diabetes. *Immunobiology*. 2019;224(2):242-253.

Rocha MMNP, Moreira JLB, Menezes DB, Cunha MPSS, Carvalho CBM. Estudo bacteriológico de lesões periapicais. *Rev Odontol Univ São Paulo*. 1998;12(3):215–23.

Root-Bernstein R. From Co-Infections to Autoimmune Disease via Hyperactivated Innate Immunity: COVID-19 Autoimmune Coagulopathies, Autoimmune Myocarditis and Multisystem Inflammatory Syndrome in Children. *Int J Mol Sci*. 2023 Feb 3;24(3):3001.

Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 2020;108(1):377-396.

- Rosazza T, Warner J, Sollberger G. NET formation - mechanisms and how they relate to other cell death pathways. *FEBS J.* 2021 Jun;288(11):3334-3350.
- Rosini E, Pollegioni L. Reactive oxygen species as a double-edged sword: The role of oxidative enzymes in antitumor therapy. *Biofactors.* 2022 Mar;48(2):384-399.
- Saari H, Suomalainen K, Lindy O, Konttinen YT, Sorsa T. Activation of latent human neutrophil collagenase by reactive oxygen species and serine proteases. *Biochem Biophys Res Commun.* 1990 Sep 28;171(3):979-87.
- Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod.* 1993 Feb 1;19(2):76-8.
- Sardaro N, Della Vella F, Incalza MA, DI Stasio D, Lucchese A, Contaldo M, Laudadio C, Petruzzi M. Oxidative stress and oral mucosal diseases: an overview. *In Vivo.* 2019;33(2):289-296.
- Sasaki H, Balto K, Kawashima N, Eastcott J, Hoshino K, Akira S, Stashenko P. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2004 Jan;11(1):106-10.
- Schönrich G, Raftery MJ, Samstag Y. Devilishly radical NETwork in COVID-19: Oxidative stress, neutrophil extracellular traps (NETs), and T cell suppression. *Adv Biol Regul.* 2020 Aug;77:100741.
- Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell.* 2010 Mar 19;140(6):821-32.
- Scozzi D, Liao F, Krupnick AS, Kreisel D, Gelman AE. The role of neutrophil extracellular traps in acute lung injury. *Front Immunol.* 2022 Jul 29;13:953195.
- Sczepanik FSC, Grossi ML, Casati M, Goldberg M, Glogauer M, Fine N, Tenenbaum HC. Periodontitis is an inflammatory disease of oxidative stress: We should treat it that way. *Periodontol 2000.* 2020 Oct;84(1):45-68.
- Senoner T, Dichtl W. Oxidative Stress in Cardiovascular Diseases: Still a Therapeutic Target? *Nutrients.* 2019;11(9):2090.
- Shetty SS, Maruthi M, Dhara V, de Arruda JAA, Abreu LG, Mesquita RA, Teixeira AL, Silva TA, Merchant Y. Oral mucositis: Current knowledge and future directions. *Dis Mon.* 2022 May;68(5):101300.
- Sies H, Belousov VV, Chandel NS, Davies MJ, Jones DP, Mann GE, Murphy MP, Yamamoto M, Winterbourn C. Defining roles of specific reactive oxygen species (ROS) in cell biology and physiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2022 Jul;23(7):499-515.
- Sies H, Jones DP. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Jul;21(7):363-383.

Silva CMS, Wanderley CWS, Veras FP, Sonogo F, Nascimento DC, Gonçalves AV, Martins TV, Cólón DF, Borges VF, Brauer VS, Damasceno LEA, Silva KP, Toller-Kawahisa JE, Batah SS, Souza ALJ, Monteiro VS, Oliveira AER, Donate PB, Zoppi D, Borges MC, Almeida F, Nakaya HI, Fabro AT, Cunha TM, Alves-Filho JC, Zamboni DS, Cunha FQ. Gasdermin D inhibition prevents multiple organ dysfunction during sepsis by blocking NET formation. *Blood*. 2021 Dec 23;138(25):2702-2713.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod*. 2002;28(2):94-98.

