



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



VIVIAN VICENTIN MASSONI

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

Ribeirão Preto
2023

VIVIAN VICENTIN MASSONI

**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. Raquel Assed Bezerra Segato

VERSÃO CORRIGIDA

Ribeirão Preto

2023

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E/OU DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Massoni, Vivian Vicentin

Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos na gênese e desenvolvimento da lesão periapical induzida experimentalmente em camundongos. Ribeirão Preto, 2023.

90 p. : 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. Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos 2. Neutrófilos; 3. Lesão Periapica 4. Imuno-histoquímica 5. RT-PCR.

FOLHA DE APROVAÇÃO

MASSONI, VV. **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.

Área de Concentração: Odontopediatria.

Data da Defesa: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a).

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a).

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato – Orientadora e Presidente da Banca

Examinadora

Assinatura: _____

DADOS CURRICULARES

VIVIAN VICENTIN MASSONI

Nascimento	26 de junho de 1997 – Araras/SP
Filiação	Adilson Edson Massoni Rosemary Vicentin Massoni
2015-2019	Curso de Graduação Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
2016-2016	Iniciação Científica – Projeto de pesquisa intitulado “Caracterização Imunoistoquímica de Bcl-2 em Carcinomas Espinocelulares da Cavidade Bucal” Orientador: Prof. Dr. Jorge Esquiche León.
2020-2023	Cursando Pós-Graduação em Odontopediatria, nível Mestrado Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – FORP/USP – Dissertação intitulada: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos na gênese e desenvolvimento da lesão periapical induzida experimentalmente em camundongos.
2022-2023 Preto- SP	Cursando Especialização em Endodontia – Instituto Grisi – Ribeirão

DEDICO ESTE TRABALHO...

À **Deus**, que sabe de todas as coisas, e me permitiu buscar meus objetivos e realizar meus sonhos

Aos meus pais,

Rosemary Vicentin Massoni e Adilson Edson Massoni pelo apoio incondicional, em todos os sentidos sempre. Amo vocês!

Ao meu namorado,

Matheus Ferreira Falsarelli, por todos os momentos inesquecíveis e pelo apoio constante. Obrigada por acreditar no meu potencial e por ter trazido paz ao meu coração! Você é uma pessoa especial na minha vida. Amo você!

A todos os **familiares** e **amigos** que sempre me motivaram e torceram por mim.

AGRADECIMENTOS **E**SPECIAIS...

À **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato**, pela oportunidade de realizar este trabalho de mestrado, por tudo o que me ensinou ao longo desses anos de convívio, desde a graduação, iniciação científica e mestrado. Pela paciência e pela dedicação com meu crescimento pessoal e profissional. Sempre fonte de inspiração e referência como professora e pesquisadora. Foi uma honra ser sua orientada. Muito obrigada!

À **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**, pela oportunidade de realizar este trabalho e todo o apoio e suporte para que ele fosse realizado. Muito obrigada!

À **Profa. Marília Pacífico Lucisano**, pela disponibilidade e paciência. Você foi fundamental para o meu crescimento profissional. Sempre muito solícita e delicada, foi um exemplo para mim.

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 Programa de Pós-Graduação em Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, na pessoa da Coordenadora, **Profa. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato** e da Vice-Coordenadora **Profa. Dra. Léa Assed Bezerra da Silva**.

À **CAPES**, pela bolsa concedida.

Aos demais **professores** do Departamento de Clínica Infantil da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo por todas as aulas e disciplinas, os ensinamentos durante minha formação acadêmica e científica.

Aos professores da disciplina de Ortodontia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo: **Prof. Dr. Fábio Lourenço Romano**, **Prof. Dr. José Tarcísio Lima Ferreira**, **Profa. Dra. Mírian Aiko Nakane Matsumoto**, **Profa. Dra. Maria Bernadete Sasso Stuani**, pela

convivência agradável no mesmo departamento, pelas orientações e ensinamentos transmitidos.

A todos os **pós-graduandos** do Programa de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pelo apoio e companheirismo durante o período de mestrado.

Aos funcionários do Departamento de Clínica Infantil- **Fátima Aparecida Rizoli, Mary Possani Carmessano, Filomena Leli Placciti e Matheus Morelli Zanela** pela disponibilidade, bom humor, apoio e paciência.

Aos **funcionários** da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, pelo auxílio durante todas as atividades, pela amizade e atenção a mim dispensada.

Aos funcionários do Biotério da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, **Raphael Martini Vicente , Aldo Dias Feiteiro Júnior** pela paciência, disposição em ajudar e por todo auxílio no cuidado com os animais.

Aos técnicos de laboratório, **Nilza Letícia Magalhães, Marco Antônio dos Santos e Arlete Aparecida Caramori**, por tornar meus dias muito mais fáceis, felizes, sendo sempre muito solícitos, torcendo por nós. Obrigada pela amizade!

À **Solange de Oliveira Braga Franzolin**, que tanto me ajudou na parte estatística do trabalho, com muita paciência e dedicação, meu muito obrigada!

Às amigas do grupo de pesquisa, **Carolina Maschietto Pucinelli, Lisa Danielly Curcino Araujo, Lana Key Yamamoto de Almeida, Clara Marina Pereira Cavalcanti Silva, Mariana de Oliveira Daltoé.** Muito obrigada por todos os momentos de alegria, apreensão, cumplicidade, e principalmente ajuda! Levarei um pouquinho de cada uma sempre comigo, e deixo um pedacinho de contribuição de cada uma neste trabalho. Obrigada pelos momentos únicos de pós-graduandas.

Aos amigos e colegas ingressantes do programa: **Márcio Santana Carvalho, Lucas Masaru Marubayashi, Alana Cândido Paulo, Luciano Aparecido de Almeida Júnior,** obrigada por me acompanharem de perto nessa caminhada, sempre incentivando e apoiando uns aos outros.

RESUMO

Massoni, VV. **Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos na Gênese e Desenvolvimento da Lesão Periapical Induzida Experimentalmente em Camundongos.**

Ribeirão Preto, 2023. 92p. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação das armadilhas extracelulares de neutrófilos em lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos *wild-type* (WT). Para o estudo, foram utilizados 55 animais com 6 a 8 semanas de idade, pesando em média 20 gramas. Com exceção dos animais do período controle (dia 0), todos os demais do grupo experimental apresentaram lesões periapicais induzidas nos primeiros molares mandibulares e foram avaliados após 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Após os períodos experimentais, os animais foram eutanasiados, sendo as hemi-mandíbulas direitas dissecadas para posterior análise microscópica por meio de coloração hematoxilina e eosina (HE) (descrição do tecido pulpar e das regiões apical e periapical), histomorfometria em microscopia de fluorescência (mensuração das lesões periapicais), recrutamento de neutrófilos polimorfonucleares na região periapical e imuno-histoquímica (expressão de mieloperoxidase, elastase, PAD4, catepsina G e histona H3 citrulinada). Além disso, as hemi-mandíbulas esquerdas foram submetidas a técnica de biologia molecular RT-PCR para avaliar a expressão gênica de *PADI4*, *MPO*, *ELANE*, *H3C1* e *CTSG*. Os dados numéricos foram analisados por meio dos programas computacionais GraphPad 7, sendo empregados os testes: Kruskal-Wallis, ANOVA, Dunn e Mann-Whitney. Todas as conclusões relativas à parte inferencial foram realizadas no nível de 5% de significância. A área da lesão aumentou progressivamente com o tempo, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (0 dias) e entre os períodos experimentais de 7, 21 e 42 dias ($p < 0,05$), e também entre 21 e 42 dias. Já para a contagem de neutrófilos, observou-se aumento progressivo com o decorrer do tempo, com maior número nos períodos de 21 e 42 dias, com diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Houve, também, diferença estatística ao comparar os dias 2, 5 e 7 com os períodos finais de 21 e 42 dias ($p < 0,05$). Concordantemente, aos 21 e 42 dias houve maior co-localização de MPO e CitH3, sugerindo a participação das Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) na lesão periapical, com diferença estatística ($p < 0,05$) entre 21 e 42 dias em relação ao grupo controle. Em geral, houve maior expressão gênica de *PADI4* aos 7 dias, com diferença estatística ($p < 0,05$) entre 0 dias em relação a 5 e 21 dias, 2 dias e 5 e 21 dias e entre 21 e 42 dias. Para o gene *MPO*, observou-se maior expressão em 21 dias, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os períodos de 2, 5, 7 e 21 dias. Adicionalmente, os períodos de 2, 5 e 7 dias apresentaram diferença estatística em relação a 42 dias. Já a expressão de *ELANE* foi maior em 5 e 21 dias de lesão, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre grupo controle em relação a 5 e 7 dias, e 5 e 7 dias em comparação a 42 dias. Houve maior expressão de *H3C1* aos 21 e 42 dias de lesão, com diferença estatística ($p < 0,05$) entre o período de 2 dias em relação a 5, 21 e 42 dias. No entanto, não foi possível observar diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre os grupos experimentais em relação ao grupo controle. Por último, a expressão de *CTSG* foi maior aos 21 dias de lesão, sendo que o grupo controle e o período de 2 dias foram estatisticamente

diferentes ($p < 0,05$) dos períodos de 7 e 21 dias. Os resultados permitiram evidenciar a presença das armadilhas extracelulares de neutrófilos em lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos, 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.

Palavras-chave: Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos; Neutrófilos; Lesão Periapical; Imuno-histoquímica; RT-PCR.

ABSTRACT

Massoni, W. **Neutrophil Extracellular Traps in the Genesis and Development of Experimentally Induced Periapical Lesion in Mice.** Ribeirão Preto, 2023. 92p. [Dissertação de Mestrado]. Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

The aim of the present study was to evaluate the participation of neutrophil extracellular traps in experimentally induced periapical lesions in wild-type (WT) mice. For the study, 55 animals aged 6 to 8 weeks, weighing an average of 20 grams, were used. Except for the animals in the control period (day 0), all animals in the experimental group had periapical lesions induced in the mandibular first molars and were evaluated after 2, 5, 7, 21 and 42 days. After the experimental periods, the animals were euthanized and the right hemimandibles were dissected for subsequent microscopic analysis using hematoxylin and eosin (HE) staining (description of the pulp tissue and the apical and periapical regions), histomorphometry in fluorescence microscopy (measurement of periapical lesions), recruitment of polymorphonuclear neutrophils in the periapical region and immunohistochemistry (expression of myeloperoxidase, elastase, PAD4, cathepsin G and histone H3 citrullinated). In addition, left hemi-mandibles were subjected to RT-PCR molecular biology technique to evaluate the gene expression of PADI4, MPO, ELANE, H3C1 and CTSG. The numerical data were analyzed using the GraphPad 7 computer program, using the following tests: Kruskal-Wallis, ANOVA, Dunn and Mann-Whitney. All conclusions regarding the inferential part were made at the 5% significance level. The lesion area increased progressively over time, with a statistically significant difference between the control group (0 days) and between the experimental periods of 7, 21 and 42 days ($p < 0.05$), and also between 21 and 42 days. As for the neutrophil count, there was a progressive increase over time, with higher numbers in the periods of 21 and 42 days, with a statistically significant difference when compared to the control group ($p < 0.05$). There was also a statistical difference when comparing days 2, 5 and 7 with the final periods of 21 and 42 days ($p < 0.05$). Concordantly, at 21 and 42 days there was greater co-localization of MPO and CitH3, suggesting the participation of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in the periapical lesion, with a statistical difference ($p < 0.05$) between 21 and 42 days compared to the control group. In general, there was higher gene expression of PADI4 at 7 days, with statistical difference ($p < 0.05$) between 0 days compared to 5 and 21 days, 2 days and 5 and 21 days, and between 21 and 42 days. For the MPO gene, we observed higher expression at 21 days, with a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the control group and the periods of 2, 5, 7 and 21 days. Additionally, the periods of 2, 5 and 7 days showed a statistical difference compared to 42 days. The expression of ELANE was higher at 5 and 21 days of injury, with a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the control group compared to 5 and 7 days, and 5 and 7 days compared to 42 days. There was higher expression of H3C1 at 21 and 42 days of injury, with a statistically significant difference ($p < 0.05$) between the 2 day period compared to 5, 21 and 42 days. However, no statistically significant difference ($p > 0.05$) could be observed between the experimental groups compared to the control group. Finally, the expression of CTSG was higher at 21 days of injury, and the control group and the 2-day period were statistically different ($p < 0.05$) from the 7 and 21-day periods. The results showed the presence of extracellular neutrophil traps in experimentally

induced periapical lesions in mice, especially in the late periods of evaluation, concomitantly with higher numbers of neutrophils. Additionally, PAD4 and CTSG proteins were also present during periapical lesion progression, suggesting an action on tissue degradation, potentiating the inflammatory response and periapical lesion progression.

Keywords: Neutrophil Extracellular Traps; Neutrophils; Periapical Lesion; Immunohistochemistry; RT-PCR

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS.....	29
2.1 Objetivos gerais	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Indução das lesões periapicais.....	32
3.2 Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica.....	33
3.3 Análise Descritiva do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical	34
3.4 Histomorfometria para Mensuração das Lesões Periapicais.....	34
3.5 Número de Neutrófilos Polimorfonucleares na Região Periapical.....	35
3.6 Imuno-histoquímica	36
3.7 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).....	38
3.8 Análise Estatística	39
4. RESULTADOS.....	41
4.1 Análise Microscópica Descritiva do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical .	41
4.2 Histomorfometria para Mensuração das Lesões Periapicais.....	45
4.3 Número de Neutrófilos Polimorfonucleares na Região Periapical.....	47
4.4 Imuno-histoquímica	48
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR).....	60
5. DISCUSSÃO	67
6. CONCLUSÕES	76
REFERÊNCIAS	78
ANEXO	89

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A lesão periapical ou periodontite apical é resultado da progressão da infecção proveniente de lesão de cárie ou trauma dental que, após induzir a necrose do tecido pulpar, atinge a região periapical (Siqueira e Rôças, 2014; Sánchez-Sanhueza, 2018; Barbosa-Ribeiro et al., 2021; Galler et al., 2021). É caracterizada por um processo imune-inflamatório crônico, com a presença de uma microbiota polimicrobiana, dissociação fibrilar e reabsorção de tecidos mineralizados (cimento e tecido ósseo) (Stashenko et al., 1990; Siqueira e Rôças, 2014; Sánchez-Sanhueza et al., 2018; Silva et al., 2018; Galler et al., 2021; Silva et al., 2022).

De acordo com Tibúrcio-Machado et al. (2021), a prevalência mundial de indivíduos com, pelo menos, um dente com lesão periapical é de 52%. Esses autores demonstraram, ainda, que indivíduos saudáveis têm uma frequência menor de dentes com lesão periapical em comparação a pessoas com alguma doença sistêmica. Os dados desse estudo demonstram que a alta prevalência de lesões periapicais pode levar à perda dental, comprometendo a qualidade de vida das pessoas. Além disso, destaca-se que uma lesão periapical não tratada pode ser uma fonte de inflamação sistêmica, uma vez que estudos têm relacionado a presença dessas lesões com doenças sistêmicas, como doenças cardiovasculares e diabetes (Gomes et al. 2013; Khalighinejad et al. 2016; Tibúrcio-Machado et al., 2021).

Paralelamente, ressalta-se que as taxas de sucesso relacionadas ao tratamento endodôntico de dentes com vitalidade ou ainda com necrose pulpar e sem lesão periapical visível radiograficamente, quando respeitados princípios técnicos e biológicos cientificamente comprovados, são, em média, de 96% (Swartz et al., 1983; Sjogren et al., 1990; Smith et al., 1993; Skupien et al., 2013; Ng et al., 2011; Ricucci et al., 2011; Santos-Junior et al., 2019). Por outro lado, o tratamento endodôntico de dentes decíduos e permanentes portadores de necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente ainda representa um desafio, uma vez que sua taxa de sucesso está em torno de 62% a 85% (Swartz et al., 1983; Sjogren et al., 1990; Smith et al., 1993; Skupien et al., 2013; Ng et al., 2011; Ricucci et al., 2011; Santos-Junior et al., 2019).

Nesse contexto, é importante destacar que, nos casos de dentes com necrose

pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, a infecção é polimicrobiana com prevalência das bactérias gram-negativas, que possuem em sua parede celular o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) ou endotoxina bacteriana. Esse conhecimento é de grande relevância clínica uma vez que, ao entrar em contato com o tecido, o LPS estimula a resposta imune e a reabsorção óssea e cementária (Silva et al., 2002; Silva, 2018; Paula-Silva et al., 2020).

Assim, torna-se fundamental a realização de estudos direcionados para a avaliação dos diferentes aspectos que influenciam o sucesso do tratamento endodôntico e, dentre esses aspectos evidencia-se a resposta imune inflamatória do hospedeiro.

Ao longo dos últimos 15 anos, diferentes estudos liderados pelo nosso grupo de pesquisa têm avaliado diversos aspectos da resposta imune do hospedeiro como células, citocinas, receptores e diferentes moléculas envolvidas no desenvolvimento da lesão periapical que podem influenciar as taxas de sucesso do tratamento endodôntico de dentes decíduos e permanentes (da Silva et al., 2012; Bezerra da Silva et al., 2014; de Oliveira et al., 2015; de Oliveira et al., 2017; Barreiros et al., 2018a,b; Romualdo et al., 2018a,b; Bertasso et al., 2020; Silva et al., 2020; Lucisano et al., 2021; Pucinelli et al., 2022).

Dentre as células fundamentais da resposta imune do hospedeiro, destacam-se os neutrófilos. Essas células são os leucócitos mais abundantes no sangue e os primeiros tipos celulares a chegarem aos tecidos afetados (Rosales, 2020).

Os neutrófilos têm origem nas células primordiais pluripotentes na medula óssea e compõem a primeira linha de defesa contra os patógenos, sendo reguladores chave da imunidade inata e adaptativa.

Durante a infecção, os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local infectado, em consequência de um processo denominado quimiotaxia, que é ativado por endotoxinas e outros mediadores liberados pelos patógenos (Zawrotniak et al., 2013). Após essa ativação, ocorre a adesão dessas células ao endotélio vascular, coordenada por mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), advindos das células do hospedeiro ou dos patógenos associados. A partir dessa adesão dos neutrófilos ao endotélio das vênulas, ocorre a diapedese, que consiste na migração dos neutrófilos para o exterior do vaso, para então acontecer o seu

deslocamento para o meio extravascular, acumulando-se assim na área inflamada/infectada (Delves et al., 2000; Jiang et al., 2021).

O combate aos patógenos pelos neutrófilos pode acontecer de quatro maneiras distintas. A primeira é por meio da fagocitose - os pseudópodes presentes na superfície dos neutrófilos se ligam aos patógenos e dão início ao processo, formando os fagossomos, ou seja, vesículas de internalização, para então liberar as espécies reativas de oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species - ROS) e de nitrogênio (NO) que, em conjunto com enzimas contidas nos grânulos, eliminam os patógenos (Galli et al., 2011; Rosales, 2020). Um segundo mecanismo de combate aos patógenos está relacionado à degranulação intracelular e extracelular dos neutrófilos, que consiste na rápida liberação dos quatro tipos de grânulos pré-formados intracelularmente pelos neutrófilos, visando a morte e digestão dos patógenos. Os grânulos primários ou azurófilos contêm mieloperoxidase, elastase de neutrófilos e defensina e têm a função de morte e digestão de patógenos; os grânulos secundários, ricos em lactoferrina, sequestram o ferro, importante para o crescimento microbiano; os grânulos terciários ou de gelatinase contêm proteínas de gelatinase, como a metaloproteinase-9 da matriz (MMP-9), que é importante para a degradação das proteínas da matriz extracelular; e os grânulos de secreção contêm albumina sérica e citocinas (Hager et al., 2010; Rosales et al., 2020).

Ademais a estes mecanismos de defesa, há a liberação de ROS (espécies reativas de oxigênio) pelos neutrófilos que são potentes antimicrobianos, pois geram danos a lipídios, proteínas e DNA microbianos, além de atuarem no ácido nucleico e membranas celulares dos patógenos (Nguyen et al. 2017, Pérez-Figueroa et al., 2021).

Adicionalmente, os neutrófilos podem ainda apresentar um quarto mecanismo antimicrobiano, descrito primeiramente por Brinkmann em 2004, chamado de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (neutrophil extracellular traps - NETs).

As NETs são estruturas tridimensionais com prolongamentos semelhantes a uma "rede" extracelular, capazes de atuar na resolução de infecções, mas também atuam como barreira física contra a presença de patógenos (White et al., 2016; Brinkmann, 2018; Thiam et al., 2020).