Silva MJ, Kajiya M, AlShwaimi E, Sasaki H, Hong J, Ok P, Rezende TM, Pagonis TC, White RR, Paster BJ, Stashenko P, Kawai T. Bacteria-reactive immune response may induce RANKL-expressing T cells in the mouse periapical bone loss lesion. *J Endod*. 2012 Mar;38(3):346-50.

Silva, LAB. Tratamento Endodôntico em Crianças. Santana de Parnáiba: Manole, 2022.

Silvagno F, Vernone A, Pescarmona GP. The role of glutathione in protecting against the severe inflammatory response triggered by COVID-19. *Antioxidants (Basel)*. 2020 Jul 16;9(7):624.

Singhal A, Kumar S. Neutrophil and remnant clearance in immunity and inflammation. *Immunology*. 2022 Jan;165(1):22-43.

Smallwood MJ, Nissim A, Knight AR, Whiteman M, Haigh R, Winyard PG. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. *Free Radic Biol Med*. 2018 Sep;125:3-14.

Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Di Lucrezia R, Kordes S, Menninger S, Eickhoff J, Nussbaumer P, Klebl B, Krüger R, Herzig A, Zychlinsky A. Gasdermin D plays a vital role in the generation of neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol*. 2018;3(26):eaar6689.

Sonoda S, Mei YF, Atsuta I, Danjo A, Yamaza H, Hama S, Nishida K, Tang R, Kyumoto-Nakamura Y, Uehara N, Kukita T, Nishimura F, Yamaza T. Exogenous nitric oxide stimulates the odontogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *Sci Rep*. 2018 Feb 21;8(1):3419.

Souza CN, Breda LCD, Khan MA, de Almeida SR, Câmara NOS, Swezey N, Palaniyar N. Alkaline pH promotes NADPH oxidase-independent neutrophil extracellular trap formation: A matter of mitochondrial reactive oxygen species generation and citrullination and cleavage of histone. *Front Immunol*. 2018;8:1849.

Spiller F, Oliveira Formiga R, Fernandes da Silva Coimbra J, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. *Nitric Oxide*. 2019;89:32-40.

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

Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Oct;78(4):494-502.

Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*. 1992 Sep;18(9):422-6.

Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol*. 1990 Jun;6(3):89-96.

Steven S, Frenis K, Oelze M, et al. Vascular inflammation and oxidative stress: major triggers for cardiovascular disease. *Oxid Med Cell Longev*. 2019;2019:7092151.

Stoiber W, Obermayer A, Steinbacher P, Krautgartner WD. The Role of Reactive Oxygen Species (ROS) in the Formation of Extracellular Traps (ETs) in Humans. *Biomolecules*. 2015 May 4;5(2):702-23.

Stojkov D, Amini P, Oberson K, Sokollik C, Duppenhaler A, Simon HU, Yousefi S. ROS and glutathionylation balance cytoskeletal dynamics in neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2017 Dec 4;216(12):4073-4090.

Strycharz-Dudziak M, Fołtyn S, Dworzański J, Kielczykowska M, Malm M, Drop B, Polz-Dacewicz M. Glutathione Peroxidase (GPx) and Superoxide Dismutase (SOD) in oropharyngeal cancer associated with EBV and HPV coinfection. *viruses*. 2020 Sep 9;12(9):1008.

Su LJ, Zhang JH, Gomez H, Murugan R, Hong X, Xu D, Jiang F, Peng ZY. Reactive Oxygen Species-Induced Lipid Peroxidation in Apoptosis, Autophagy, and Ferroptosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2019 Oct 13;2019:5080843.

Sun Y, Lu Y, Saredy J, Wang X, Drummer Iv C, Shao Y, Saaoud F, Xu K, Liu M, Yang WY, Jiang X, Wang H, Yang X. ROS systems are a new integrated network for sensing homeostasis and alarming stresses in organelle metabolic processes. *Redox Biol*. 2020 Oct;37:101696.

Suzuki T, Kumamoto H, Ooya K, Motegi K. Expression of inducible nitric oxide synthase and heat shock proteins in periapical inflammatory lesions. *J Oral Pathol Med*. 2002 Sep;31(8):488-93.

Swetha P, Ramesh K, Madhavan N, Veeravarmal V, Sameera A. Expression of inducible nitric oxide synthase in the epithelial linings of odontogenic keratocyst, dentigerous cyst and radicular cyst: a pathological insight. *Ann Med Health Sci Res*. 2014 Jul;4(4):583-9.

Tan C, Aziz M, Wang P. The vitals of NETs. *J Leukoc Biol*. 2021 Oct;110(4):797-808.

Tanabe S, O'Brien J, Tollefsen KE, Kim Y, Chauhan V, Yauk C, Huliganga E, Rudel RA, Kay JE, Helm JS, Beaton D, Filipovska J, Sovadinova I, Garcia-Reyero N, Mally A, Poulsen SS, Delrue N, Fritsche E, Luettich K, La Rocca C, Yepiskoposyan H, Klose J, Danielsen PH, Esterhuizen M, Jacobsen NR, Vogel U, Gant TW, Choi I, FitzGerald R. Reactive oxygen species in the adverse outcome pathway framework: toward creation of harmonized consensus key events. *Front Toxicol*. 2022 Jul 6;4:887135.

- Tauffenberger A, Magistretti PJ. Reactive Oxygen Species: Beyond Their Reactive Behavior. *Neurochem Res.* 2021 Jan;46(1):77-87.
- Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020 Oct 6;36:191-218.
- Thoma A, Lightfoot AP. NF- κ B and Inflammatory Cytokine Signalling: Role in Skeletal Muscle Atrophy. *Adv Exp Med Biol.* 2018;1088:267-279.
- Thomas DD. Breathing new life into nitric oxide signaling: A brief overview of the interplay between oxygen and nitric oxide. *Redox Biol.* 2015;5:225-233.
- Tomar B, Anders HJ, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells.* 2020;9(6):1383.
- 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.
- Topcu K, Kırıcı DÖ, Evcil MS. Catalase activity in healthy and inflamed pulp tissues of permanent teeth in young people. *Niger J Clin Pract.* 2016 Sep-Oct;19(5):600-2.
- Tóthová L, Celec P. Oxidative stress and antioxidants in the diagnosis and therapy of periodontitis. *Front Physiol.* 2017;8:1055.
- Tsosura TVS, Dos Santos RM, Chaves Neto AH, Chiba FY, Carnevali ACN, Mattera MSLC, Belardi BE, Cintra LTÂ, da Silva Machado NE, Matsushita DH. Maternal apical periodontitis increases insulin resistance and modulates the antioxidant defense system in the gastrocnemius muscle of adult offspring. *J Endod.* 2021 Jul;47(7):1126-1131.
- Tsuji M, Yamasaki M, Amano K, Matsui H, Morimoto T, Nakamura H. Histochemical localization of neutral proteases released during development of rat periradicular lesion. *Arch Oral Biol.* 2009 Dec;54(12):1128-35.
- Uddin M, Watz H, Malmgren A, Pedersen F. NETopathic Inflammation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease and Severe Asthma. *Front Immunol.* 2019 Feb 5;10:47.
- Ujiie Y, Oida S, Gomi K, Arai T, Fukae M. Neutrophil elastase is involved in the initial destruction of human periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2007 Aug;42(4):325-0.
- Uribe-Querol E, Rosales C. Phagocytosis: Our Current Understanding of a Universal Biological Process. *Front Immunol.* 2020 Jun 2;11:1066.
- van der Vliet A, Janssen-Heininger YM. Hydrogen peroxide as a damage signal in tissue injury and inflammation: murderer, mediator, or messenger? *J Cell Biochem.* 2014 Mar;115(3):427-35.