Os principais componentes proteicos dessas armadilhas são as histonas, seguidas de outras enzimas e peptídeos, como a elastase de neutrófilos (NE),

mieloperoxidase (MPO), catepsina G, enzima proteinase-3 (PR3), lactoferrina, gelatinase, lisozima C, calprotectina, defensinas de neutrófilos e catelicidinas, além de DNA nuclear de neutrófilos (Tsai et al., 2021). Os mecanismos antimicrobianos das NETs consistem em aprisionar e imobilizar os patógenos, enquanto as substâncias contidas em sua estrutura, como MPO e NE, desencadeiam a morte dos microorganismos (Cooper et al., 2013). O aprisionamento dos patógenos se dá pela atração eletrostática entre os componentes de carga positiva da parede bacteriana com aqueles de carga negativa, como da cromatina. A MPO é responsável pela geração do agente microbicida ácido hipocloroso, e a elastase consegue romper a membrana bacteriana (Pu et al., 2016). Um outro componente envolvido na liberação das NETs, a Gasdemina D (GSDMD), também contribui para a ação antimicrobiana, pois enquanto a GSDMD-p30 facilita a permeabilização da membrana plasmática para a liberação das NETs, e posterior aprisionamento dos microrganismos, também há a ativação do inflamassoma NLRP3, que vai aumentar a secreção de IL-1 β , uma citocina capaz de induzir o recrutamento dos neutrófilos circulantes para o local da infecção, potencializando a morte dos patógenos imobilizados pelas armadilhas extracelulares (Chen et al., 2018).

A liberação das NETs ocorre via NETose, processo que envolve diversas vias de sinalização e ativação, sendo subdividido, didaticamente, em NETose suicida e NETose vital (Burgener et al., 2020). Há, ainda, uma terceira via de ativação, alternativa, denominada NETose não-canônica, também descrita como *noncanonical netosis* (Burgener et al., 2020).

A NETose suicida corresponde à morte celular programada do neutrófilo, processo que se difere da apoptose ou necrose por apresentar mudanças estruturais, como a desintegração da membrana nuclear, a mescla de componentes citoplasmáticos e nucleares e a perda de organelas citoplasmáticas e da membrana interna (Brinkman et al., 2004; Fuchs et al., 2007; Kumar et al., 2018; de Vasconcelos et al., 2019; Thiam et al., 2020).

O estímulo dessa NETose resulta da ação de NADPH-oxidase, além da liberação de ROS. A partir disso, ocorre uma cascata de eventos, dependentes da proteína quinase C (PKC) e da enzima peptidil arginina deiminase-4 (PAD4), que culmina na clivagem de histonas e descondensação da cromatina nuclear (Wang et al., 2009;

White et al., 2016; Block et al., 2022). A presença de mieloperoxidase e elastase, sinergicamente, também conduz à descondensação da cromatina. Assim, a integridade da membrana nuclear é perdida, o conteúdo nuclear se mistura ao conteúdo citoplasmático, formando estruturas tridimensionais compostas de espessas fibras de cromatina com proteínas, e peptídeos citoplasmáticos e granulares, as NETS. Sabe-se que esse rompimento da membrana plasmática resultando na expulsão da cromatina nuclear para o meio extracelular é mediado pela enzima Gasdermina D (GSMD), cuja ativação é dependente da clivagem por elastase e mieloperoxidase, gerando a Gasdermina D – p30 (GSMD-p30) (Chen et al., 2018).

É importante salientar que alguns autores vêm relatando que a NETose suicida pode ocorrer independentemente de alguns componentes isoladamente, como a NADPH oxidase, elastase e PAD4, a partir dos diferentes estímulos a que o neutrófilo é submetido. Como na presença de ionóforos de cálcio, molécula usualmente sintetizada por micro-organismos para transportar íons através da bicamada lipídica da membrana celular, utilizados como estímulo de NETs, a liberação dessas armadilhas ocorreu mesmo sem a participação de PKC, ROS, MPO ou NE (Kenny et al. 2017). Adicionalmente, Claushuis et al. (2018) observaram a presença de estruturas semelhantes a NETs em um modelo experimental de pneumonia induzida com *Klebsiella pneumoniae* mesmo na ausência de PAD4 em animais knockout para essa proteína. Além disso, em um estudo em lesões ateroscleróticas e em resposta a cristais de colesterol, in vitro, a citrulinização de histonas mediada por PAD4 pareceu ser dispensável para NETosis, além de que as NETs não citrulinadas pelo PAD4 continham marcadores NET típicos, como NE, MPO, e histona H3 processada proteoliticamente (Tsouroutsoglou et al., 2020).

Paralelamente, foi demonstrado que é possível a célula permanecer viável após a liberação das NETs durante a NETose vital, a partir de uma estratégia antimicrobiana mais rápida em que a membrana plasmática é preservada e o neutrófilo é capaz de executar suas funções de fagocitose e quimiotaxia (Clark et al., 2007; Yousefi et al., 2009). Ainda não está totalmente claro como a liberação das NETs ocorre neste processo, no entanto, tem-se conhecimento da complexidade na interação hospedeiro-patógeno, pois vários receptores de superfície parecem ser necessários. Yipp et al. (2012) demonstraram a participação indispensável do receptor TLR-2 para a formação

de NETs na infecção por *Staphylococcus aureus* em ratos. Já Wan et al. (2017) observaram que a ausência de TLR-2 e TLR-4 suprimiu a formação de NETs na exposição in vitro por *S. aureus*. Na presença de *Candida albicans*, o sistema complemento também se mostrou envolvido na formação de NETs (Byrd et al., 2013, Burgener et al., 2020). Além disso, A NETose vital pode acontecer pela estimulação de neutrófilos por infecções de bactérias específicas, como a *Staphylococcus aureus* (Yipp et al., 2012), fungos - *Candida albicans* (Byrd et al., 2013), ativação de plaquetas ou proteínas complemento (Yipp et al., 2012; Byrd et al., 2013; Burgener et al., 2020).

A NETose vital decorre da sinalização de cálcio, ativação de PAD4 e citrulinização das histonas para mediar a descondensação do DNA (Naffah de Souza et al., 2018; Burgener et al., 2020). Alguns autores sugerem que a extrusão celular ocorre por meio de vesículas, sem a morte do neutrófilo, e que seu conteúdo é composto por DNA mitocondrial ao invés de DNA nuclear (Yousefi et al., 2009; Itagaki et al., 2015; Lood et al., 2016; Block et al., 2022). Adicionalmente, as NETs contendo esse DNA mitocondrial são capazes de induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias por células imunes (Keshari et al., 2012; Lood et al., 2016).

Diferentemente da NETose suicida clássica, uma via alternativa de NETose suicida foi descrita recentemente, denominada *noncanonical NETosis*. Ela é ativada a partir da detecção de bactérias gram-negativas pelos neutrófilos, como a *Salmonella enterica* e a *Citrobacter rodentium*. Essa via depende dos inflamassomas não-canônicos e canônicos, já que os LPS das bactérias acionam esses inflamassomas, que vão levar a dois processos principais, aparentemente complementares: a ativação das caspases-4/5 e caspase-1 em humanos, e caspase-11 em camundongos, além da ativação da GSMD para clivagem em GSDM-p30 (Chen et al., 2018; Burgener et al., 2020).

Com a clivagem da GSMD em GSDMD-p30, ocorrerá o rompimento das membranas nucleares e granulares dos neutrófilos e, eventualmente, também a membrana plasmática (Sollberger et al. 2018). Essa ruptura da membrana plasmática, com a extrusão do conteúdo intracelular para o meio extracelular, culmina na lise celular e morte de neutrófilos (Gabriel et al., 2017).

É importante salientar que esse processo acontece de forma dispensável da presença de elastase dos neutrófilos e mieloperoxidase. Para realizar a função de

clivagem das histonas que seria exercida pela NE, a GSDMD-p30 permite que a caspase-11 entre no núcleo e degrade as histonas, além de promover o relaxamento da cromatina. A enzima PAD4 parece acompanhar o processo da *noncanonical NETosis*, mas não é essencial para a extrusão das NETs como na NETose suicida (White et al., 2016; Chen et al., 2018).

A enzima PAD4 representa um papel crucial na formação das NETs (Li et al., 2010; Hounkpe et al., 2020). Ela é expressa principalmente em macrófagos, neutrófilos e eosinófilos, e faz parte da família PAD (PAD1-4 e PAD6), além de possuir um sinalizador de localização nuclear na molécula dependente de cálcio (Nakashima et al., 2002; Wang et al., 2013; Liu et al., 2021, Song et al., 2023). Sua contribuição para a formação das NETs se dá pela descondensação da cromatina, presença na regulação gênica e pela citrulinização das histonas H1 e H3 (Zhu D et al., 2022).

As enzimas PAD convertem arginina em citrulina, ou seja, a PAD depende de Ca^{2+} para participar da citrulinização e catalisa a conversão da arginina em citrulina, resultando na liberação de amônia (Zhu et al., 2022). Mais especificamente, as enzimas PAD2 e PAD4 induzem a citrulinização das histonas nucleares, promovendo a descondensação da cromatina, culminando na NETose e liberação das NETs. A enzima PAD2 é o membro mais amplamente expresso entre a família PAD e pode citrulinizar centenas de proteínas além das histonas (Wu et al., 2020). Além da participação em NETs, a citrulinização mediada por PAD faz parte de outros processos fisiológicos, incluindo apoptose, queratose da pele, reprodução e regulação da função da bainha de mielina (Zhu et al., 2022).

Após a ação das NETs, são gerados debris celulares, que precisam ser removidos do meio. Para isso, os macrófagos e células dendríticas são quimicamente atraídos para o local da infecção para facilitar a remoção desses debris (Holder et al., 2019). Ademais, a produção das NETs promove uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa, pois estimula o aumento da ativação das células T, principalmente as células T-helper (TCD4+ e TCD8+) (Tillack et al., 2012; Rosales et al., 2020).

Apesar da principal função das NETs ser promover a morte de micro-organismos, a liberação do seu conteúdo para o meio extracelular em grande quantidade, pode gerar danos colaterais aos tecidos adjacentes. Esse efeito prejudicial deve-se à exposição às proteases associadas aos prolongamentos dos neutrófilos,

como as enzimas MPO, NE e ROS, capazes de gerar a perda da tolerância a autoantígenos, o que é considerado um fator etiológico importante no desenvolvimento de doenças autoimunes (Nakazawa et al., 2012; Meng et al., 2012; Zhou et al., 2021).

Em pacientes portadores de lúpus eritematoso, por exemplo, a grande concentração de NETs vem sendo correlacionada com o desenvolvimento dessa doença (Hakim et al., 2010; Wang et al., 2022). Estudos em animais sugerem que as NETs podem promover o lúpus através de pelo menos três mecanismos diferentes: indução de autoanticorpos específicos; promoção da secreção de IFN tipo I, através da ativação de células dendríticas plasmocitoides; e indução da transição endotelial-mesenquimal (Fresneda et al., 2021; Wang et al., 2022).

Na artrite reumatóide (AR), condição inflamatória sistêmica crônica e autoimune, caracterizada pela inflamação das articulações sinoviais, os estudos revelam a capacidade dos neutrófilos em gerar danos aos tecidos através da sua ativação desregulada, tanto pela sua presença em grande número nos locais de inflamação, quanto pela liberação de seu conteúdo citotóxico diretamente nos tecidos do hospedeiro (Fresneda et al., 2021, Wright et al., 2021). Spengler et al. (2015) detectaram as NETs, por meio da coloração positiva para CD15, elastase, MPO e histona citrulinada (CitH3), em tecidos de biópsia sinovial. Além disso, diferentes autores demonstraram proteínas contidas nas NETs, como MPO, CTSG, NE e lactoferrina, no soro e no líquido sinovial de pacientes com AR (Pieterse et al., 2018; Birkelun et al., 2020). A exposição dessas proteínas está relacionada à patogênese da AR, por meio da clivagem proteolítica e ativação de citocinas e quimiocinas, clivagem de receptores solúveis para iniciar a sinalização trans (como o receptor de IL-6) e degradação da cartilagem (Wright et al., 2021).

Tendo em vista que a maioria das proteínas relacionadas com a NETose são também importantes para os mecanismos de fagocitose e regulação de citocinas, tem sido um desafio a definição da contribuição específica das NETs na defesa imune. Sabe-se, porém, que, em humanos, a deficiência absoluta de MPO leva à ocorrência de infecções fúngicas recorrentes (Milligan et al., 2016; Papayannopoulos et al., 2018). Estudos com camundongos deficientes de MPO são consistentes com o papel crucial das NETs contra patógenos que são grandes demais para serem fagocitados e

eliminados intracelularmente, como alguns fungos (Branzk et al., 2014; Papayannopoulos et al., 2018). A importância das NETs na resolução de infecções fúngicas também é suportada pelo restabelecimento da NETose em pacientes portadores de CGD, uma doença genética granulomatosa crônica, após a implementação de terapia genética (Bianchi et al., 2009; Papayannopoulos et al., 2018).

A liberação de NETs tem sido demonstrada também em resposta a infecções virais, como HIV (Saitoh et al., 2012; Papayannopoulos et al., 2018) e outros vírus (Funchal et al., 2015; Papayannopoulos et al., 2018).

Em contraste aos recentes achados que demonstram a função imune-protetiva especializada das NETs, a patogênese de diferentes condições sistêmicas tem sido associada às NETs. Um dano celular direto provocado pelas NETs tem sido associado a infecções, sepse, arteriosclerose, isquemia, trombose, câncer e metástase tumoral (Papayannopoulos et al., 2018; Laridan et al., 2019; Masucci et al., 2020; Klopff et al., 2021; Khan et al., 2021).

No contexto da pandemia pelo covid-19, alguns autores vêm destacando a presença das NETs na patogênese e desenvolvimento da infecção pelo vírus Sars-CoV 2 (Tomar et al., 2020; Pastorek et al., 2022). A partir da entrada dos vírus nas células humanas, há a infiltração de neutrófilos nos pulmões, e posterior liberação das NETs. Com a formação dessas armadilhas extracelulares de neutrófilos, há a liberação de DAMPS no espaço extracelular circundante, que induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e vice-versa, criando um ciclo de necroinflamação responsável pela tempestade de citocinas e sepse, processos que podem agravar o quadro dos pacientes infectados (Tomar et al., 2020). Recentemente, Kim et al. (2022), em um estudo in vivo, demonstraram que altas taxas das proteínas histona H3, elastase de neutrófilos e de DNA livre de células (dsDNA) em infectados estiveram intimamente relacionadas com a baixa taxa de sobrevivência dos pacientes. Esses três marcadores correlacionaram-se significativamente com marcadores inflamatórios. Assim, o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas direcionadas aos neutrófilos, como inibidores do recrutamento de neutrófilos ou da formação de NETs, poderá auxiliar na redução da mortalidade em pacientes com COVID-19 (Tomar et al., 2020; Kim et al., 2022).

Pelo exposto, diversos estudos têm avaliado a presença e implicação das NETs em doenças, como as cardiovasculares (Kithcart et al., 2018; McCarthy et al., 2021), além da vasculite de pequenos vasos, artrite reumatóide (Apel et al., 2018), lúpus eritematoso (Lee et al., 2017, Matta et al., 2022), doença granulomatosa crônica (Yu et al., 2021), sepse infantil (Colón et al., 2019), entre outras. Assim, as NETs tornaram-se foco de intensa investigação como possíveis alvos terapêuticos e aplicações clínicas.

Com relação aos processos imuno-inflamatórios na cavidade bucal, a literatura tem destacado a participação das NETs nas doenças periodontais, especialmente em estudos de revisão de literatura (White et al., 2016; Kumar et al., 2018; Vitkov et al., 2020). Um estudo piloto realizado por Magán-Fernandez et al. (2019), indicou que a apresentação das NETs está associada às fases agudas do processo inflamatório periodontal, além de ter demonstrado uma menor quantidade nos casos de periodontite quando comparados aos casos de gengivite.

Hirschfeld et al. (2017) realizaram um extenso estudo no qual avaliaram, a partir de neutrófilos isolados de sangue periférico estimulados com 19 bactérias periodontopatogênicas, a expressão de NETs e ROS, assim como de proteínas como elastase, mieloperoxidase e catepsina G. Os autores observaram que alguns micro-organismos, como por exemplo *Veillonella parvula* e *Streptococcus gordonii*, estimularam níveis elevados de NETs e ROS. Adicionalmente, demonstrou-se que as NETs aprisionaram mas não foram capazes de destruir todas as bactérias testadas. Interessantemente, observou-se também, que os inibidores de receptores não apresentaram efeitos na liberação de NETs e ROS. Esses dados sugerem que a variabilidade de resposta dos neutrófilos a diferentes tipos bacterianos pode contribuir para a patogênese das doenças periodontais por meio de diferentes mecanismos moleculares.

Recentemente, Roberts et al. (2022) demonstraram, em um estudo in vivo, que os níveis de ROS e NETs aumentaram após 21 dias de acúmulo de placa e consequente quadro de gengivite em pacientes voluntários, sistemicamente saudáveis.

Já na área da Endodontia, poucos estudos na literatura abordam a relação das NETs com as doenças do complexo dentino-pulpar. Um estudo de Holder et al. (2019) realizado em cultura de células buscou avaliar a influência das NETs na polpa dental infectada, e como os seus componentes afetam as respostas das células pulpares. Esses autores concluíram que as NETs têm importante papel na patogênese das

doenças pulpares, com injúrias e efeitos inflamatórios crônicos nas células da polpa, o que pode contribuir para a progressão da doença. Além disso, o estudo demonstrou que as NETs e as histonas podem representar novos marcadores e/ou alvos terapêuticos para as patologias pulpares.

Recentemente, um estudo demonstrou a expressão de armadilhas extracelulares de neutrófilos, por meio de imunofluorescência da histona citrulinada 3 (citH3) 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 (Fuji et al., 2021). Entretanto, não há, até o momento, estudos que avaliaram a participação das NETs na gênese e desenvolvimento de lesões periapicais.

Assim, tendo em vista a importância das NETs na patogênese de diferentes doenças sistêmicas e condições inflamatórias e ausência de estudos no contexto das lesões periapicais, estudos são necessários a fim de elucidar a participação desse componente inflamatório na patogênese das doenças pulpares, especificamente na formação e progressão da lesão periapical.

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

O presente estudo teve como objetivo avaliar a participação das armadilhas extracelulares de neutrófilos na gênese e desenvolvimento de lesões periapicais induzidas experimentalmente em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

1. Análise descritiva do processo inflamatório e histomorfometria para a mensuração das lesões periapicais, por meio de coloração hematoxilina e eosina (HE);
2. Avaliação microscópica da presença e localização de mieloperoxidase (MPO), elastase (NE), histona H3 citrulinada (CitH3), PAD4 e catepsina-G (CTSG), por meio de imuno-histoquímica;
3. Avaliação da expressão gênica de *PADI4* (PAD4), *MPO* (mieloperoxidase), *ELANE* (elastase), *H3C1* (histona H3) e *CTSG* (catepsina-G), por meio de RT-PCR.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, o projeto foi 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 2020.1.243.58.4- Anexo A).

O delineamento do projeto foi baseado nas diretrizes ARRIVE (*Animal Research: Reporting of In Vivo Experiments*) (Kilkenny et al., 2010; Percie du Sert et al., 2020). 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.

Foram utilizados 55 camundongos da linhagem C57BL/6 com 6 a 8 semanas de idade e pesando em média 20 gramas, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto da USP. Todos os animais foram mantidos no Biotério I da FORP/USP com ração padrão e livre acesso à água.

Para o grupo controle (dia 0), foram utilizados 5 animais para todas as análises, considerando dentes hígidos (sem indução de lesão periapical). Já para os períodos experimentais subsequentes (2, 5, 7 e 42 dias) foram utilizados 10 animais por período e todos os animais tiveram lesão periapical induzida. A Tabela 1 demonstra a divisão dos grupos utilizados, evidenciando os períodos experimentais, o número de animais por grupo e as análises que foram realizadas em cada grupo.

Tabela 1. Descrição da divisão dos grupos e períodos experimentais, número de animais por grupo e análises realizadas.

Grupo	Períodos Experimentais	Hemi-mandíbula	Número de Animais	Análises
WT	0, 2, 5, 7, 21 e 42 dias	Direita	5 animais/ grupo controle/ 10 animais período experimental	Imuno marcação
			5 animais grupo controle/ 10 animais período experimental	HE
		Esquerda	5 animais grupo controle/ 10 animais período experimental	qRT-PCR

3.1 Indução das lesões periapicais

Foi realizada a indução de lesão periapical em todos os animais dos grupos dos 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). 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, eles foram imobilizados em uma mesa de retração da mandíbula, de forma a permanecerem com a boca aberta para adequada visualização dos molares inferiores. Após o acesso à coroa dental no primeiro molar inferior esquerdo e direito por meio de uma peça de mão elétrica com broca esférica em baixa rotação (nº ¼ - KG Sorensen), montada em motor de baixa rotação e contra-ângulo (Dabi Atlante Equipamentos Odontológicos), o tecido pulpar dos primeiros molares inferiores foi exposto à cavidade bucal, até que a entrada de acesso aos canais radiculares pudesse ser visualizada e verificada com uma lima endodôntica tipo K número 8 (Maillefer S/A, Suíça), sendo a polpa radicular removida

parcialmente com a mesma lima. Dessa forma, os canais radiculares permaneceram expostos à microbiota bucal. Decorridos os períodos experimentais de 2, 5, 7, 21, e 42 dias e controle 0 dias, os animais foram anestesiados e eutanasiados em câmara de gás carbônico (CO₂), sendo as mandíbulas dissecadas para posterior processamento histotécnico, realização do qRT-PCR e análise dos resultados.

3.2 Processamento Histotécnico e Avaliação Microscópica

Para a realização da análise microscópica em hematoxilina e eosina (HE) e imunomarcação foram utilizadas as hemi-mandíbulas direitas de cada experimental nos períodos de 2, 5, 7, 21, e 42 dias e de cada grupo no dia 0 (controle).

Após a eutanásia dos animais, as mandíbulas foram removidas com tesoura cirúrgica esterilizada, 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 após, em média, 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% e 95% por 30 minutos cada; 2 trocas de 100% por 20 minutos cada e 2 trocas de álcool 100% por 40 minutos cada), diafanizadas em xilol (2 banhos de 20 minutos e 1 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 semi-seriados de 5µm, com intervalos de 15µm, foram obtidos em toda a extensão da lesão periapical, exceto na região do forame apical, onde todos os cortes foram coletados sem intervalos. Por amostra, foram obtidas de 15 a 22 lâminas, com 3 cortes em cada lâmina.

3.3 Análise Descritiva do Canal Radicular e das Regiões Apical e Periapical

Os cortes de cada grupo experimental e controle foram corados com HE e submetidos à análise em microscopia óptica convencional, para descrição do tecido pulpar e das regiões apical e periapical. Além disso, esses cortes tiveram função metodológica, uma vez que os cortes utilizados para a imunomarcagem foram escolhidos após análise daqueles corados com HE. Foram escolhidos os cortes subsequentes daqueles que apresentarem a raiz distal dos primeiros molares inferiores, em cortes mostrando simultaneamente os terços coronário, médio e apical do canal radicular, o forame apical e o osso alveolar. Essa análise foi realizada para o melhor entendimento dos tipos celulares presentes na região periapical, uma vez que a coloração HE permite uma visão panorâmica de todo o processo da doença (infiltrado inflamatório, reabsorção dentinária e óssea, fibras colágenas, etc), e assim fazer possíveis correlações com os resultados obtidos na análise imuno-histoquímica.

Para essas análises, 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 foram realizadas por um único avaliador experiente, sem conhecimento prévio do grupo a ser analisado.

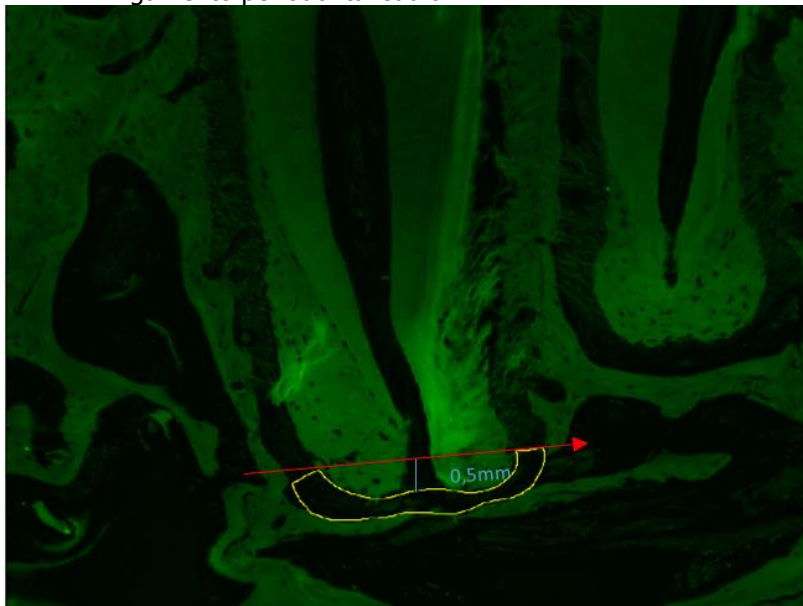
3.4 Histomorfometria para Mensuração das Lesões Periapicais

A análise morfométrica da extensão das lesões periapicais foi realizada utilizando os espécimes corados com HE, utilizando o microscópio Axio Imager.M1, em aumento de 10x, operando no modo fluorescente, conforme descrito por De Rossi et al., 2007, Silva et al., 2012 Bezerra da Silva et al., 2014 e de Oliveira et al., 2015. Utilizou-se o filtro Alexa Fluor 488 (AF488) com excitação de G365, refletores FT395 e emissão LP420.

Foi efetuada a mensuração nos espécimes do Grupo 0 dias (dentes hígidos; controle negativo) a fim de estabelecer a espessura do ligamento periodontal sadio, na região apical. Com o auxílio do software Image J (National Institutes of Health, EUA), foi traçada uma linha perpendicular à raiz, situada 0,5mm acima da abertura apical de

cada espécime, delimitando assim a altura máxima da medição da área do ligamento periodontal (Figura 1).

Figura 1. Representação da mensuração nos espécimes do grupo controle (dia 0), a fim de estabelecer a espessura do ligamento periodontal sadio.



Para cada espécime, a extensão (área) da lesão periapical foi delineada e mensurada em mm^2 , empregando também o software Image J. 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 e infiltrado inflamatório, identificadas pela ausência de fluorescência e aparência escurecida.

3.5 Número de Neutrófilos Polimorfonucleares na Região Periapical

O número de neutrófilos foi contado utilizando lâminas coradas por HE em microscopia de luz convencional, nos períodos de 0, 2, 5, 7, 21 e 42 dias. A contagem foi realizada na região central da lesão periapical, em um campo microscópico de

aproximadamente 0,01mm². Os neutrófilos foram identificados de acordo com sua morfologia característica de células escuramente coradas com núcleos multilobulados em formato de ferradura (De Rossi et al., 2007; da Silva et al., 2012), sendo os resultados expressos em número de células por espécime.

3.6 Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas por meio da técnica da imunoperoxidase (da Silva et al., 2012; de Oliveira et al., 2015; de Oliveira et al., 2017; Barreiros et al., 2018; Pucinelli et al., 2022) para marcação de mieloperoxidase, elastase, catepsina-G, histona h3 citrulinada e PAD4 (Tabela 2).

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 diluídos em BSA 1%. Após retornarem à temperatura ambiente, as lâminas foram novamente lavadas e incubadas com anticorpo secundário biotinilado 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 o microscópio Axio Imager. M1 (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen, Alemanha) sob luz convencional. Para a análise dos marcadores Catepsina G e PAD4, os resultados foram expressos de maneira qualitativa, levando-se em consideração a presença/ausência e intensidade de marcação, por meio do seguinte sistema de escores: 0 (ausência de marcação), 1 (marcação suave), 2 (marcação moderada) e escore 3 (marcação intensa), além da localização das marcações.

Para a melhor visualização da formação de armadilhas extracelulares de neutrófilos, foi realizada a coloração imuno-histoquímica para os marcadores mieloperoxidase e histona H3 citrulinada, e elastase e histona H3 citrulinada, 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). A análise foi realizada em aumentos de x10, x40 e x100, conforme preconizado por Gonçalves et al., 2012. No aumento de x10 foram escolhidas as áreas que apresentavam maior quantidade de células imunomarcadas. No aumento de x40, foram fotografados campos representativos de cada espécime para capturar a marcação extracelular de cada marcador. As imagens subsequentes foram sobrepostas com auxílio do software Photoshop e o número de pontos marcados sobrepostos, positivos para marcação extracelular de ambos os marcadores, foi contado. A análise foi realizada pelo método quantitativo, sendo os resultados expressos em número de pontos sobrepostos por espécime. No aumento de 100x, foram fotografados regiões representativas da lesão periapical, evidenciando marcações extracelulares e formação das armadilhas. Para a captura das imagens, foi utilizado o software de análise de imagens ZEN 3.4 (Zeiss ZEN lite).

Tabela 2. Anticorpos utilizados na imuno-histoquímica

Anticorpo	Espécie	Distribuidora/ Cat. Num.
NE	Coelho	Abcam AB68672
MPO	Coelho	Abclonal A1374
CitH3	Coelho	Abcam AB5103
PAD4	Coelho	Abcam AB214810
CTSG	Coelho	Biorbyt orb539066

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

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).

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) foram analisadas como genes constitutivos (*housekeeping*). Com esta técnica foi avaliada a expressão de RNAm de *PADI4* (PAD4), *ROMO 1* (ROS), *MPO* (mieloperoxidase), *ELANE* (elastase), *H3C1* (histona h3) e *CTSG* (catepsina-G). 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 $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.8 Análise Estatística

Os dados numéricos foram analisados por meio do programa computacional GraphPad Prism 7 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA), sendo empregados Shapiro-Wilk para teste de normalidade, o teste paramétrico Anova e pós teste de Tukey, teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e teste não-paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5% .

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

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

No grupo controle, o tecido pulpar estava sadio, com tecido conjuntivo normal, camada odontoblástica íntegra e ausência de infiltrado inflamatório. O ligamento periodontal se encontrava com aspecto de normalidade, com presença de fibras e células organizadas em todos os espécimes. Além disso, a superfície cementária e osso alveolar estavam regulares.

No grupo de 2 dias, o tecido pulpar se mostrava alterado, já com necrose parcial. O ligamento periodontal apresentava espessura normal, com infiltrado inflamatório suave. O osso alveolar normal apresentando osteoblastos na sua superfície e a superfície cementária regular com ausência de reabsorções.

No grupo de 5 dias, o tecido pulpar se encontrava alterado, variando de necrose parcial a necrose moderada do tecido pulpar, com infiltrado inflamatório de moderado para severo em todos os espécimes. O ligamento periodontal estava normal e suavemente aumentado, com infiltrado inflamatório suave no periápice. O osso alveolar e a superfície cementária estavam com ausência de reabsorções.

No período de 7 dias, o tecido pulpar já se encontrava totalmente necrosado, com infiltrado inflamatório severo. O ligamento periodontal estava suavemente e moderadamente aumentado, com infiltrado inflamatório misto predominantemente crônico, variado de suave a moderado. O osso alveolar se apresentava normal e com osteoblastos em sua superfície. A superfície cementária era regular e sem reabsorção.

Aos 21 dias, havia necrose total do tecido pulpar, com infiltrado inflamatório severo. O ligamento periodontal se encontrava moderadamente ou severamente aumentado, com infiltrado inflamatório, variando de moderado a severo. O osso alveolar estava irregular e com presença de reabsorção, sendo visíveis muitos

osteoclastos e ausência de osteoblastos. Porém, a superfície cementária se encontrava sem reabsorção.

No grupo de 42 dias, o tecido pulpar estava totalmente necrosado, com infiltrado inflamatório severo. O ligamento periodontal se encontrava severamente aumentado, com infiltrado inflamatório também severo. Havia áreas extensas de reabsorção da superfície cementária e do osso alveolar. O osso alveolar já estava desintegrado, com ausência da lâmina dura.

As Figuras 2 e 3 evidenciam os principais achados microscópicos após a análise de lesões periapicais induzidas e grupo controle, em diferentes períodos experimentais.

Figura 2. Fotomicrografias representativas dos eventos microscópicos observados após a indução das lesões periapicais e animais WT, no grupo controle de 0 dia (A, B e C), e períodos experimentais 2 dias (D, E e F) e 5 dias (G, H, I). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e observados em microscópio óptico (ZEISS 10x, 20x e 40x).

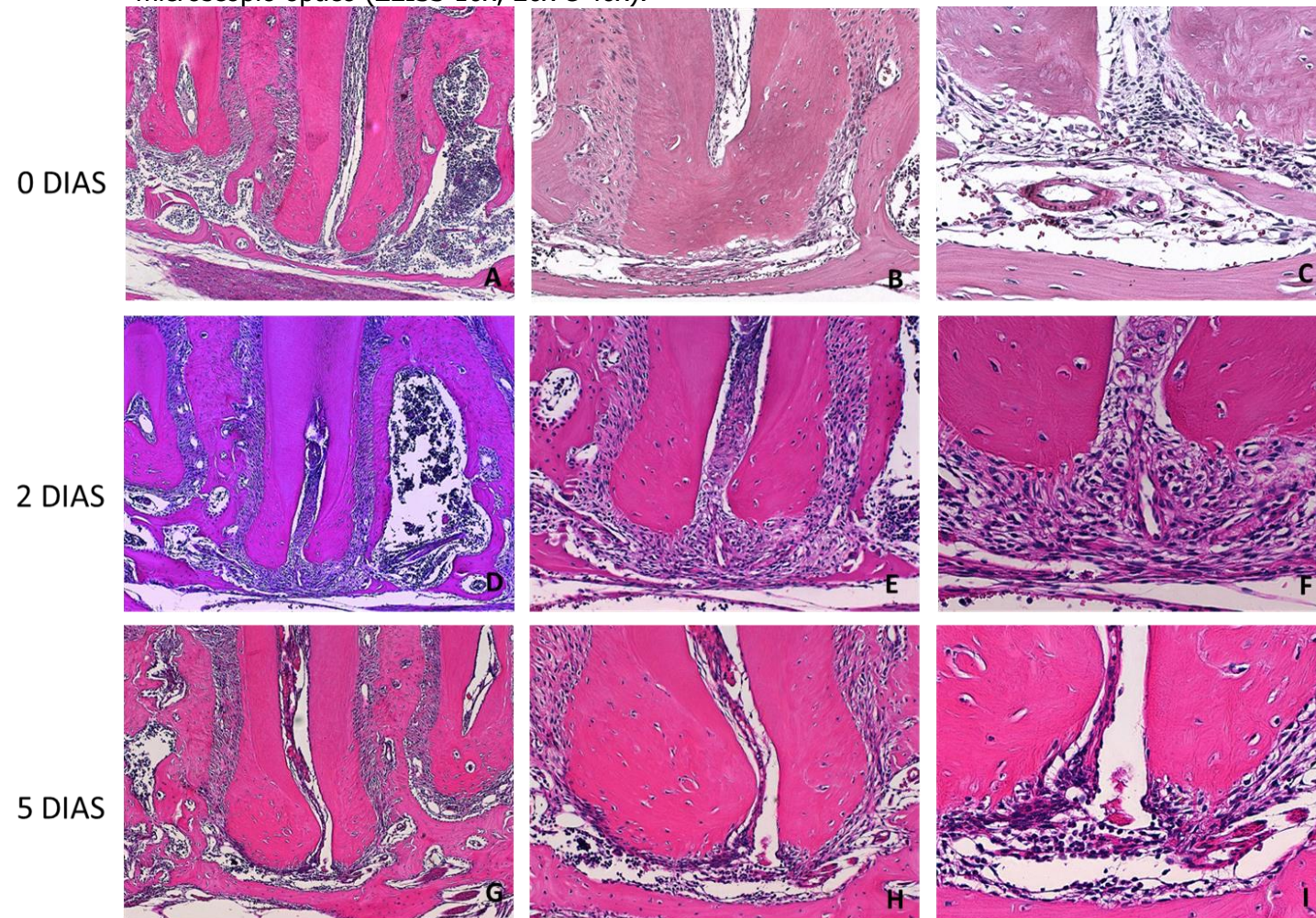
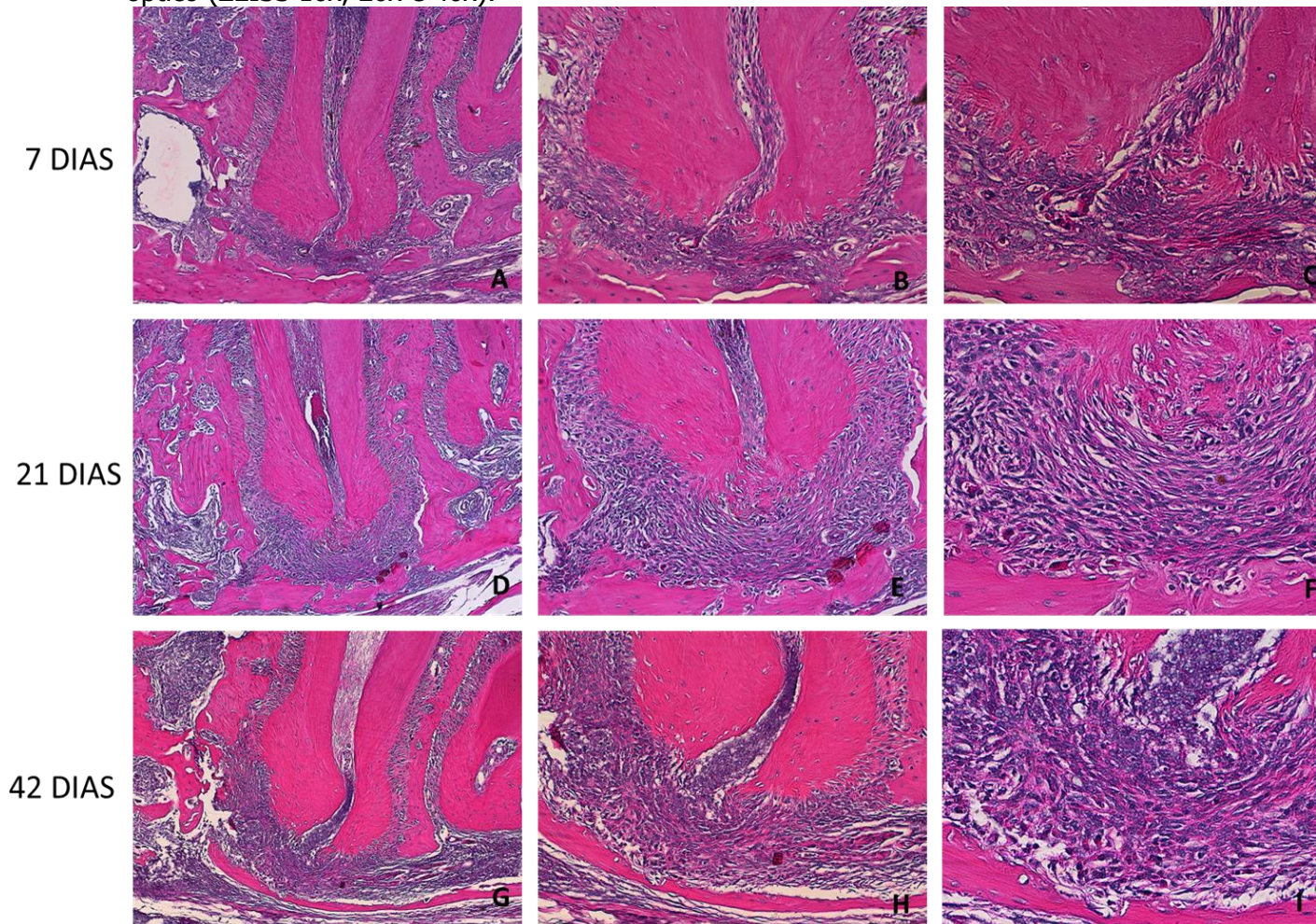


Figura 3. Fotomicrografias representativas dos eventos microscópicos observados após a indução das lesões periapicais e animais WT, nos períodos experimentais de 7 dias (A, B e C), 21 dias (D, E e F) e 42 dias (G, H, I). Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e observados em microscópio óptico (ZEISS 10x, 20x e 40x).