- Van Rossum G, Drake FL. Python 3 Reference Manual, Scotts Valley, CA: CreateSpace, 2009.
- Varvara G, Pinchi V, Caputi S, D'Arcangelo C, Scarano A, Sinjari B, Murmura G. Copper-zinc superoxide dismutase activity in dental pulp after dental preparation. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012 Oct-Dec;26(4):769-73.
- Vengerfeldt V, Mändar R, Saag M, Piir A, Kullisaar T. Oxidative stress in patients with endodontic pathologies. *J Pain Res*. 2017 Aug 24;10:2031-2040.
- Veras FP, Pontelli MC, Silva CM, Toller-Kawahisa JE, de Lima M, Nascimento DC, Schneider AH, Caetité D, Tavares LA, Paiva IM, Rosales R, Colón D, Martins R, Castro IA, Almeida GM, Lopes MIF, Benatti MN, Bonjorno LP, Giannini MC, Luppino-Assad R, Almeida SL, Vilar F, Santana R, Bollela VR, Auxiliadora-Martins M, Borges M, Miranda CH, Pazin-Filho A, da Silva LLP, Cunha LD, Zamboni DS, Dal-Pizzol F, Leiria LO, Siyuan L, Batah S, Fabro A, Mauad T, Dolhnikoff M, Duarte-Neto A, Saldiva P, Cunha TM, Alves-Filho JC, Arruda E, Louzada-Junior P, Oliveira RD, Cunha FQ. SARS-CoV-2-triggered neutrophil extracellular traps mediate COVID-19 pathology. *J Exp Med*. 2020 Dec 7;217(12):e20201129.
- Vitkov L, Hartl D, Minnich B, Hannig M. Janus-Faced Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis. *Front Immunol*. 2017 Oct 26;8:1404.
- Vitkov L, Knopf J, Krunić J, Schauer C, Schoen J, Minnich B, Hannig M, Herrmann M. Periodontitis-Derived Dark-NETs in Severe Covid-19. *Front Immunol*. 2022 Apr 12;13:872695.
- Vollbracht C, Kraft K. Oxidative Stress and Hyper-Inflammation as Major Drivers of Severe COVID-19 and Long COVID: Implications for the Benefit of High-Dose Intravenous Vitamin C. *Front Pharmacol*. 2022 Apr 29;13:899198.
- Vorobjeva NV, Chernyak BV. NETosis: Molecular Mechanisms, Role in Physiology and Pathology. *Biochemistry (Mosc)*. 2020 Oct;85(10):1178-1190.
- Wan CY, Li L, Liu LS, Jiang CM, Zhang HZ, Wang JX. Expression of Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases during Apical Periodontitis Development. *J Endod*. 2021 Jul;47(7):1118-1125.
- Wan Y, Shen J, Ouyang J, Dong P, Hong Y, Liang L, Liu J. Bibliometric and visual analysis of neutrophil extracellular traps from 2004 to 2022. *Front Immunol*. 2022 Oct 21;13:1025861.
- Wang HW, Lai EH, Yang CN, Lin SK, Hong CY, Yang H, Chang JZ, Kok SH. Intracanal Metformin Promotes Healing of Apical Periodontitis via Suppressing Inducible Nitric Oxide Synthase Expression and Monocyte Recruitment. *J Endod*. 2020 Jan;46(1):65-73.
- Wang M, Ishikawa T, Lai Y, Nallapothula D, Singh RR. Diverse Roles of NETosis in the Pathogenesis of Lupus. *Front Immunol*. 2022 May 24;13:895216.