4.2 Histomorfometria para Mensuração das Lesões Periapicais

As lâminas submetidas à coloração por hematoxilina e eosina foram observadas em microscópio de fluorescência para mensuração da área das lesões periapicais formadas nos diferentes períodos experimentais (Figura 4).

Observa-se um aumento gradativo, em mm^2 , no tamanho das lesões no decorrer dos períodos de 2, 5, 7, 21 e 42 dias após a indução experimental. Os valores das médias da área das lesões foram $0,0291\text{mm}^2$ - grupo controle (dia 0), $0,0322\text{mm}^2$, $0,0586\text{mm}^2$, $0,0850\text{mm}^2$, $0,1411\text{mm}^2$ e $0,2291\text{mm}^2$ respectivamente. A análise estatística foi realizada por meio do teste paramétrico one-way analysis of variance e pós teste de Tukey, que demonstrou diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (0 dias) e entre os períodos experimentais de 7, 21 e 42 dias ($p < 0,05$), e também entre 21 e 42 dias (Figura 5).

Figura 4. Fotomicrografias representativas da mensuração das lesões periapicais em animais wild-type (WT) nos períodos experimentais avaliados. A: 0 dias, B: 2 dias; C: 5 dias; D: 7 dias; E: 21 dias; F: 42 dias. Os cortes foram corados com hematoxilina e eosina e avaliados em microscópio óptico no modo fluorescente para a mensuração das lesões periapicais (10x).

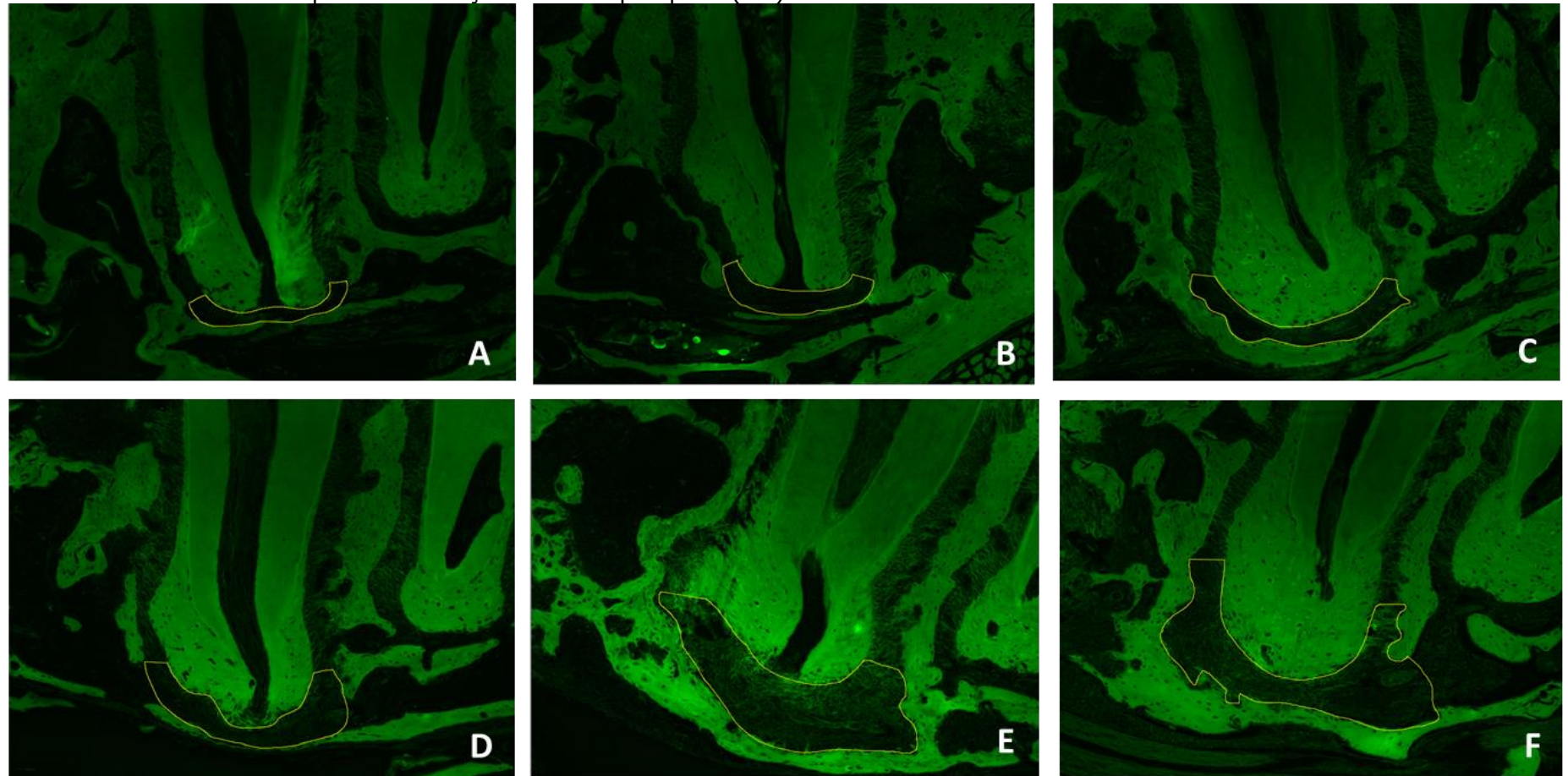
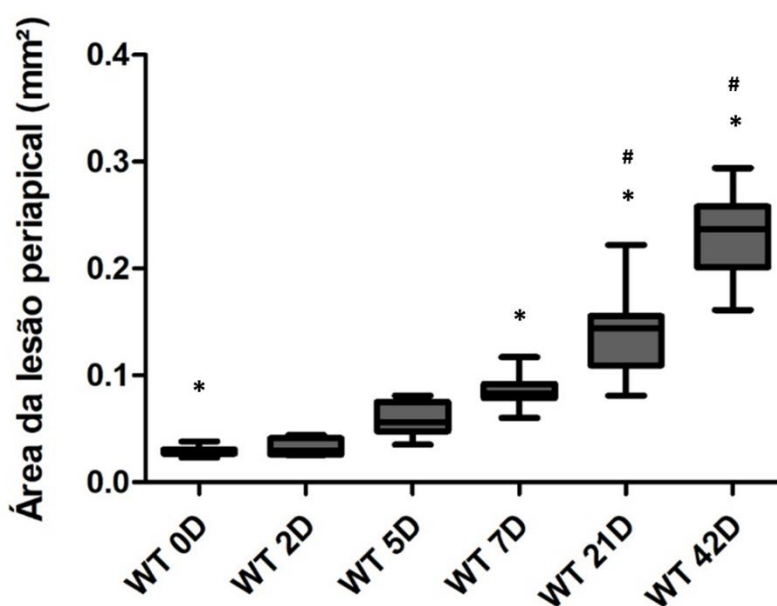


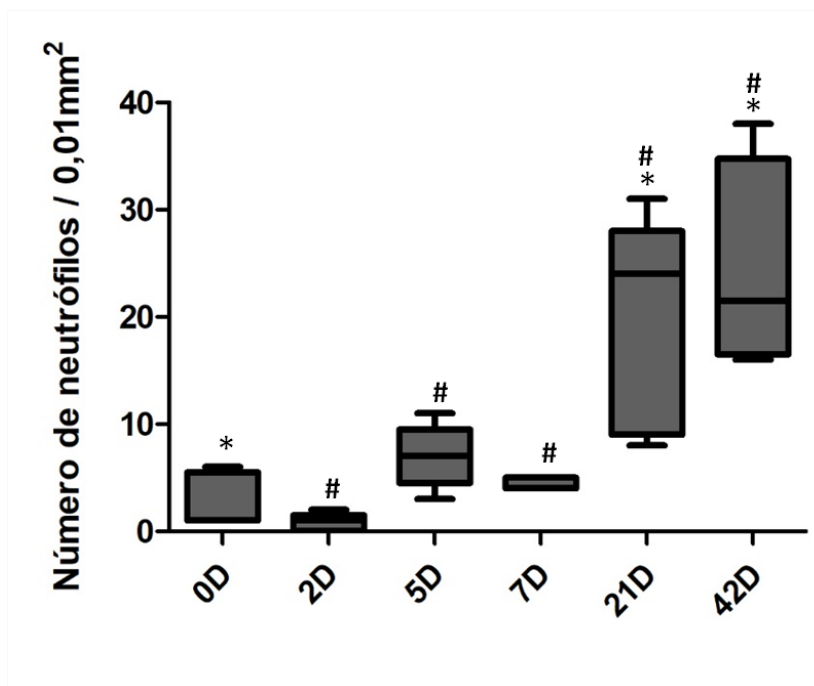
Figura 5. Representação gráfica da comparação das medianas da extensão das lesões periapicais por meio de microscopia de fluorescência, entre o grupo controle e os grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. A lesão periapical aumenta de tamanho progressivamente no decorrer do tempo, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle (0 dias) e os períodos experimentais de 7, 21 e 42 dias (*) ($p < 0,05$), e entre 21 e 42 dias (#) ($p < 0,05$).



4.3 Número de Neutrófilos Polimorfonucleares na Região Periapical

Nas lâminas coradas em HE nos diferentes períodos experimentais avaliados, observou-se aumento progressivo de neutrófilos com o decorrer do tempo, com maior número nos períodos de 21 e 42 dias, com diferença estatisticamente significativa quando comparados com o grupo controle ($p < 0,05$). Houve, também, diferença estatística ao comparar os dias iniciais (dias 2, 5 e 7) do desenvolvimento da lesão periapical com os períodos finais de 21 e 42 dias ($p < 0,05$) (Figura 6).

Figura 6. Representação gráfica do número de neutrófilos na região periapical nos períodos experimentais de 0, 2, 5, 7, 21 e 42 dias. A presença de neutrófilos aumenta progressivamente no decorrer do tempo, elevando-se ainda mais em 21 e 42 dias, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e 21 e 42 dias (*) e dias iniciais: 2, 5 e 7 dias com 21 e 42 dias (#).



4.4 Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas por meio da técnica da imunoperoxidase para marcação de mieloperoxidase, elastase, catepsina-G, histona h3 e PAD4. Seguem, abaixo, os resultados de cada um dos marcadores avaliados.

Enzima PAD4

A imunomarcação para PAD4 foi detectada em todos os períodos experimentais. No grupo controle, não houve a marcação (Figura 7A). Nos períodos de 2, 5 e 7 dias, houve marcação leve, com células positivas principalmente na região de lesão periapical, ocasionalmente no interior do canal radicular e na região do forame apical (Figura 7B, C e D).

Já no período de 21 dias, a marcação foi moderada, com maior presença na região do forame apical e no interior da lesão periapical, além de algumas células no

interior do canal radicular (Figura 7E). Por fim, no período de 42 dias, observou-se marcação intensa, principalmente na região de forame apical, no interior da lesão periapical e no interior do canal radicular (Figura 7F e 8). Na análise estatística dos escores, observou-se diferença significativa entre os períodos de 21 e 42 dias ($p < 0,05$) em relação ao seu controle (Figura 9).

Figura 7. Fotomicrografias representativas (aumento de 40x) da expressão do marcador PAD4 na lesão periapical nos dias 0 (A), 2 (B), 5 (C), 7 (D), 21 (E) e 42 (F) nos animais WT.

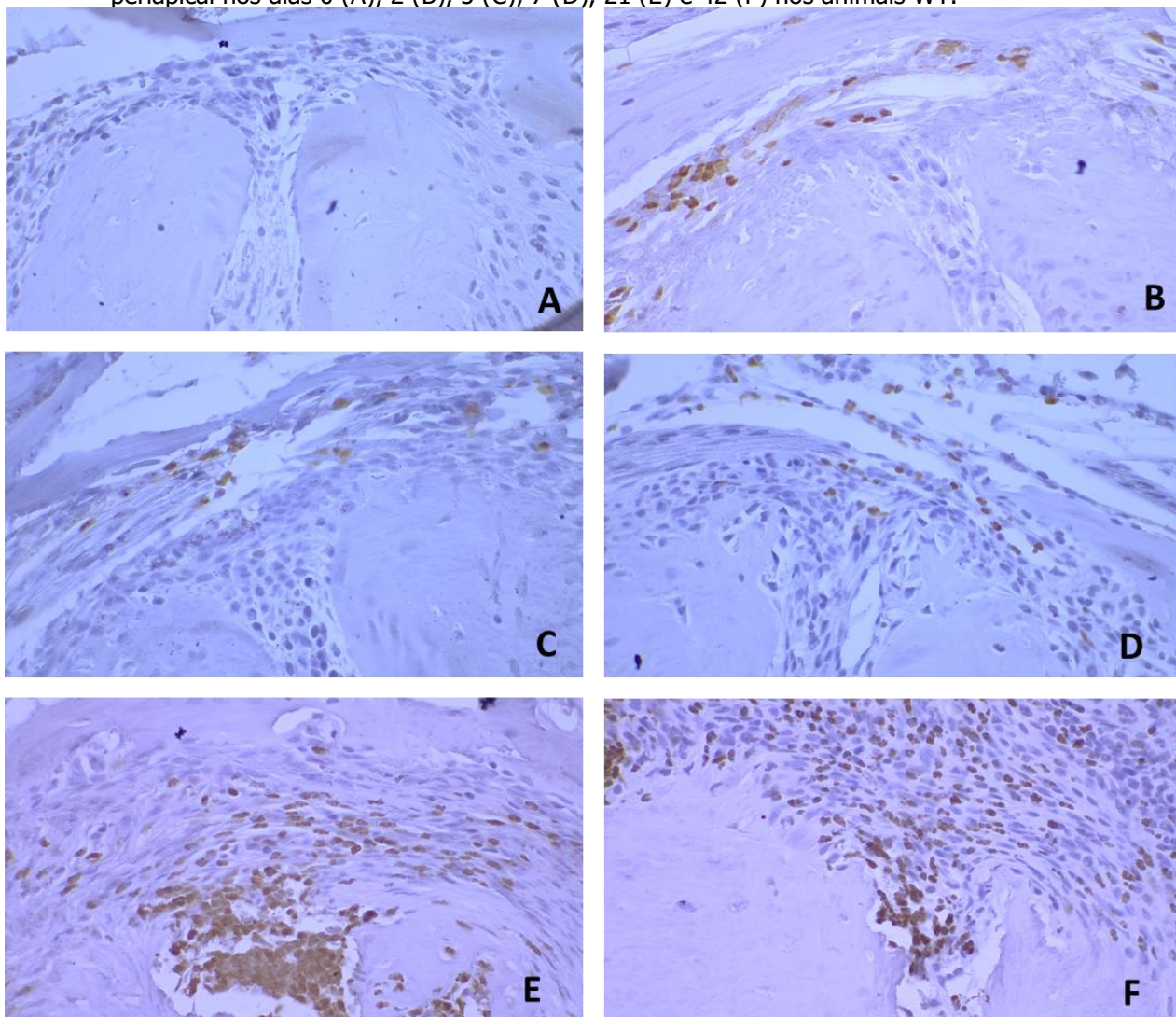


Figura 8. Fotomicrografia representativa (aumento de 10X) da expressão do marcador PAD4 na lesão periapical no grupo 42 dias nos animais WT, evidenciando a presença de marcação intensa na região de lesão periapical.

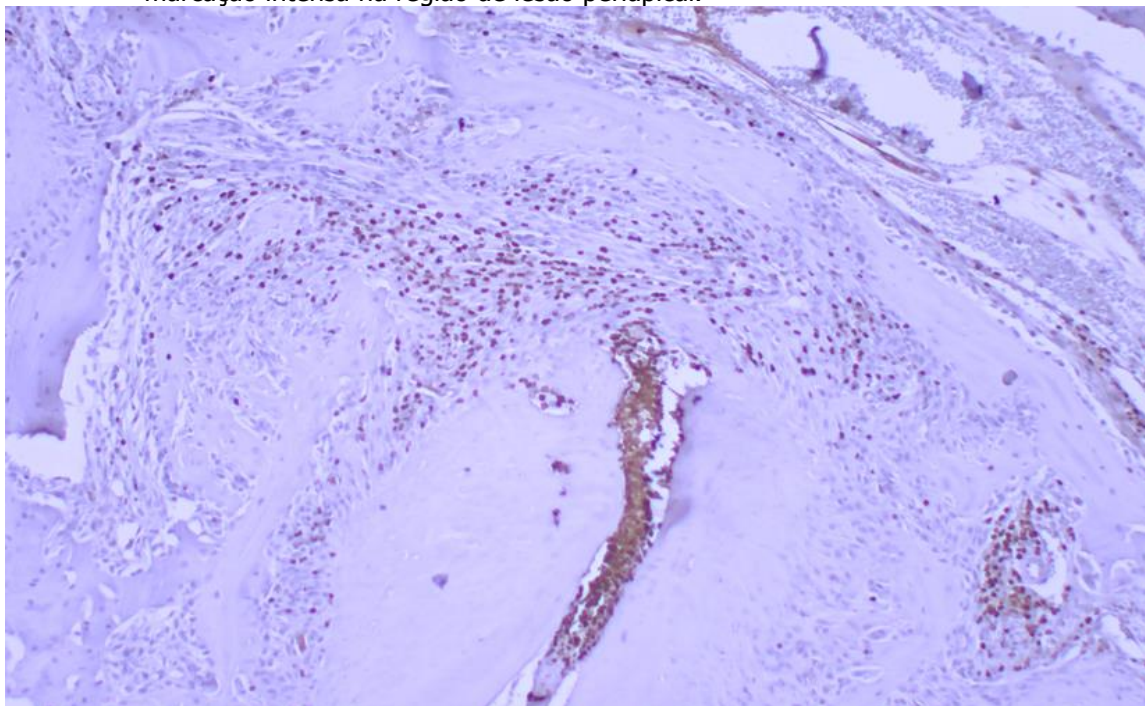
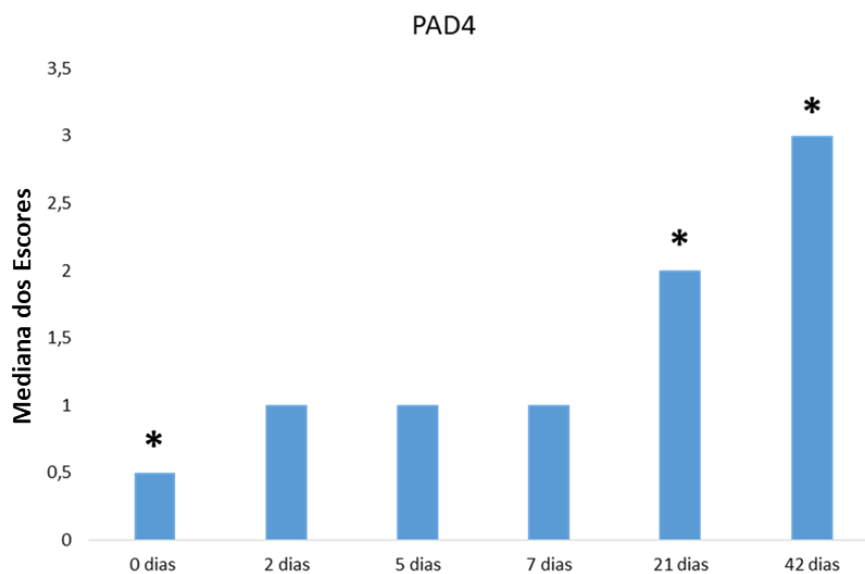


Figura 9. Representação gráfica da avaliação estatística dos escores de expressão de PAD4, entre o grupo controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias nos animais WT. A expressão de PAD4 aumenta progressivamente no decorrer do tempo. * $p < 0,05$ entre 21 e 42 dias e grupo controle.



Avaliação de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos

MPO e HISTONA H3

Em nosso estudo observou-se que a co-localização imuno-histoquímica dos marcadores mieloperoxidase e histona h3 citrulinada, localizados extracelularmente, aumentou com o passar do tempo, com maior quantidade de pontos sobrepostos em 21 e 42 dias. As Figuras 10 e 11 ilustram os achados microscópicos obtidos após a realização da imuno-histoquímica para os marcadores MPO e CitH3.

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatística entre os períodos ($P=0,0049$) e o pós-teste de Dunn apontou diferença estatística apenas entre os períodos de 0 e 42 dias ($p<0,05$). Após comparação dos períodos separadamente, pelo teste de Mann Whitney, observou-se diferença estatisticamente significativa entre 0 e 21 dias ($p=0,0265$), 0 e 42 dias ($p=0,0265$), 2 e 42 dias ($p=0,0498$), 5 e 21 dias ($p=0,0112$), 5 e 42 dias ($p=0,0112$), 7 e 21 dias ($0,0498$), e entre 7 e 42 dias ($p=0,0498$) (Figura 12).

Figura 10. Fotomicrografias representativas (aumento de 40x) da expressão dos marcadores Mieloperoxidase e Histona H3 citrulinada em cortes subsequentes na lesão periapical nos dias 0 (A), 2 (B), 5 (C), 7 (D), 21 (E) e 42 (F). As marcações em vermelho indicam MPO extracelular e as marcações em amarelo indicam CITH3 extracelular. A sobreposição de ambos os marcadores indicam regiões de co-localização, sugerindo a presença de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs).

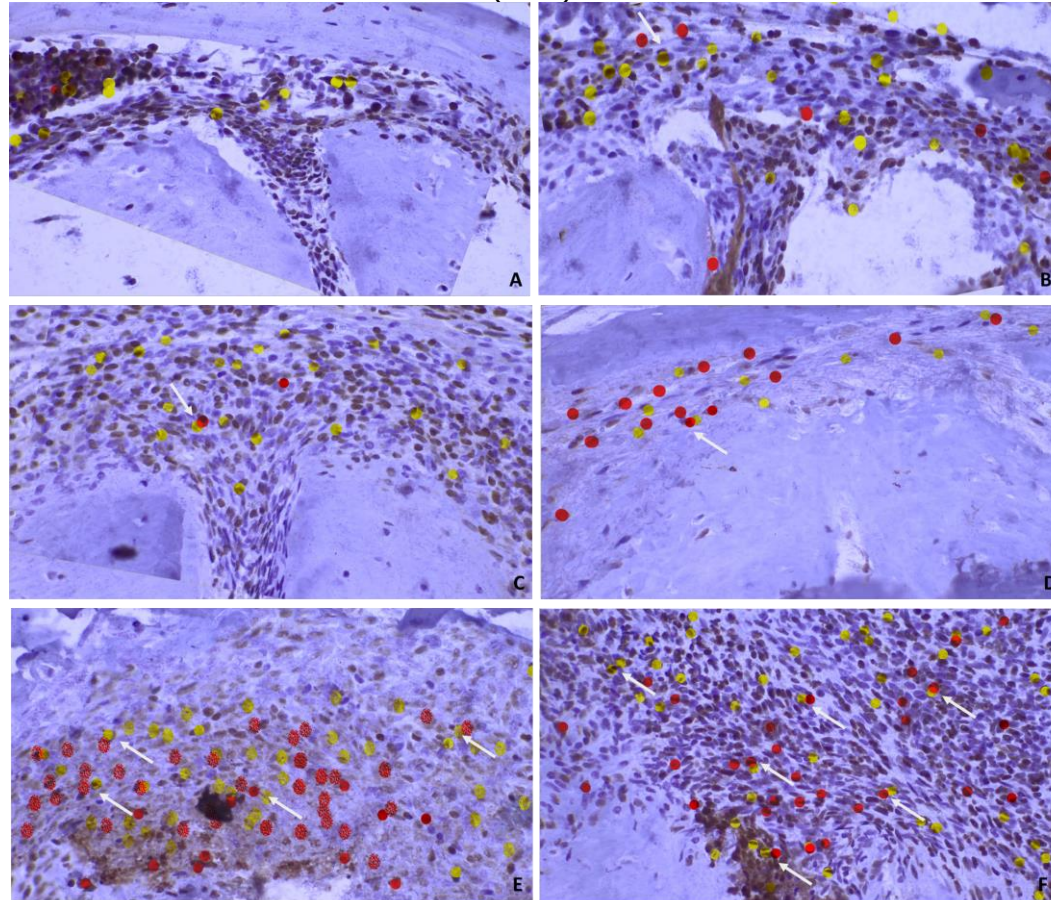


Fig.11: Fotomicrografias representativas (aumento de 100X) da expressão do marcador MPO (A) e Cih3 (B) na lesão periapical no grupo 42 dias, evidenciando a presença de marcação extracelular (setas vermelhas).

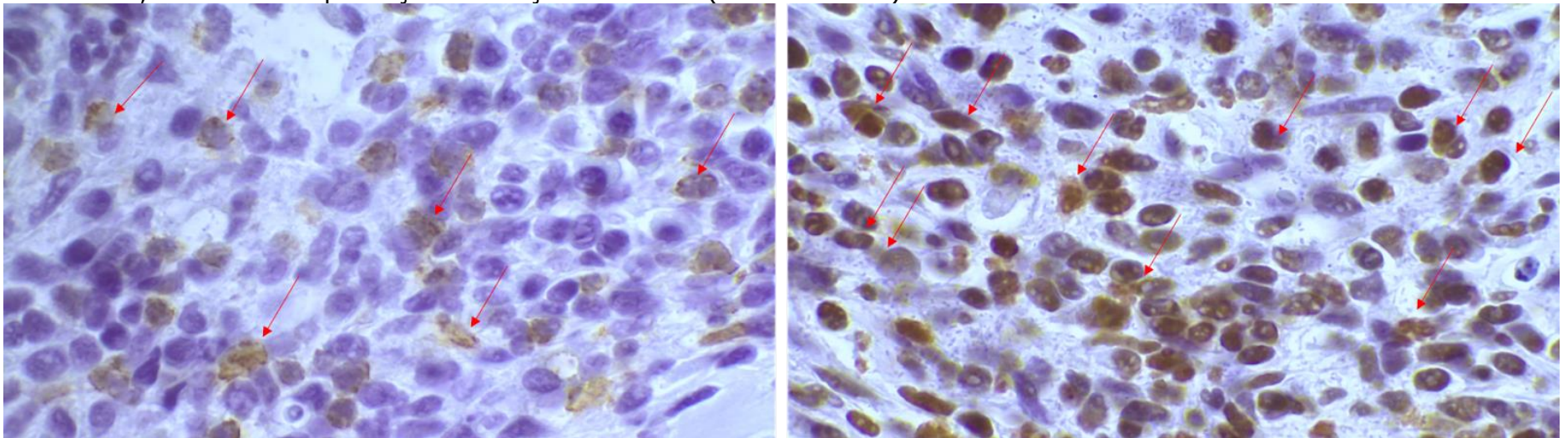
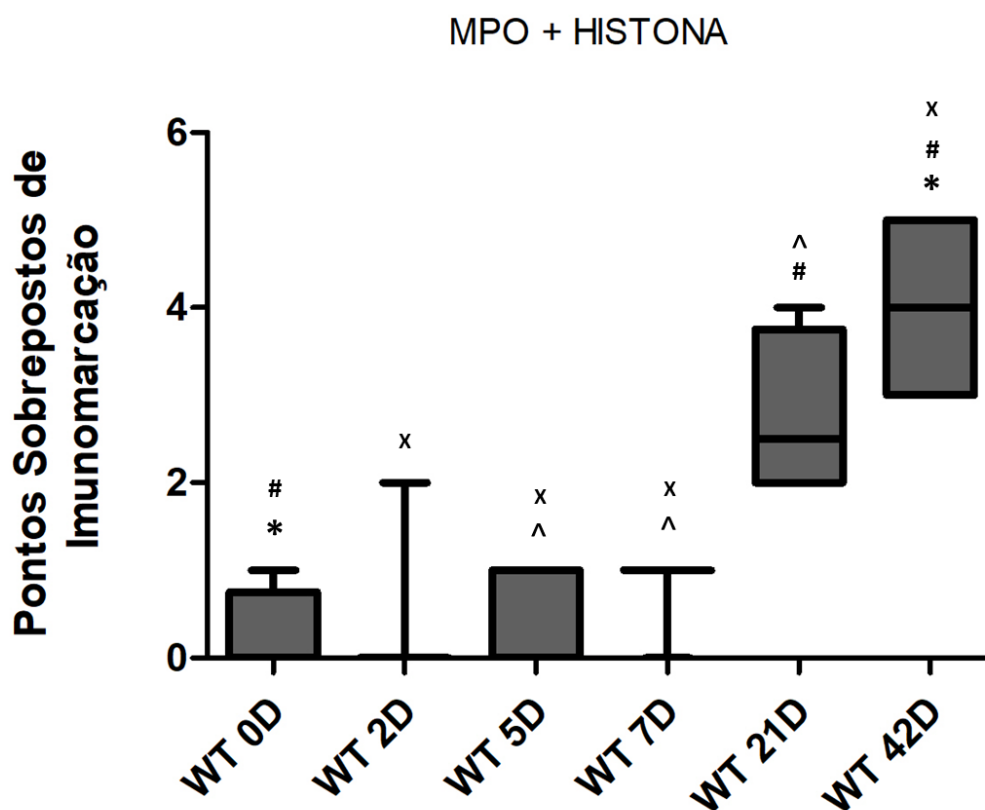


Fig.12: Representação gráfica da avaliação de co-localização imuno-histoquímica de MPO e CITH3 entre o grupo controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Houve diferença estatisticamente significativa entre os períodos de 0 e 42 dias (*) ($p < 0,05$) no pós teste de Dunn, e comparando os períodos separadamente, pelo teste de Mann Whitney, observou-se diferença estatisticamente significativa entre 0 e 21 dias (#), 2, 5 e 7 dias em comparação a 42 dias (x) e entre 5 e 7 dias em comparação a 21 dias (^) ($p < 0,05$).



NE e HISTONA H3

A co-localização imuno-histoquímica dos marcadores elastase e histona h3 citrulinada aumentou com o decorrer dos períodos experimentais, com maior quantidade de pontos de sobreposição em 21 e 42 dias. Não houve sobreposição dos marcadores em 2 e 7 dias. As Figuras 13 e 14 ilustram os achados microscópicos obtidos após a realização da imuno-histoquímica para os marcadores NE e CitH3.

O teste de Kruskal-Wallis revelou diferença estatística entre os períodos ($P=0,0247$). No entanto, essa diferença não foi evidenciada pelo pós-teste de Dunn. Assim, após comparação dois a dois dos períodos experimentais, pelo teste de Mann

Whitney, observou-se diferença entre 0, 2 e 7 dias em relação aos períodos de 21 e de 42 dias ($p < 0,05$), além de 0 e 21 dias ($p = 0,0319$) e 0 e 42 dias ($p = 0,0207$). Os demais períodos não foram estatisticamente diferentes entre si (Figura 15).

Fig.13: Fotomicrografias representativas (aumento de 40x) da expressão dos marcadores Elastase e Histona H3 citrulinada em cortes subsequentes na lesão periapical nos dias 0 (A), 2 (B), 5 (C), 7 (D), 21 (E) e 42 (F). As marcações em vermelho indicam NE extracelular e as marcações amarelas indicam CITH3 extracelular. A sobreposição de ambos os marcadores indicam regiões de co-localização, sugerindo a presença de Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos.

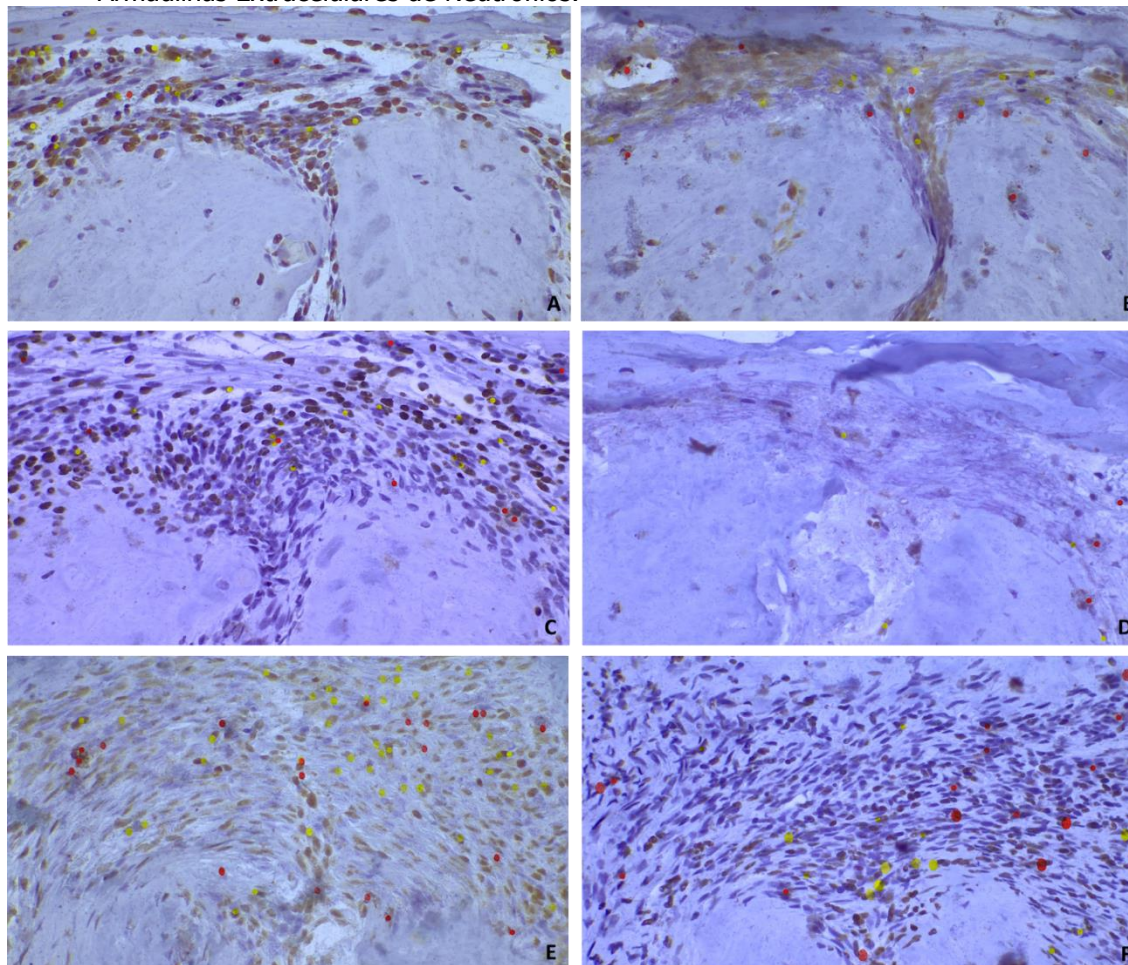


Fig.14: Fotomicrografias representativa (aumento de 100X) da expressão do marcador CitH3 (A) e NE (B) na lesão periapical no grupo 42 dias, evidenciando a presença de marcação extracelular em A (seta vermelha).

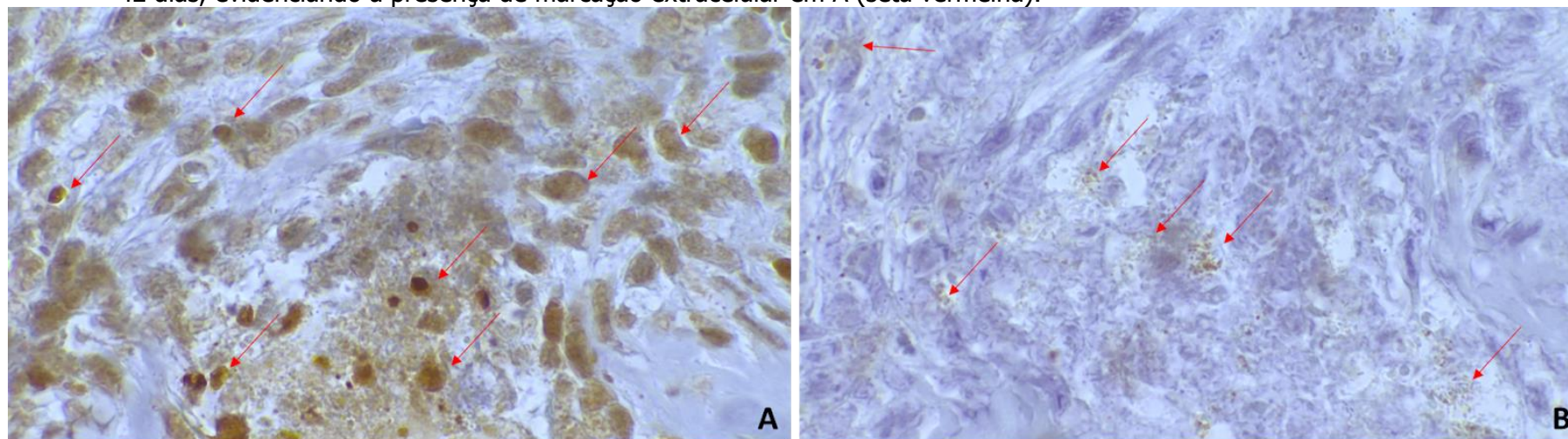
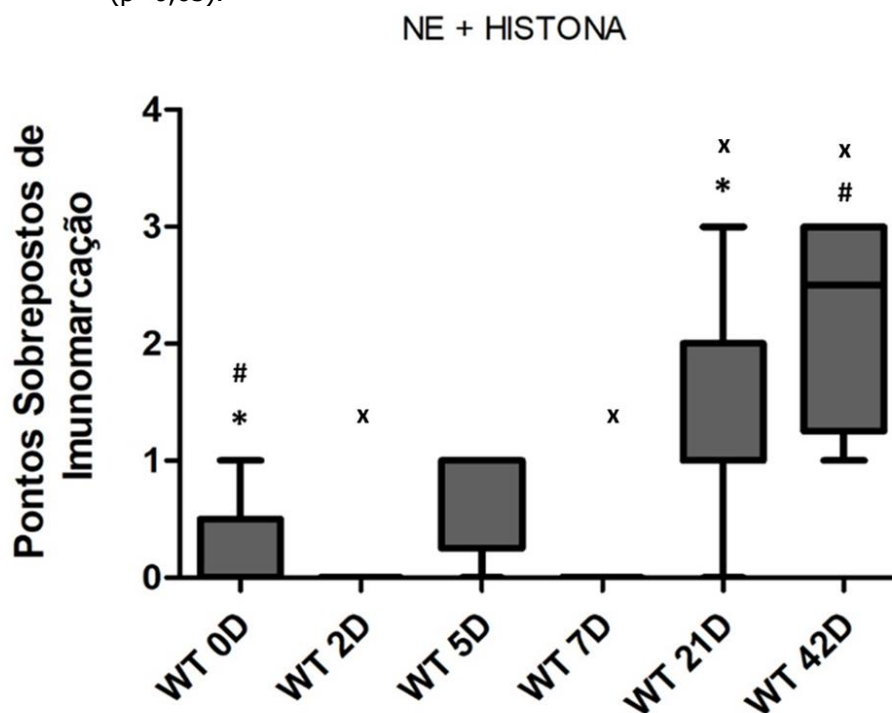


Fig.15: Representação gráfica da avaliação de co-localização imuno-histoquímica de NE e CITH3 entre o grupo controle e grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Houve diferença estatisticamente significativa pelo teste de Mann Whitney entre os períodos de 0 e 21 dias (*) ($p < 0,05$) e 0 e 42 dias (#) ($p < 0,05$). Houve diferença estatisticamente significativa também entre 2 (x) e 7 (x) dias em relação a 21 (x) e 42 (x) dias ($p < 0,05$).



Catepsina G

A imunomarcagem para catepsina G foi ausente no grupo controle e aos 5 dias. Já nos períodos de 2 e 7 dias, observou-se marcação leve, principalmente na região de forame e lesão periapical. Aos 21 e 42 dias houve marcação moderada.

A Figura 16 ilustra os achados microscópicos obtidos após a realização da imuno-histoquímica para o marcador CTSG.

A análise estatística dos escores evidenciou que, em relação aos períodos avaliados, houve aumento significativo de imunomarcagem para CTSG nos períodos de 21 e 42 dias, os quais foram estatisticamente diferentes em relação ao grupo controle ($p = 0,0324$ e $p = 0,0359$, respectivamente), ao grupo de 5 dias, que não apresentou marcação ($p = 0,0324$ e $p = 0,0359$, respectivamente) e, em relação ao grupo de 7 dias ($p = 0,0324$ e $p = 0,035$, respectivamente) (Figura 17).

Figura 16. Fotomicrografias representativas (aumento de 40x) da expressão do marcador Catepsina G na lesão periapical, nos dias 0 (A), 2 (B), 5 (C), 7 (D), 21 (E) e 42 (F).

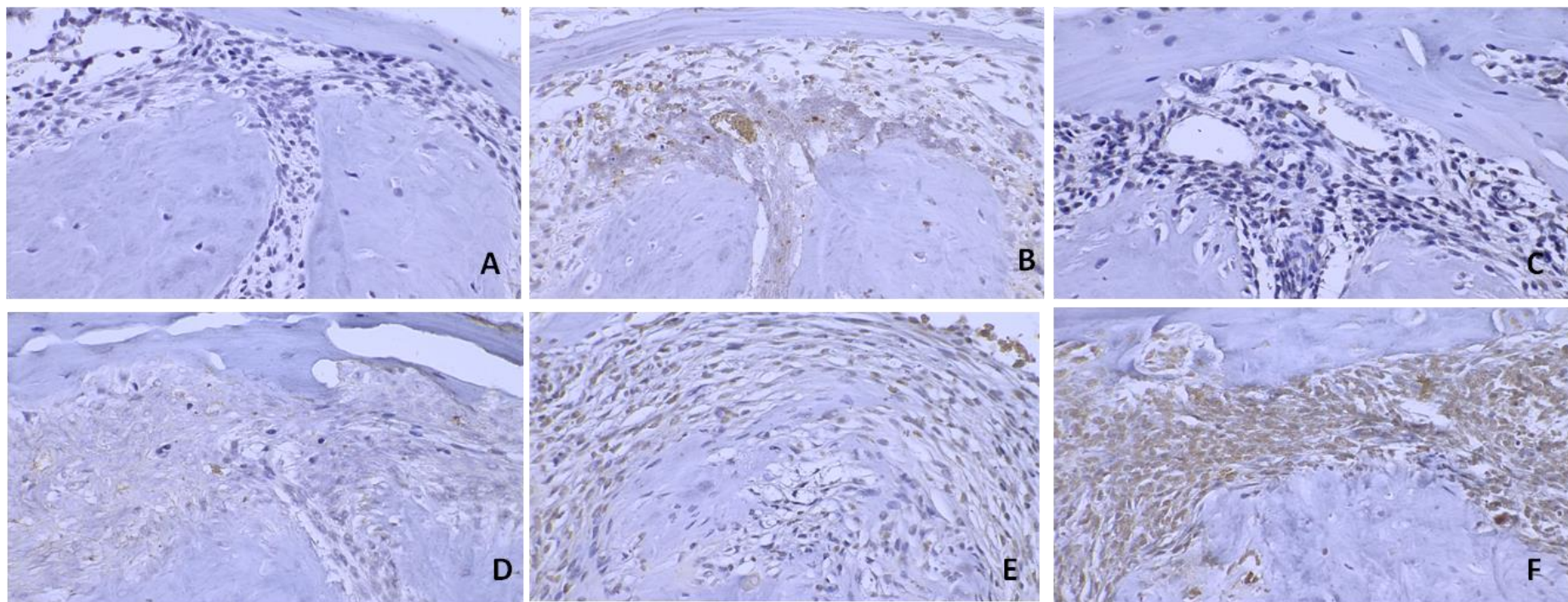
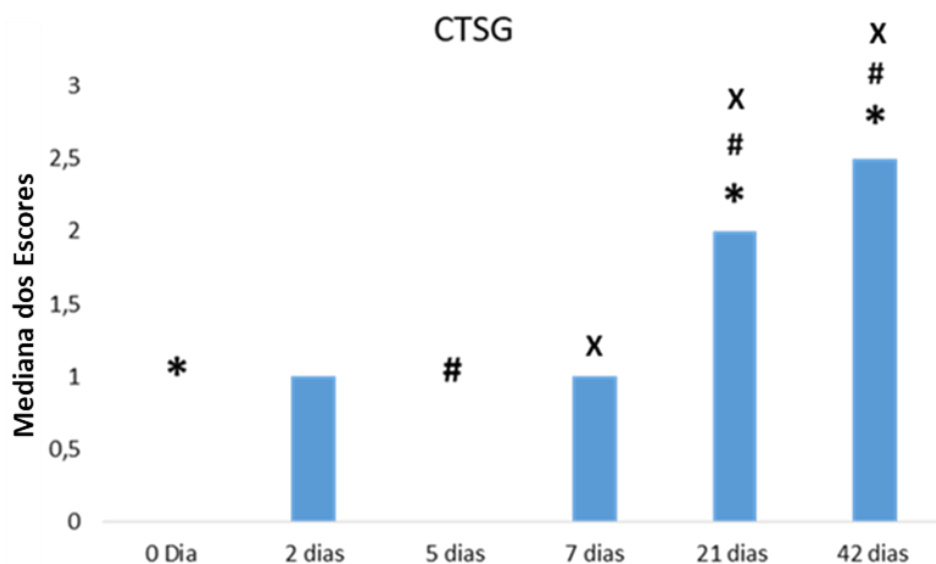


Figura 17. Representação gráfica da avaliação estatística dos escores de expressão de CTSG, entre os grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias e grupo controle. A expressão de CTSG aumenta progressivamente em 21 e 42 dias, os quais foram estatisticamente diferentes dos períodos de 0 dias (* $p < 0,05$), 5 dias (# $p < 0,05$), e 7 dias (x $p < 0,05$).



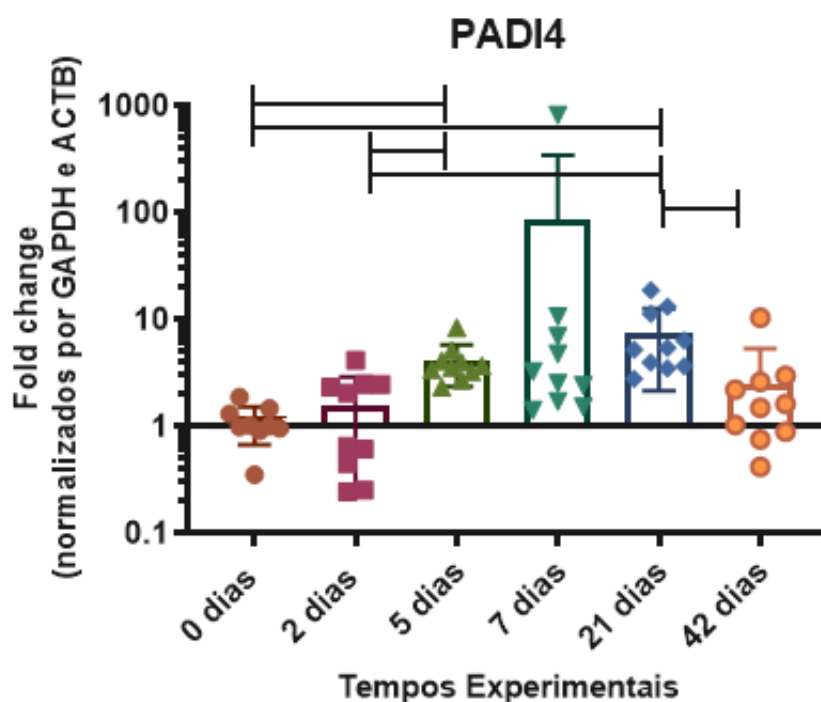
4.5 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qRT-PCR)

Foram utilizadas as hemi-mandíbulas esquerdas de 10 animais nos períodos de 2, 5, 7, 21 e 42 dias e de 5 animais no dia 0.

Expressão Gênica de *PADI4*

A expressão do gene *PADI4* nos animais em relação ao período controle (dia 0) aumentou em 7 dias, diminuindo aos 21 e 42 dias, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e 5 e 21 dias ($p < 0,05$), além de diferença estatisticamente significativa entre 2 dias e 5, 21 e 42 dias ($p < 0,05$). (Figura 18). Em geral houve maior expressão de *PADI4* em 7 e 42 dias.

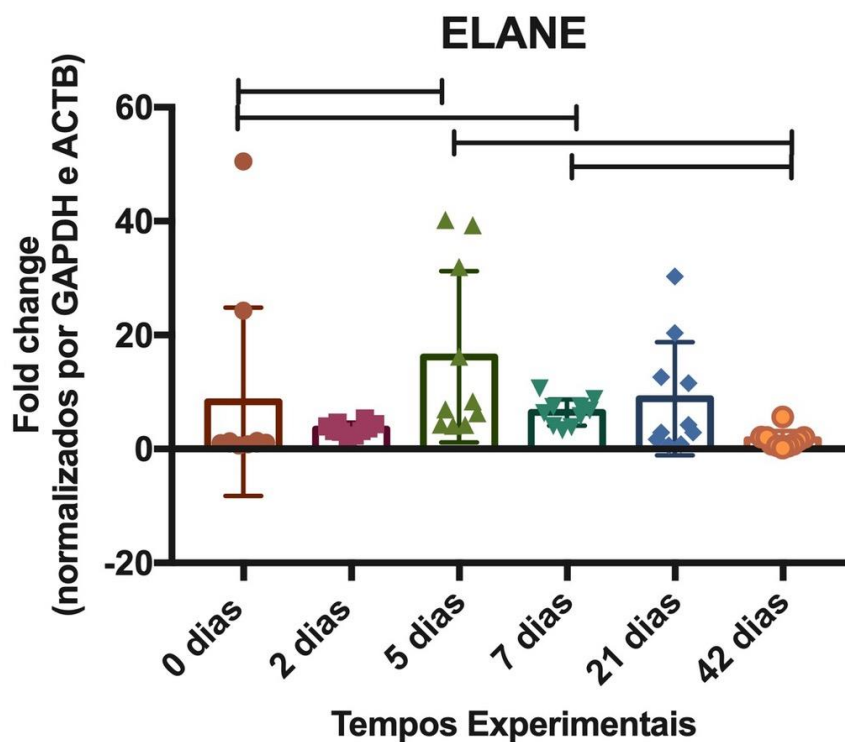
Figura 18. Representação gráfica da expressão gênica de PADI4 (% de GAPDH e ACTB) avaliada no grupo controle e nos grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Houve diferença estatisticamente significativa entre 0 dias e 5 e 21 dias ($p < 0,05$), entre 2 dias e 5 e 21 dias ($p < 0,05$), e entre 21 e 42 dias ($p < 0,05$).



Expressão Gênica de *ELANE*

Observou-se maior expressão de *Elane* tanto aos 5 dias quanto aos 21 dias de lesão (Figura 19), e por outro lado, em 42 dias houve a menor expressão, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle em relação a 5 e 7 dias ($p < 0,05$) e entre os os dias 5 e 7 em relação ao período de 42 dias ($p < 0,05$).

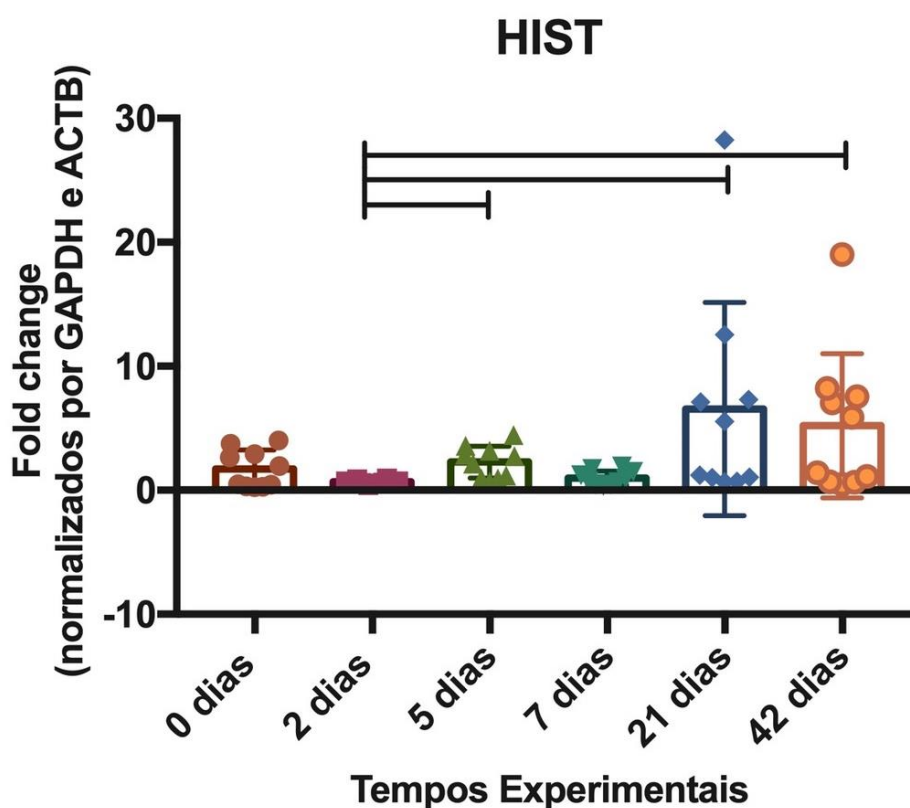
Figura 19. Representação gráfica da expressão de ELANE (% de GAPDH e ACTB) avaliada no grupo controle e nos grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Houve diferença estatisticamente significativa entre 0 dias em relação a 5 e 7 dias e entre os dias 5 e 7 em relação a 42 dias ($p < 0,05$).



Expressão Gênica de *H3C1*

Observou-se maior expressão de *H3C1* aos 21 e 42 dias de lesão (Figura 20), com diferença estatisticamente significativa entre o período de 2 dias em relação a 5, 21 e 42 dias ($p < 0,05$). Por outro lado, não houve diferença significativa comparando os grupos experimentais com o grupo controle (dia 0) ($p > 0,05$).

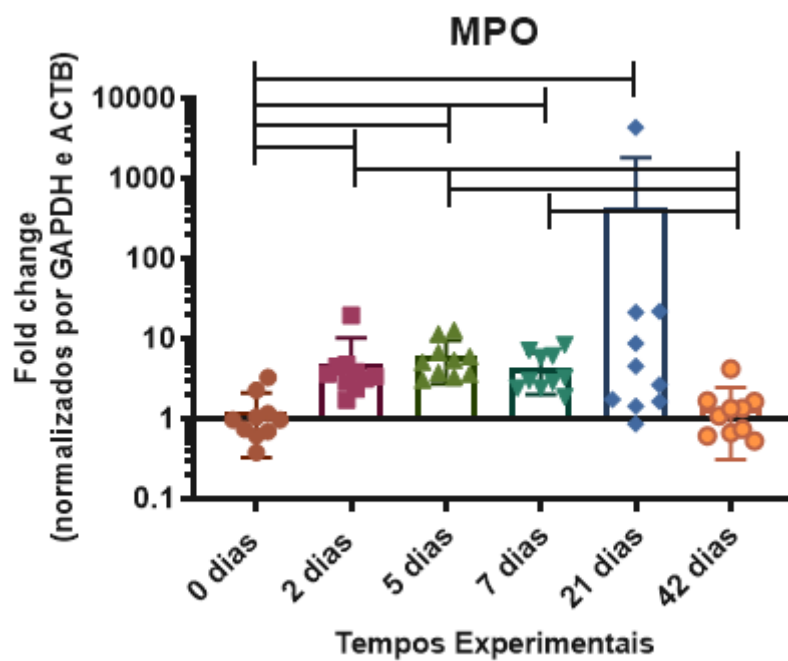
Figura 20. Representação gráfica da expressão de H3C1 (% de GAPDH e ACTB) avaliada no grupo controle e nos grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Houve diferença estatística entre o período de 2 dias em relação a 5, 21 e 42 dias ($p < 0,05$).



Expressão Gênica de *MPO*

A expressão do gene *MPO* foi maior em 21 dias, com diferença estatisticamente significativa entre o grupo controle e os períodos de 2, 5, 7 e 21 dias ($p < 0,05$). Adicionalmente, os períodos de 2, 5 e 7 dias foram estatisticamente diferentes do grupo de 42 dias ($p < 0,05$) (Figura 21).

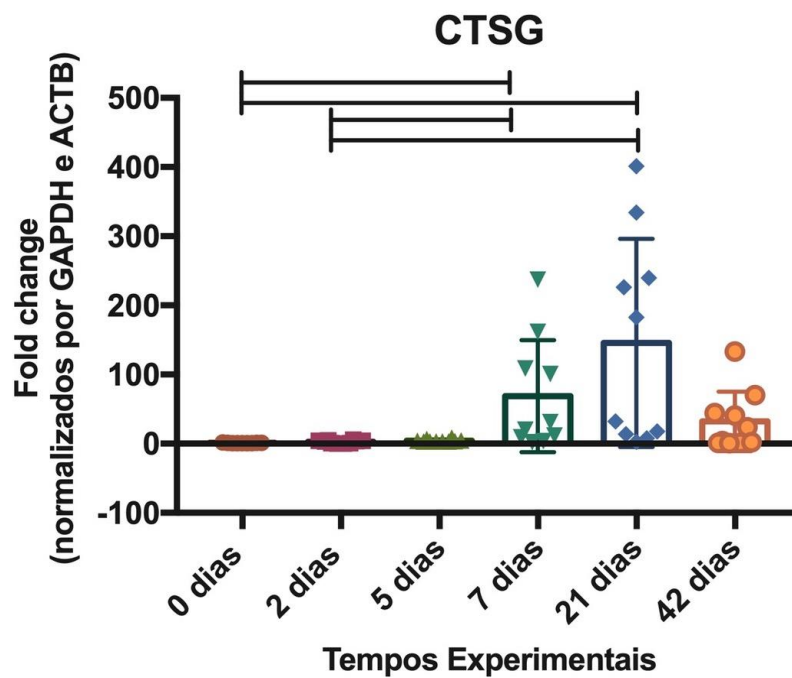
Figura 21. Representação gráfica da expressão de MPO (% de GAPDH e ACTB) avaliada no grupo controle e nos grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os períodos de 2, 5, 7 e 21 dias, e entre 2, 5 e 7 dias em relação a 42 dias.



Expressão Gênica de *CTSG*

Observou-se maior expressão de *CTSG* aos 21 dias de lesão, seguido de 7 dias e 42 dias (Figura 22), sendo o grupo controle (0 dias) e o grupo de 2 dias estatisticamente diferentes dos períodos de 7 e 21 dias ($p < 0,05$).

Figura 22. Representação gráfica da expressão de *CTSG* (% de GAPDH e ACTB) avaliada no grupo controle e nos grupos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias. Houve diferença estatística de 0 e 2 dias em relação a 7 e 21 dias ($p < 0,05$).



5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Desde a primeira descrição das Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) por Brinkmann em 2004, copiosos estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar a participação das NETs na patogênese e desenvolvimento de diversos quadros patológicos, como doenças cardiovasculares (McCarthy et al., 2021), artrite reumatóide (Apel et al., 2018), lúpus eritematoso (Matta et al., 2022), doença granulomatosa crônica (Yu et al., 2021), sepse infantil (Colón et al., 2019), Covid-19 (Pastorek et al., 2022), periodontite (White et al., 2016), entre outras. Os estudos até hoje encontrados na literatura propõem que as NETs são como uma “faca de dois gumes”, sendo em partes benéfica e necessária para a defesa do organismo (Burgener et al., 2020), e em excesso maléfica, causando a quebra da homeostase e propensão ao desenvolvimento de doenças autoimunes (Cooper et al., 2013; Vitkov et al., 2020; Liu et al., 2021; Song et al., 2023).

No presente estudo foi avaliado a presença ou ausência de marcadores relacionados com as NETs na formação e progressão da lesão periapical induzida em camundongos selvagens, além da correlação entre as fases aguda e crônica da doença com a presença de neutrófilos.

Inicialmente, a hipótese era de que os principais marcadores de NETs (MPO, Elastase e Histona H3 Citrulinada) estariam presentes em maior intensidade nas fases iniciais ou agudas do processo inflamatório, assim como o número de neutrófilos por mm².

Para indução da lesão periapical, foi adotada a metodologia em que a câmara pulpar foi acessada e os canais radiculares permaneceram expostos à cavidade bucal, de modo que a invasão bacteriana no tecido pulpar desencadeasse a formação da lesão (Fouad et al., 1997; Bezerra da Silva et al., 2014; de Oliveira et al., 2015; De Rossi et al., 2016; Barreiros et al., 2018; Pucinelli et al., 2022). Buscando atingir o objetivo proposto, foram estabelecidos os períodos experimentais de 2, 5, 7, 21 e 42 dias, além do grupo controle (dia 0), para que fosse avaliada a dinâmica da gênese e progressão da lesão periapical, bem como a participação dos neutrófilos e das NETs durante todo o processo.

Assim, a análise dos cortes corados com HE revelou que os animais desenvolveram lesão periapical e reabsorção óssea com o passar do tempo, sendo que aos 21 e 42 dias, as lesões eram severamente mais extensas ($p < 0,05$) quando comparadas ao grupo controle. A análise histomorfométrica da lesão periapical em microscopia de fluorescência (De Rossi et al., 2007) nos permitiu a delimitação de estruturas anatômicas do dente, como ligamento periodontal e osso alveolar, favorecendo a demarcação da área de reabsorção óssea, o que mostrou resultado semelhante ao HE - aumento da lesão de maneira tempo-dependente.

Com relação à análise quantitativa do número de neutrófilos na região central da lesão, adjacente ao forame apical, houve confirmação da descrição qualitativa e revelou um número significativamente maior destas células nos períodos de 21 e 42 dias ($p < 0,05$) em relação ao grupo controle.

Os neutrófilos constituem o elemento celular mais abundante durante a fase inicial da inflamação, combatendo os patógenos de diversas maneiras, como por fagocitose, liberação de ROS e NETs, e degranulação intra e extracelular. A literatura mostra que neutrófilos têm um tempo de vida curto e atuam como parte do infiltrado inflamatório por aproximadamente 4 a 5 dias (Cooper et al., 2017). Esse dado leva à hipótese de que, durante os primeiros dias experimentais, o número de neutrófilos presentes no interior da lesão periapical seria maior e, conseqüentemente, a expressão dos marcadores avaliados relacionados à formação de NETs estariam também aumentados nos períodos iniciais. No entanto, em nosso estudo, a contagem de neutrófilos revelou maior número dessas células aos 21 e 42 dias, com diferença estatística ($p < 0,05$) em relação aos dias iniciais (0, 2 e 5 dias) e também entre 21 e 42 dias. Apesar da curta vida dos neutrófilos, durante a inflamação, eles são ativados e sua longevidade pode aumentar (Kolaczowska et al., 2013), o que pode justificar a presença de neutrófilos em maior quantidade nos períodos de 21 e 42 dias. Paralelamente, o local da contagem de neutrófilos realizada no presente estudo, ou seja na região central da lesão, adjacente ao forame e ao terço apical dos dentes, pode também justificar o menor número dessas células nos períodos iniciais, quando ainda havia necrose parcial do tecido pulpar e, conseqüentemente, recrutamento menos intenso de neutrófilos na região da lesão. Por outro lado, nos períodos finais de 21 e 42 dias, a necrose da polpa era total, com presença de tecido necrótico em

toda a extensão do canal radicular, ou seja, localmente mais próximo da região avaliada, explicando número aumentado de neutrófilos recrutados na região avaliada. Adicionalmente, de acordo com Kolaczowska et al. (2013), neutrófilos mais velhos podem permitir a realização de atividades mais complexas em um tecido, como moldar as respostas imunes adaptativas, porém sua persistência pode levar a danos nas células do hospedeiro.

As Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos são identificadas como estruturas contendo DNA extracelular (histona) co-localizado com proteínas derivadas de grânulos, como a mieloperoxidase e elastase (Brinkmann et al., 2018), e podem ser vistas e avaliadas por diversas técnicas, como por exemplo a combinação de microscopia confocal e citometria de fluxo (Zhao et al., 2015, Ginley et al., 2017), além da coloração por fluorescência combinada com um corante de ligação de DNA (Brinkmann et al., 2012). Apesar desses métodos serem capazes de identificar e quantificar com precisão as redes *in vitro*, não podem ser bem empregados para avaliar as NETs em tecidos parafinados, já que não é possível isolar as armadilhas em tecidos (Nakazawa et al., 2017). Sabe-se que a detecção de um único componente, como por exemplo, DNA livre de células, MPO, NE ou CitH3, é inespecífica para avaliar NETs e, portanto, deve ser combinada com métodos mais específicos (Boeltz et al., 2019). Sendo assim, foi empregada a análise subjetiva por meio da co-localização imuno-histoquímica de DNA extracelular (representado pelo marcador Histona H3) e grânulos de neutrófilos (MPO e NE) (de Buhr et al., 2016; Nakazawa et al., 2017; Boeltz et al., 2019).

Em relação aos resultados da presença/ausência e intensidade dos marcadores relacionados às Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (NETs) na lesão periapical, avaliados por meio de co-localização imuno-histoquímica, evidenciou-se a presença de pontos sobrepostos para marcação extracelular de MPO e CitH3 em todos os períodos experimentais, sugerindo a presença das NETs na lesão periapical, além de maior co-localização em 21 e 42 dias, com diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle (0 dias) ($p < 0,05$). Já para os marcadores NE e CitH3, os períodos iniciais de experimento demonstraram poucos pontos de sobreposição, e não houve sobreposição em 2 e 7 dias, com diferença estatisticamente significativa entre 2 e 7 dias em relação a 21 e 42 dias ($p < 0,05$). Por outro lado, após 21 e 42 dias, a co-

localização aumentou, havendo diferença estatística entre os períodos de 21 e 42 dias em relação ao grupo controle (0 dias), semelhantemente à co-marcação de MPO e CitH3, que também revelou diferença estatística entre 21 e 42 dias em comparação ao grupo controle (0 dias).

Até o presente momento, poucos estudos buscaram avaliar a participação das NETs na área da Endodontia. Holder e colaboradores, em 2019, avaliaram em um estudo *in vitro* a co-localização da elastase e a coloração do DNA, confirmando a presença de NETs em células da polpa dentária humana. Adicionalmente, esses autores sugeriram que as NETs exercem efeitos deletérios na polpa infectada, principalmente pela confirmação de que as histonas liberadas pela NETose levam a presença de DAMPS no interior do tecido, capazes de aumentar ainda mais a resposta inflamatória, ao passo que aumentam a citotoxicidade para as células pulpares. Relacionando tais achados com o nosso estudo, podemos dizer que a presença sugestiva de NETs aumenta nos períodos mais crônicos da doença (21 e 42 dias), concomitantemente com o aumento do número de neutrófilos, que também foi maior nesses períodos. Esses resultados corroboram com a expressão imuno-histoquímica da enzima PAD4, que foi significativamente maior nos períodos de 21 e 42 dias, os quais foram estatisticamente diferentes do grupo controle de 0 dias, sugerindo correlação entre a progressão da doença e sua cronificação com o aumento de PAD4.

A enzima PAD4 é expressa principalmente em granulócitos (Nakashima, 2002), mas também em monócitos, macrófagos e células progenitoras multipotentes (Liu et al., 2021). Sabe-se que o papel da PAD4 como requisito universal para a NETose é questionável, porém sua participação neste processo é dependente do estímulo inicial. Nossos resultados imuno-histoquímicos demonstraram a presença de PAD4 no grupo controle e nos grupos experimentais, com predomínio de escore suave durante os períodos iniciais do experimento e de escore moderado nos períodos finais. A marcação suave em algumas lâminas do grupo controle se deve, provavelmente, à expressão endógena de PAD. Já o aumento da expressão nos períodos de 21 e 42 dias, com diferença estatisticamente significativa em relação ao dia 0, sugere correlação entre o aumento de PAD4 com a progressão e cronificação da doença, além da associação com o aumento de NETs, sugerindo que a PAD4 participa da liberação das NETs durante o desenvolvimento da lesão periapical em camundongos. Nossos achados

corroboram com um estudo de Engström et al. (2018), cuja avaliação *in vivo* da expressão imuno-histoquímica de PAD2 e PAD4 em pacientes com e sem periodontite resultou em aumento da citrulinização proteica local, bem como da expressão de PAD2 e PAD4 durante a inflamação gengival crônica. Adicionalmente, a análise de qPCR evidenciou expressão de mRNA de *PADI2* e *PADI4* significativamente maior ($p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente) no tecido gengival de pacientes com periodontite, em comparação com controles saudáveis sem a doença. Esses achados corroboram com resultados do presente estudo, que revelou em geral, maior expressão de PAD4 durante os períodos experimentais em comparação com o grupo controle, sem a doença, com diferença estatística significativa entre 0 e 5 dias e 0 e 21 dias ($p < 0,05$). Embora diferentes entidades, as lesões periodontais e periapicais têm como principal fator etiológico a presença de micro-organismos, que geram uma resposta imune-inflamatória complexa e com mecanismos de patogênese coincidentes, resultando em reabsorção óssea. Spengler e colaboradores, em 2015, demonstraram o papel negativo que as enzimas PAD4 podem ter ao citrulinar os componentes da matriz extracelular do tecido local para gerar auto antígenos no Líquido Sinovial da Artrite Reumatóide, potencializando a inflamação local. Aplicando a colocação desse estudo e ainda contribuições do estudo de Liu et al., 2021, que também associou a ação da enzima PAD4 com a formação de anticorpos auto imunes, no contexto da lesão periapical, sugere-se que o aumento da PAD4 pode contribuir para a infecção pulpar em curso, com o aumento da inflamação crônica, e ainda citrulinar os componentes da matriz extracelular dos tecidos da região periapical para gerar auto antígenos, intensificando a inflamação local.

Em estudo recente de Contreras et al. (2023), as características imuno-histológicas da pulpíte irreversível sintomática e pulpíte reversível em dentes humanos extraídos foram comparados com os resultados do quadro clínico das doenças. Observou-se que na pulpíte irreversível, o número de neutrófilos presentes na câmara pulpar foi superiormente maior que na pulpíte reversível. Ainda, alguns destes neutrófilos exibiam características semelhantes à das NETS (teias irregulares extracelularmente). O aumento de neutrófilos corrobora com nossos achados durante a fase de maior extensão da lesão periapical, em 21 e 42 dias, com maior número de neutrófilos. Os autores desse estudo concluíram que é compreensível que o número

de neutrófilos seja maior durante o dano pulpar irreversível, quando a sintomatologia do paciente é aguda.

Paralelamente, Neves e colaboradores, em 2020, observaram que, em animais neutropênicos, após a exposição pulpar experimental em camundongos e selamento com MTA, os referidos dentes apresentaram aumento da secreção de dentina reparadora, sugerindo que o menor recrutamento de neutrófilos suprime a inflamação na polpa dentária, estimulando o reparo tecidual com produção de dentina reparadora. Esse dado pode ser indiretamente correlacionado com o número aumentado de neutrófilos nos períodos finais do experimento do presente estudo e, conseqüentemente, maior liberação de NETs, com a evolução da lesão periapical.

Com o objetivo de avaliar a participação de armadilhas extracelulares de neutrófilos no querubismo, Fuji e colaboradores, em 2021, utilizaram o modelo de lesão periapical induzida experimentalmente em camundongos, semelhante ao nosso, em camundongos geneticamente modificados. Os autores testaram a hipótese de que uma inflamação local desencadearia a expansão da mandíbula, um sinal de desenvolvimento da doença querubismo. Os camundongos com querubismo apresentaram inflamação exacerbada, com aumento do número de neutrófilos, macrófagos e osteoclastos. Além disso, o desenvolvimento da periodontite apical foi observada a partir de 3 dias de experimento, assim como em nosso experimento, em que a necrose parcial no canal radicular começou a ser observada histologicamente aos 2 dias. Adicionalmente, no estudo de Fuji et al. 2021, observou-se o aumento progressivo de intensidade dos marcadores MPO e CitH3, considerando os períodos experimentais de 3, 7 e 14 dias, por meio da co-localização por imunofluorescência para NETs. Tais resultados corroboram com nossos achados, em que a coloração imuno-histoquímica de MPO e CitH3 também evidenciou aumento progressivo desses marcadores com o tempo.

Quanto à expressão de mRNA de *PADI4*, *ELANE* e *MPO*, um estudo de Hounkpe e colaboradores, em 2020, avaliou a modulação da expressão gênica de componentes das NETs na doença falciforme, e concluíram que a expressão gênica de *PADI4*, *ELANE* e *MPO* foi aumentada durante a crise vaso-oclusiva. Além disso, os autores apoiam o conceito de que a inibição de *PADI4* poderia ser explorada como um alvo terapêutico para a doença.

Em nosso estudo, de forma geral, observou-se maior expressão de *ELANE* aos 5 e 21 dias, com diferença estatística entre o grupo controle e 5 dias ($p < 0,05$), e maior expressão de *MPO* em 21 dias, com diferença estatística entre o grupo controle e os períodos experimentais de 2, 5, 7 e 21 dias. Para o *PADI4*, houve maior expressão em 7 dias sem, no entanto, apresentar diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) em relação aos demais períodos, seguido de 42 dias, que foi estatisticamente diferente do período de 21 dias ($p < 0,05$) de desenvolvimento da lesão. Alguns resultados da expressão gênica não se correlacionam diretamente com os achados imuno-histoquímicos do presente estudo, os quais, no geral, apresentaram maior expressão aos 21 e 42 dias de lesão periapical. No entanto, essas diferenças podem ser atribuídas a algumas limitações da técnica de RT-PCR para a avaliação das NETs na lesão periapical, como a utilização de amostras da hemi-mandíbula inteira, que incluem tecidos do dente, ligamento periodontal e osso alveolar, impossibilitando a avaliação precisa dos marcadores somente nas regiões apical e periapical. Adicionalmente, deve-se ressaltar que o RT-PCR não é capaz de avaliar isoladamente a expressão extracelular dos marcadores relacionados às NETs (*MPO*, *H3C1* e *ELANE*), indicando que esses dados devem ser interpretados em um contexto geral e extrapolados com cautela para indicar a formação dessas armadilhas de neutrófilos. Apesar dessas limitações que, possivelmente, tenham dificultado a evidenciação das diferenças entre os períodos iniciais e tardios da lesão, os resultados fornecidos por essa técnica de biologia molecular complementam os dados histológicos e imuno-histoquímicos do estudo, contribuindo para o entendimento do complexo micro-ambiente da lesão periapical.

Tsuji e colaboradores (2009) realizaram um estudo de metodologia semelhante ao nosso, no qual avaliou a localização imuno-histoquímica de proteases neutras liberadas durante o desenvolvimento de lesão perirradicular, em ratos. Foi observado que a maior parte das células que expressaram as proteases avaliadas eram neutrófilos polimorfonucleares identificados morfológicamente. A elastase de neutrófilos, catepsina G, colagenase 2 e gelatinase B foram detectadas ao redor do ápice radicular aos 14 dias, e então a presença dessas proteases aumentou, gradualmente, aos 21 e 28 dias de análise. Esses resultados concordam com nossos achados para a catepsina G, que foi encontrada em maior intensidade nos períodos crônicos da lesão, de 21 e

42 dias, com diferença estatística significativa em relação ao seu grupo controle ($p < 0,05$). Além disso, houve aumento gradual de expressão dessa enzima conforme a progressão da lesão, concordantemente com os achados de Tsuji et al (2009). Poucas células expressando catepsina G estavam presentes nos períodos iniciais do nosso estudo, em que os períodos de 2, 5 e 7 dias não apresentaram marcação positiva ou apresentaram marcação suave, em 7 dias, o que também foi exposto por Tsuji e colaboradores. Até o presente momento, não há estudos que relacionem a catepsina G como marcador de NETs e sua relação com a lesão periapical, assim como a expressão gênica dessa enzima nesse contexto. No entanto, um estudo de Guan et al. (2021) relacionou a catepsina G associada a NETs, como facilitadora da invasão de células de carcinoma hepatocelular *in vitro*, sendo que em sua cultura de células, observou-se que a inibição de catepsina G bloqueou eficientemente a capacidade dos neutrófilos de promover a invasão de células carcinogênicas e também reduziu consideravelmente a extensão da formação de NETs, sugerindo a participação da catepsina G nas armadilhas extracelulares. Em 2015, Hirschfeld e colaboradores demonstraram em estudo de gengivite induzida a partir de biofilme supragengival, por meio de microscopia confocal, que a catepsina G estava presente ao redor de células bacterianas, confirmando que a proteína é capaz de se ligar às superfícies celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, em parte devido ao seu caráter catiônico e às suas propriedades de ligação ao LPS, exercendo atividade antimicrobiana em biofilmes dentais e atuando na remoção de bactérias.

Esses resultados apontam para o papel ainda pouco explorado da catepsina G durante a formação e extrusão das NETs, bem como na lesão periapical, sugerindo a necessidade de novos estudos a fim de elucidar esses questionamentos.

Adicionalmente, estudos adicionais são necessários para confirmar a participação e o papel das NETs nas infecções endodônticas, evidenciando sua estrutura com maior precisão, possibilitando o desenvolvimento de potenciais alvos terapêuticos.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que as Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos estão sugestivamente presentes na lesão periapical induzida em camundongos, especialmente nos períodos finais do experimento. O número aumentado de neutrófilos nas fases crônicas da doença confirma a expressão mais intensa de marcadores relacionados às NETs nesses períodos e, conseqüentemente, sua correlação com o aumento da extensão da lesão periapical. As proteínas PAD4 e CTSG também estão presentes durante a progressão da doença, sugerindo ação na degradação do tecido do hospedeiro, o que potencializa a resposta inflamatória e a progressão da lesão periapical.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

Apel F, Zychlinsky A, Kenny EF. The role of neutrophil extracellular traps in rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2018; 14(8), 467–475.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Louzada LM, Dos Santos DG, Andreote FD, Gomes BPF. Microbiological analysis of endodontically treated teeth with apical periodontitis before and after endodontic retreatment. *Clin Oral Investig*. 2021 Apr;25(4):2017-2027.

Barreiros D, Nelson P Filho, Paula-Silva FWG, Oliveira KMH, Lucisano MP, Rossi A, Silva LAB, K uchler 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.

Berger-Achituv S, Brinkmann V, Abed UA, K uhn 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.

Bertasso AS, L eon JE, Silva RAB, et al. 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 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.

Bianchi M, Hakkim A, Brinkmann V, et al. Restoration of NET formation by gene therapy in CGD controls aspergillosis. *Blood*. 2009;114(13):2619-2622.

Birkelund S, Bennike TB, Kastaniegaard K, et al. Proteomic analysis of synovial fluid from rheumatic arthritis and spondyloarthritis patients. *Clin Proteomics*. 2020;17:29

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.

Boeltz S, Amini P, Anders HJ, Andrade F, Bilyy R, Chatfield S, et al. 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.

Branzk N, Lubojemska A, Hardison SE, et al. Neutrophils sense microbe size and selectively release neutrophil extracellular traps in response to large pathogens. *Nat Immunol*. 2014;15(11):1017-1025.

Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004; 303:1532–1535.

Brinkmann V, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps: is immunity the second function of chromatin? *J Cell Biol*. 2012 Sep 3;198(5):773-83.

Brinkmann V. Neutrophil Extracellular Traps in the Second Decade. *J Innate Immun*. 2018; 10(5-6):414-421.

- Burgener SS, Schroder K. Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2020;12(7):a037028.
- Byrd AS, O'Brien XM, Johnson CM, Lavigne LM, Reichner JS. An extracellular matrix-based mechanism of rapid neutrophil extracellular trap formation in response to *Candida albicans*. *J Immunol.* 2013; 190(8):4136–4148.
- Chen KW, Monteleone M, Boucher D, Sollberger G, Ramnath D, Condon ND, von Pein JB, Broz P, Sweet MJ, Schroder K. Noncanonical inflammasome signaling elicits gasdermin D-dependent neutrophil extracellular traps. *Sci Immunol.* 2018; 3: eaar6676.
- 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, Kuberski P. Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med.* 2007; 13(4):463-469.
- Claushuis TAM, van der Donk LEH, Luitse AL, et al. Role of Peptidylarginine Deiminase 4 in Neutrophil Extracellular Trap Formation and Host Defense during *Klebsiella pneumoniae*-Induced Pneumonia-Derived Sepsis. *J Immunol.* 2018;201(4):1241-1252.
- Colón DF, Wanderley CW, Franchin M, Silva CM, Hiroki CH, Castanheira FVS, Donate PB, Lopes AH, Volpon LC, Kavaguti SK, Borges VF, Speck-Hernandez CA, Ramalho F, Carlotti AP, Carmona F, Alves-Filho JC, Liew FY, Cunha FQ. Neutrophil extracellular traps (NETs) exacerbate severity of infant sepsis. *Crit Care.* 2019; 23(1):113.
- 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.
- Cooper PR, Palmer LJ, Chapple IL. Neutrophil extracellular traps as a new paradigm in innate immunity: friend or foe? *Periodontol.* 2013; 63:165–197.
- 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;38(6):803-813.
- de Buhr N, von Köckritz-Blickwede M. How Neutrophil Extracellular Traps Become Visible. *J Immunol Res.* 2016;2016:4604713.
- 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 Oliveira KMH, Garlet GP, De Rossi A, Barreiros D, Queiroz AM, da Silva LAB, Nelson-Filho P, da Silva RAB. Effects of Rosiglitazone on the Outcome of Experimental Periapical Lesions in Mice. *J Endod.* 2017;43(12):2061-2069.

- 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 Vasconcelos NM, Van Opdenbosch N, Van Gorp H, Parthoens E, Lamkanfi M. Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. *Cell Death Differ*. 2019;26(1):146-161.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. First of two parts. *N Engl J Med*. 2000; 343:37-49.
- Delves PJ, Roitt IM. The immune system. Second of two parts. *N. Engl. J. Med*. 2000; 343:108-117.
- 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
- Engström M, Eriksson K, Lee L, Hermansson M, Johansson A, Nicholas AP, Gerasimcik N, Lundberg K, Klareskog L, Catrina AI, Yucel-Lindberg T. Increased citrullination and expression of peptidylarginine deiminases independently of *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in gingival tissue of patients with periodontitis. *J Transl Med*. 2018 Jul 31;16(1):214
- Fouad AF. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *J Dent Res* 1997; 76: 1548-54.
- 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;12:649693.
- Fuchs TA, Abed U, Goosmann C, Hurwitz R, Schulze I, Wahn V, Weinrauch Y, Brinkmann V, Zychlinsky A. Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell Biol*. 2007; 176 (2) 231-241.
- Funchal GA, Jaeger N, Czepielewski RS, et al. Respiratory syncytial virus fusion protein promotes TLR-4-dependent neutrophil extracellular trap formation by human neutrophils. *PLoS One*. 2015;10(4):e0124082.
- Gabriel GH. Definições e mecanismos moleculares em morte celular. *Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14 n.26; p. 2017.*
- 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;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):1035-1044.
- Ginley BG, Emmons T, Lutnick B, Urban CF, Segal BH, Sarder P. Computational detection and quantification of human and mouse neutrophil extracellular traps in flow cytometry and confocal microscopy. *Sci Rep*. 2017;7:17755.

- Gomes BP, Vianna ME, Zaia AA, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Ferraz CC. Chlorhexidine in endodontics. *Braz Dent J.* 2013;24(2):89-102.
- 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.
- Guan X, Lu Y, Zhu H, Yu S, Zhao W, Chi X, Xie C, Yin Z. The Crosstalk Between Cancer Cells and Neutrophils Enhances Hepatocellular Carcinoma Metastasis via Neutrophil Extracellular Traps-Associated Cathepsin G Component: A Potential Therapeutic Target. *J Hepatocell Carcinoma.* 2021 May 20;8:451-465.
- Hager M, Cowland JB, Borregaard N. Neutrophil granules in health and disease. *J Intern Med.* 2010; 268:25–34.
- Hakkim A, Fürnrohr BG, Amann K, Laube B, Abed UA, Brinkmann V, Herrmann M, Voll RE, Zychlinsky A. Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107(21):9813-9818.
- Hirschfeld J, Dommisch H, Skora P, Horvath G, Latz E, Hoerauf A, Waller T, Kawai T, Jepsen S, Deschner J, Bekeredjian-Ding I. Neutrophil extracellular trap formation in supragingival biofilms. *Int J Med Microbiol.* 2015 Jun-Aug;305(4-5):453-63.
- 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; 85(12):e00297-17.
- Holder JM, 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.e3.
- Houkpe BW, Chenou F, Domingos IF, et al. Neutrophil extracellular trap regulators in sickle cell disease: Modulation of gene expression of PADI4, neutrophil elastase, and myeloperoxidase during vaso-occlusive crisis. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;5(1):204-210.
- Itagaki K, Kaczmarek E, Lee YT, Tang IT, Isal B, Adibnia Y, Sandler N, Grimm MJ, Segal BH, Otterbein LE, Hauser CJ. Mitochondrial DNA released by trauma induces neutrophil extracellular traps. *PLoS One.* 2015; 10(3):e0120549.
- Jiang Q, Zhao Y, Shui Y, et al. Interactions Between Neutrophils and Periodontal Pathogens in Late-Onset Periodontitis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021;11:627328.
- Kenny EF, Herzig A, Krüger R, Muth A, Mondal S, Thompson PR, Brinkmann V, Bernuth HV, Zychlinsky A. 2017. Diverse stimuli engage different neutrophil extracellular trap pathways. *eLife* 6: 24437.
- Keshari RS, Jyoti A, Kumar S, Dubey M, Verma A, Srinag BS, Krishnamurthy H, Barthwal MK, Dikshit M. Neutrophil extracellular traps contain mitochondrial as well as nuclear DNA and exhibit inflammatory potential. *Cytometry A.* 2012; 81(3):238-247.
- Khalighinejad N, Aminoshariae MR, Aminoshariae A, Kulild JC, Mickel A, Fouad AF. Association between Systemic Diseases and Apical Periodontitis. *J Endod.* 2016;42(10):1427-34.

- Khan I, Steeg PS. Endocytosis: a pivotal pathway for regulating metastasis. *Br J Cancer*. 2021;124(1):66-75.
- 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.
- Kim S, Hong KH, Gu JY, In JW, Ahn MY, Kim HK. High Circulating Levels of Neutrophil Extracellular Traps Parameters Predicting Poor Outcome in COVID-19. *Ann Clin Lab Sci*. 2022 May;52(3):374-381.
- Kithcart AP, Libby P. Casting NETs to predict cardiovascular outcomes. *Eur J Prev Cardiol*. 2018; 25(7), 759–761.
- Klopf J, Brostjan C, Eilenberg W, Neumayer C. Neutrophil Extracellular Traps and Their Implications in Cardiovascular and Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*. 2021;22(2):559.
- Kolaczkowska E, Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2013 Mar;13(3):159-75.
- Kumar S, Gupta E, Kaushik S, Jyoti A. Neutrophil Extracellular Traps: Formation and Involvement in Disease Progression. *Iran J Allergy Asthma Immunol*. 2018; 17(3):208-220.
- Laridan E, Martinod K, De Meyer SF. Neutrophil Extracellular Traps in Arterial and Venous Thrombosis. *Semin Thromb Hemost*. 2019;45(1):86-93.
- Lee KH, Kronbichler A, Park DD-Y, Park Y, Moon H, Kim H, , Choi JH, Choi Y, Shim S, Lyu IS, Yun BH, Han Y, Lee D, Lee SY, Yoo BH, Lee KH, Kim TL, Kim H, Shim JS, Nam W, So H, Choi S, Lee S, Shin JI. Neutrophil extracellular traps (NETs) in autoimmune diseases: A comprehensive review. *Autoimmun Rev*. 2017; 16(11), 1160–1173.
- Li P, Li M, Lindberg MR, Kennett MJ, Xiong N, Wang Y. PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med*. 2010; 207 (9):1853-1862.
- Liu X, Arfman T, Wichapong K, Reutelingsperger CPM, Voorberg J, Nicolaes GAF. PAD4 takes charge during neutrophil activation: Impact of PAD4 mediated NET formation on immune-mediated disease. *J Thromb Haemost*. 2021;19(7):1607-1617.
- Lood C, Blanco LP, Purmalek MM, Carmona-Rivera C, De Ravin SS, Smith CK, Malech HL, Ledbetter JA, Elkon KB, Kaplan MJ. Neutrophil extracellular traps enriched in oxidized mitochondrial DNA are interferogenic and contribute to lupus-like disease. *Nat Med*. 2016; 22(2):146–153.
- Lucisano MP, da Silva RAB, de Sousa Pereira AP, et al. Alteration of the oral microbiota may be a responsible factor, along with estrogen deficiency, by the development of larger periapical lesions. *Clin Oral Investig*. 2021;25(6):3651-3662.
- 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; 54(3):218-224.
- Masucci MT, Minopoli M, Del Vecchio S, Carriero MV. The Emerging Role of Neutrophil Extracellular Traps (NETs) in Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol*. 2020;11:1749.

- Matta B, Battaglia J, Barnes BJ. Detection of neutrophil extracellular traps in patient plasma: method development and validation in systemic lupus erythematosus and healthy donors that carry *IRF5* genetic risk. *Front Immunol*. 2022;13:951254.
- McCarthy CG, Saha P, Golonka RM, Wenceslau CF, Joe B, Vijay-Kumar M. Innate Immune Cells and Hypertension: Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps (NETs). *Compr Physiol*. 2021;11(1):1575-1589.
- 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):137.
- Milligan KL, Mann D, Rump A, et al. Complete Myeloperoxidase Deficiency: Beware the "False-Positive" Dihydrorhodamine Oxidation. *J Pediatr*. 2016;176:204-206.
- Naffah de Souza C, Breda LC, Khan MA, Rogério de Almeida S, Câmara NS, Sweezey 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.
- Nakashima K, Hagiwara T, Yamada M. Nuclear localization of peptidylarginine deiminase V and histone deimination in granulocytes. *J. Biol. Chem*. 2002; 277: 49562-49568.
- Nakazawa D, Kumar S, Desai J, Anders HJ. Neutrophil extracellular traps in tissue pathology. *Histol Histopathol*. 2017 Mar;32(3):203-213.
- Nakazawa D, Tomaru U, Suzuki A, Masuda S, Hasegawa R, Kobayashi T. Abnormal conformation and impaired degradation of NETs induced by propylthiouracil: implication of disordered NETs in MPO-ANCA-associated vasculitis. *Arthritis Rheum*. 2012; 64:3779-3787.
- Neves VCM, Yianni V, Sharpe PT. Macrophage modulation of dental pulp stem cell activity during tertiary dentinogenesis. *Sci Rep*. 2020 Nov 19;10(1):20216.
- Ng YL, Mann V, Gulabivala K. A prospective study of the factors affecting outcomes of non-surgical root canal treatment: part 2: tooth survival. *Int Endod J*. 2011 Jul;44(7):610-25.
- Nguyen GT, Green ER, Meccas J. Neutrophils to the ROScUE: Mechanisms of NADPH Oxidase Activation and Bacterial Resistance. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:373.
- Papayannopoulos V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. *Nat Rev Immunol*. 2018;18(2):134-147.
- Pastorek M, Dúbrava M, Celec P. On the Origin of Neutrophil Extracellular Traps in COVID-19. *Front Immunol*. 2022;13:821007.
- 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.
- Pérez-Figueroa E, Álvarez-Carrasco P, Ortega E, Maldonado-Bernal C. Neutrophils: Many Ways to Die. *Front Immunol*. 2021;12:631821.

- Pieterse E, Rother N, Yanginlar C, et al. Cleaved N-terminal histone tails distinguish between NADPH oxidase (NOX)-dependent and NOX-independent pathways of neutrophil extracellular trap formation. *Ann Rheum Dis*. 2018;77(12):1790-1798.
- 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.
- 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.
- Ricucci D, Russo J, Rutberg M, Burleson JA, Spångberg LS. A prospective cohort study of endodontic treatments of 1,369 root canals: results after 5 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011 Dec;112(6):825-42.
- Roberts HM, Yonel Z, Kantarci A, Grant MM, Chapple ILC. Impact of Gingivitis on Circulating Neutrophil Reactivity and Gingival Crevicular Fluid Inflammatory Proteins. *Int J Environ Res Public Health*. 2022;19(10):6339.
- Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, et al. Ovariectomy Exacerbates Apical Periodontitis in Rats with an Increase in Expression of Proinflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases. *J Endod*. 2018;44(5):780-785.
- Rosales C. Neutrophils at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol*. 2020;108(1):377-396.
- Saitoh T, Komano J, Saitoh Y, et al. Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe*. 2012;12(1):109-116.
- Sánchez-Sanhueza G, Bello-Toledo H, González-Rocha G, Gonçalves AT, Valenzuela V, Gallardo-Escárate C. Metagenomic study of bacterial microbiota in persistent endodontic infections using Next-generation sequencing. *Int Endod J*. 2018 Dec;51(12):1336-1348.
- Santos-Junior AO, De Castro Pinto L, Mateo-Castillo JF, Pinheiro CR. Success or failure of endodontic treatments: A retrospective study. *J Conserv Dent*. 2019 Mar-Apr;22(2):129-132.
- Silva L, 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, LAB. Tratado de Odontopediatria. 2 ed. Volume 1 e 2. Venezuela: AMOLCA; 2018.
- Silva, LAB. Tratamento Endodôntico em Crianças. Santana de Parnáiba: Manole, 2022.
- Silva, RAB, Sousa-Pereira AP, Lucisano MP, et al. Alendronate inhibits osteocyte apoptosis and inflammation via IL-6, inhibiting bone resorption in periapical lesions of ovariectomized rats. *Int Endod J*. 2020;53(1):84-96.

- Siqueira JF, Roças I. Present status and future directions in endodontic microbiology. *Endodontic Topics* 2014; 30: 3–22.
- Sjogren U, Hagglund B, Sundqvist G, Wing K. Factors affecting the long-term results of endodontic treatment. *J Endod.* 1990;16:498–504. [PubMed] [Google Scholar].
- Skupien JA, Opdam N, Winnen R, Bronkhorst E, Kreulen C, Pereira-Cenci T, Huysmans MC. A practice-based study on the survival of restored endodontically treated teeth. *J Endod.* 2013 Nov;39(11):1335-40.
- Smith CS, Setchell DJ, Harty FJ. Factors influencing the success of conventional root canal therapy – A five-year retrospective study. *Int Endod J.* 1993;26:321–33
- Sollberger G, Choidas A, Burn GL, Habenberger P, Di Lucrezia R, Kordes S, Zychlinsky A, 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.
- Song YH, Wang ZJ, Kang L, He ZX, Zhao SB, Fang X, Li ZS, Wang SL, Bai Y. PADs and NETs in digestive system: From physiology to pathology. *Front Immunol.* 2023 Jan 24;14:1077041.
- Spengler J, Lugonja B, Ytterberg AJ, Zubarev RA, Creese AJ, Pearson MJ, Grant MM, Milward M, Lundberg K, Buckley CD, Filer A, Raza K, Cooper PR, Chapple IL, Scheel-Toellner D. Release of Active Peptidyl Arginine Deiminases by Neutrophils Can Explain Production of Extracellular Citrullinated Autoantigens in Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid. *Arthritis Rheumatol.* 2015 Dec;67(12):3135-45.
- Stashenko P. Role of immune cytokines in the pathogenesis of periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6(3):89-96.
- Swartz DB, Skidmore AE, Griffin JA., Jr Twenty years of endodontic success and failure. *J Endod.* 1983;9:198–202. [PubMed] [Google Scholar]
- Thiam HR, Wong SL, Wagner DD, Waterman CM. Cellular Mechanisms of NETosis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2020 Oct 6;36:191-218.
- Tibúrcio-Machado CS, Michelon C, Zanatta FB, Gomes MS, Marin JA, Bier CA. The global prevalence of apical periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Int Endod J.* 2021 May;54(5):712-735.
- Tillack K, Breiden P, Martin R, Sospedra M. T lymphocyte priming by neutrophil extracellular traps links innate and adaptive immune responses. *J Immunol.* 2012; 188(7):3150–3159.
- Tomar B, Anders HJ, Desai J, Mulay SR. Neutrophils and Neutrophil Extracellular Traps Drive Necroinflammation in COVID-19. *Cells.* 2020;9(6):1383.
- Tsai CY, Hsieh SC, Liu CW, et al. Cross-Talk among Polymorphonuclear Neutrophils, Immune, and Non-Immune Cells via Released Cytokines, Granule Proteins, Microvesicles, and Neutrophil Extracellular Trap Formation: A Novel Concept of Biology and Pathobiology for Neutrophils. *Int J Mol Sci.* 2021;22(6):3119.
- Tsourouktsoglou TD, Warnatsch A, Ioannou M, Hoving D, Wang Q, Papayannopoulos V. Histones, DNA, and Citrullination Promote Neutrophil Extracellular Trap Inflammation by Regulating the Localization and Activation of TLR4. *Cell Rep.* 2020;31(5):107602.

- 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.
- Vitkov L, Minnich B, Knopf J, Schauer C, Hannig M, Herrmann M. NETs Are Double-Edged Swords with the Potential to Aggravate or Resolve Periodontal Inflammation. *Cells*. 2020;9(12):2614.
- Wan T, Zhao Y, Fan F, Hu R, Jin X. Dexamethasone Inhibits *S. aureus*-Induced Neutrophil Extracellular Pathogen-Killing Mechanism, Possibly through Toll-Like Receptor Regulation. *Front Immunol*. 2017; 8:60.
- Wang M, Ishikawa T, Lai Y, Nallapothula D, Singh RR. Diverse Roles of NETosis in the Pathogenesis of Lupus. *Front Immunol*. 2022;13:895216.
- Wang S, Wang Y. Peptidylarginine deiminases in citrullination, gene regulation, health and pathogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 2013; 829(10):1126-1135.
- Wang Y, Li M, Stadler S, Correll S, Li P, Wang D, Hayama R, Leonelli L, Han H, Grigoryev SA, Allis CD, Coonrod AS. Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J Cell Biol*. 2009; 184(2):205–213.
- White PC, Chicca IJ, Cooper PR, Milward MR, Chapple IL. Neutrophil Extracellular Traps in Periodontitis: A Web of Intrigue. *J Dent Res*. 2016;95(1):26-34.
- Wright HL, Lyon M, Chapman EA, Moots RJ, Edwards SW. Rheumatoid Arthritis Synovial Fluid Neutrophils Drive Inflammation Through Production of Chemokines, Reactive Oxygen Species, and Neutrophil Extracellular Traps. *Front Immunol*. 2021.
- Wu Z, Deng Q, Pan B, Alam HB, Tian Y, Bhatti UF, Liu B, Mondal S, Thompson PR, Li Y. Inhibition of PAD2 Improves Survival in a Mouse Model of Lethal LPS-Induced Endotoxic Shock. *Inflammation*. 2020.
- Yipp BG, Petri B, Salina D, Jenne CN, Scott BN, Zbytniuk LD, Pittman K, Asaduzzaman M, Wu K, Meijndert HC, Malawista SE, Chevance A, Zhang K, Conly J, Kubes P. Dynamic NETosis is Carried Out by Live Neutrophils in Human and Mouse Bacterial Abscesses and During Severe Gram-Positive Infection. *Nat Med*. 2012; 18(9): 1386–1393.
- Yousefi S, Mihalache C, Kozlowski E, Schmid I, Simon HU. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ*. 2009; 16:1438–1444.
- Yu HH, Yang YH, Chiang BL. Chronic Granulomatous Disease: a Comprehensive Review. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2021;61(2):101-113.
- Zawrotniak M, Rapala-Kozik M. Neutrophil extracellular traps (NETs) — formation and implications. *J Polish Biochemical Society*. 2013; (60) 277–284.
- Zhao W, Fogg DK, Kaplan MJ. A novel image-based quantitative method for the characterization of netosis. *J Immunol Meth*. 2015; 423, 104-110.

Zhou Q, Sun HJ, Liu SM. [Formation of neutrophil extracellular traps and their effects on autoimmune diseases]. Zhongguo Zhong Yao Za Zhi. 2021 Nov;46(21):5568-5575

Zhu D, Song W, Jiang Z, Zhou H, Wang S. Citrullination: A modification important in the pathogenesis of autoimmune diseases. Clin Immunol. 2022 Sep 29:109134.

7. Anexo

Anexo A**APROVAÇÃO PELA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

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

Of. CEUA 063/2020

Ribeirão Preto, 16 de setembro de 2020.

Ref. processo nº 2020.1.243.58.4

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais da FORP, em sua 79ª Sessão, realizada em 16/09/2020, **APROVOU** os procedimentos éticos apresentados no Protocolo sobre a Pesquisa intitulada: "Armadilhas Extracelulares de Neutrófilos (Nets) na Gênese e Desenvolvimento da Lesão Periapical em Animais Wild-Type e Knockout", emitindo o certificado anexo.

Informamos, também, que por se tratar de **animais geneticamente modificados**, **Vossa Senhoria deverá se programar junto à Coordenação do Biotério, em decorrência da necessidade de autorização para manutenção desses animais naquele local.**

Informamos, ainda, que deverá ser entregue na Secretaria da CEUA, **até 18/09/2022**, o **Relatório Final** contendo os resultados e/ou resumo do trabalho publicado.

Atenciosamente,

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

c/c: Prof. Dr. Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva - Coordenador do Biotério I
Sr. Raphael Martini Vicente – Responsável Técnico pelos Biotérios da FORP

Ilmo(a). Sr(a).

Prof. Dra. Raquel Assed Bezerra Segato
Departamento de Clínica Infantil
desta Faculdade

./ash