- Wang X, Sun S, Duan Z, Yang C, Chu C, Wang K, Liu B, Ding W, Li W, Li J. Protective effect of ethyl pyruvate on gut barrier function through regulations of ROS-related NETs formation during sepsis. *Mol Immunol*. 2021 Apr;132:108-116.
- Wang Y, Andrukhov O, Rausch-Fan X. Oxidative Stress and Antioxidant System in Periodontitis. *Front Physiol*. 2017;8:910.
- Wauquier F, Leotoing L, Coxam V, Guicheux J, Wittrant Y. Oxidative stress in bone remodelling and disease. Vol. 15, *Trends Mol Med*. 2009;15(10):468–77.
- Wójcik P, Gęgotek A, Žarković N, Skrzydlewska E. Oxidative stress and lipid mediators modulate immune cell functions in autoimmune diseases. *Int J Mol Sci*. 2021 Jan 13;22(2):723.
- Wu D, Yan L, Zheng C, Ren X, Pan Y, Huang S, Pan L, Li Z. Akt-GSK3 β -mPTP pathway regulates the mitochondrial dysfunction contributing to odontoblasts apoptosis induced by glucose oxidative stress. *Cell Death Discov*. 2022 Apr 5;8(1):168.
- Yang PS, Huang WC, Chen SY, Chen CH, Lee CY, Lin CT, Huang YK. Scaling-stimulated salivary antioxidant changes and oral-health behavior in an evaluation of periodontal treatment outcomes. *Sci World J*. 2014;2014:814671.
- Yang Y, Bazhin A, Werner J, Karakhanova S. Reactive oxygen species in the immune system. *International Reviews of Immunology*. *Int Rev Immunol*. 2013;32(3):249-70.
- Ye S, Li S, Ma Y, Hu D, Xiao F. Curcumin hinders PBDE-47-induced neutrophil extracellular traps release via Nrf2-associated ROS inhibition. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021 Dec 1;225:112779.
- Ye S, Li S, Ma Y, Hu D, Xiao F. Curcumin hinders PBDE-47-induced neutrophil extracellular traps release via Nrf2-associated ROS inhibition. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2021 Dec 1;225:112779.
- Yin W, Liu S, Dong M, Liu Q, Shi C, Bai H, Wang Q, Yang X, Niu W, Wang L. A new NLRP3 inflammasome inhibitor, dioscin, promotes osteogenesis. *Small*. 2020;16(1):1905977.
- Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytnuik LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, de Boisfleury Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubes P. Infection-induced NETosis is a dynamic process involving neutrophil multitasking in vivo. *Nat Med*. 2012;18(9):1386-93.
- Yoon SO, Park SJ, Yoon SY, Yun CH, Chung AS. Sustained production of H₂O₂ activates pro-matrix metalloproteinase-2 through receptor tyrosine kinases/phosphatidylinositol 3-kinase/NF- κ B pathway. *J Biol Chem*. 2002 Aug 16;277(33):30271-82.
- Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod*. 1987 Nov;13(11):535-40.

Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs)-formation and implications. *Acta Biochim Pol.* 2013;60(3):277-84.

Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med.* 2002 Aug 1;33(3):337-49.

Zhang H, Wang Y, Qu M, Li W, Wu D, Cata JP, Miao C. Neutrophil, neutrophil extracellular traps and endothelial cell dysfunction in sepsis. *Clin Transl Med.* 2023 Jan;13(1):e1170.

Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature.* 2011 Jan 13;469(7329):221-5.

Zhu Y, Wang D, Luo J, Jie J, Liu H, Peng L, Bai X, Li D. Zingerone Inhibits the Neutrophil Extracellular Trap Formation and Protects against Sepsis via Nrf2-Mediated ROS Inhibition. *Oxid Med Cell Longev.* 2022 Jan 28;2022:3990607.

Żukowski P, Maciejczyk M, Waszkiel D. Sources of free radicals and oxidative stress in the oral cavity. *Arch Oral Biol.* 2018 Aug;92:8-17.

ANEXO

ANEXO A

APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto



São Paulo, 09 de Junho de 2021

Ilmo(a)

Dr(a). Raquel Assed Bezerra Segato

Certificamos que a proposta intitulada **"RELAÇÃO ENTRE STRESS OXIDATIVO E ARMADILHAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS NA GÊNESE E DESENVOLVIMENTO DA LESÃO PERIAPICAL EM ANIMAIS WLD-TYPE E KNOCKOUT PARA PAD4"**, registrada com o nº **0009/2021R2**, sob a responsabilidade de **Raquel Assed Bezerra Segato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 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), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do/a Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, em reunião do dia 16 de Abril de 2021.

Vigência da Autorização: 16/04/2021 a 16/04/2023						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo isogênico	C57BL/6	8 semanas	20.0 g	42	0	42
Camundongo Knockout	PAD4	8 semanas	20.0 g	72	0	72
Origem: biotério - Centro de Criação de Camundongos Especiais				TOTAL		114

Atenciosamente,

Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva
Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

Prof. Dr. Michel Reis Messoria
Vice-Coodenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa