

RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 05/06/2026.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

BEATRIZ KOWALSKI FIAMINI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS E ANTI-
INFLAMATÓRIOS DE MEDICAÇÕES INTRACANAL ASSOCIADAS A N-
ACETIL CISTEÍNA**

BEATRIZ KOWALSKI FIAMINI

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS EFEITOS ANTIMICROBIANOS E ANTI-
INFLAMATÓRIOS DE MEDICAÇÕES INTRACANAL ASSOCIADAS A N- ACETIL
CISTEÍNA**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA, pelo Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Endodontia. Linha de pesquisa: patogenia, imaginologia e terapias em odontologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2024

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2025]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Fiamini, Beatriz Kowalski

Avaliação clínica dos efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios de medicações intracanal associadas a N-acetil cisteína / Beatriz Kowalski Fiamini. - São José dos Campos : [s.n.], 2024.
86 f.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2024.

Orientador: Marcia Carneiro Valera.

1. Acetilcisteína. 2. Citocinas. 3. Clorexidina. 4. Endotoxinas. 5. Hidróxido de cálcio. I. Valera, Marcia Carneiro, orient. II. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. III. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - UNESP. IV. Universidade Estadual Paulista (UNESP). V. Título.

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

O tratamento endodôntico busca a máxima redução de microrganismos no sistema de canais radiculares em níveis compatíveis com a cura na região periapical. Para alcançar esse objetivo, são utilizadas diversas estratégias de desinfecção, como o preparo biomecânico, associado à irrigação abundante com substâncias químicas auxiliares, seguido pela aplicação de medicação intracanal, o que irá potencializar a descontaminação durante o tratamento (Ørstavik, 1996; Siqueira; Rôças, 2008). Além disso, a medicação intracanal pode contribuir para melhorar a resposta inflamatória periapical do hospedeiro (Ørstavik, 1996; Siqueira; Rôças, 2008).

O $\text{Ca}(\text{OH})_2$ é uma medicação intracanal bem estabelecida em Endodontia, e atua no combate dos microrganismos e seus produtos, e na modulação da inflamação periapical (Estrela; Holland, 2003; Siqueira; Lopes, 1999). No entanto, sua ação é limitada, uma vez que a difusão de íons Ca^{++} e OH^- na dentina é dificultada por sua capacidade tampão (Nerwich; Figdor; Messer, 1993; Wang; Humfa, 1988), além disso, essa difusão varia ao longo do comprimento do canal radicular, sendo o terço cervical mais eficaz em relação ao terço apical (Nerwich; Figdor; Messer, 1993). Como resultado, as bactérias dentro dos túbulos dentinários estão expostas ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ apenas na entrada do canal (Sjögren et al., 1991). Além disso, pesquisas destacam que microrganismos multirresistentes podem sobreviver à medicação intracanal com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013; Pinheiro et al., 2003; Prada et al., 2019).

Neste contexto, a N-acetilcisteína (NAC) é uma substância química que possui ação antioxidante, anti-inflamatória, que atua contra patógenos e biofilme, sendo muito utilizada na área médica (Pérez-Giraldo et al., 1997).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa realizou um estudo *in vivo* utilizando a NAC como medicação intracanal (Corazza et al., 2021), que demonstrou resultados satisfatórios no perfil inflamatório periapical, porém, notou-se que sua ação antimicrobiana não foi tão satisfatória, sugerindo que esse efeito poderia ser aumentado por meio da associação da NAC a outros antimicrobianos, visando, assim, o seu uso na clínica endodôntica. Na sequência, realizamos outro estudo *in vivo* (Martinho et al., 2022) utilizando a NAC e avaliando sua ação sobre patógenos endodônticos, a qual obteve resultados promissores (publicações referentes ao auxílio pesquisa FAPESP 2018/01703-9). Paralelamente, realizamos um estudo *in vitro* associando a NAC ao $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e obtivemos resultados promissores com total eliminação de *Enterococcus faecalis* (dados não publicados).

Portanto, neste estudo clínico randomizado, foi analisado *in vivo* as medicações intracanaís: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + soro fisiológico; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NAC e NAC + CHX, a fim de avaliar a ação combinada da NAC com antimicrobianos comumente utilizados na Endodontia sobre microrganismos e seus produtos, e os efeitos dessas medicações sobre o processo inflamatório na região periapical. Essa abordagem visou oferecer novas perspectivas antimicrobianas e anti-inflamatórias.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

Endodontic treatment aims for maximal reduction of microorganisms in the root canal system at levels compatible with healing in the periapical region. To achieve this, various disinfection strategies are employed, such as biomechanical preparation, coupled with abundant irrigation with auxiliary chemical substances, followed by intracanal medication application, enhancing decontamination during treatment (Ørstavik, 1996; Siqueira; Rôças, 2008). Additionally, intracanal medication may contribute to improving the periapical inflammatory response (Ørstavik, 1996; Siqueira; Rôças, 2008).

Calcium hydroxide ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) is a well-established intracanal medication in Endodontics, combating microorganisms and their products, and modulating periapical inflammation (Estrela; Holland, 2003; Siqueira; Lopes, 1999). However, its action is limited, as the diffusion of Ca^{++} and OH^- ions in dentin is hindered by its buffering capacity (Nerwich; Figdor; Messer, 1993; Wang; Humfa, 1988), further varying along the root canal length, with the cervical third being more effective than the apical third (Nerwich; Figdor; Messer, 1993). Consequently, bacteria within dentinal tubules are exposed to $\text{Ca}(\text{OH})_2$ only at the canal entrance (Sjögren et al., 1991). Moreover, research highlights that multidrug-resistant microorganisms may survive Minimum Inhibitory Concentration (MIC) with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013; Pinheiro et al., 2003; Prada et al., 2019).

In this context, N-acetylcysteine (NAC) is a chemical substance with antioxidant, anti-inflammatory properties, acting against pathogens and biofilms, widely used in the medical field (Pérez-Giraldo et al., 1997). Recently, our research group conducted an *in vivo* study using NAC as intracanal medication (Corazza et al., 2021), showing satisfactory results in periapical inflammatory profile. However, its antimicrobial action was not as effective, suggesting that combining NAC with other antimicrobials could enhance its use in endodontic clinics. Subsequently, another *in vivo* study (Martinho et al., 2022) assessed NAC's action on endodontic pathogens, yielding promising results (publications related to FAPESP research grant 2018/01703-9). Simultaneously, an *in vitro* study combining NAC with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ demonstrated promising results, with complete elimination of *Enterococcus faecalis* (unpublished data).

Thus, this randomized clinical study analyzed intracanal medications *in vivo*: $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + saline solution; $\text{Ca}(\text{OH})_2$ + NAC, and NAC + CHX, aiming to evaluate the combined action of NAC with commonly used antimicrobials in Endodontics on microorganisms and their products, and the effects of these medications on the inflammatory process in the periapical region. This approach aimed to provide new antimicrobial and anti-inflammatory perspectives.

BANCA EXAMINADORA

Marcia Carneiro Valera Garakis (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

Elaine Faga Iglecias

Universidade Paulista

Endodontia

Campus Bachelar

Claudio Antonio Talge Carvalho

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus São José dos Campos

São José dos Campos, 05 de junho de 2024.

Dedicatória

Dedico esse trabalho, primeiramente, a minha família: meu pai, Antonio Carlos Fiamini, minha mãe, Ana Cristina Kowalski Fiamini, e minha irmã, Bruna Kowalski Fiamini, que sempre me apoiam em meus sonhos. Desde criança vocês me ensinaram sobre a importância da educação e o quão longe ela poderia nos levar. A etapa de hoje mostra o quanto tudo isso refletiu em mim.

Dedico também aos meus avós, Antonio Fiamini, Leonídia da Silva Fiamini, Sérgio Kowalski e Reiko Watanabe, que estarão sempre comigo, em meu coração.

Dedico à minha madrinha, Marisa Maggioni Kowalski.

Dedico aos meus amigos: Marcos Airam Ribeiro e Silva, Brenda Salvarani Cruz de Almeida, Bianca Batista Bassi e Ana Paula Diogo.

Aos meus amigos e colegas de pós-graduação: Aline de Castro Santos, Carolina Fedel Gagliardi, Mariana Muniz Toledo Orlando, Gustavo Guimarães Guerrero e Camila Gobbi de Carvalho Barbosa.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, Ana Cristina Kowalski Fiamini e Antonio Carlos Fiamini e a minha irmã, Bruna Kowalski Fiamini, por me apoiarem tanto em todos os meus sonhos, inclusive nesse.

Agradeço a minha madrinha, Marisa Maggioni Kowalski, sempre tão carinhosa e atenciosa.

Aos meus amigos do coração Brenda Salvarani Cruz de Almeida, Marcos Airam Ribeiro e Silva, Bianca Batista Bassi e Ana Paula Diogo por me darem forças, inspiração, carinho.

Ao Lucas André Grejo Almendra e sua família: Fátima Cristina Grejo e Ricardo Almendra, por me auxiliarem tanto durante a trajetória do mestrado.

À minha orientadora Marcia Carneiro Valera, que tanto admiro, e por confiar em meu trabalho, principalmente para ser operadora desse belíssimo projeto clínico.

Aos meus colegas de pós-graduação, orientados pela professora Marcia: Aline de Castro, Camila Gobbi Carvalho Barbosa, Gustavo Guimarães Guerrero, Carolina Fedel Gagliardi, Mariana Muniz Toledo Orlando, Rafael Araújo da Costa Ward, Letícia Ferreira dos Santos e Leila Paes, tenho muito orgulho da pesquisa que estamos desenvolvendo.

À Bruna Jordão Motta Corazza, por todos os ensinamentos transmitidos para mim no início da minha pós-graduação. Apesar do pouco tempo de convivência que compartilhamos, foi essencial para o meu conhecimento e aprendizado jornada dentro do mestrado.

À Rayana Duarte Khoury, que me ajudou/ensinou a estatística desse projeto, e não mediu esforços para isso. Minha eterna gratidão e admiração à você.

Aos meus colegas de pós-graduação, Mariana Gimenez, Caroline Trefiglio e Felipe Moura.

Às minhas alunas de iniciação científica Letícia Ferreira dos Santos (agora colega de pós-graduação) e Marina Tibúrcio Bento.

Ao Carlos Alberto Guedes, por sempre ser tão solícito e ter me ajudado tanto no processo para obtenção da bolsa FAPESP que foi tão importante para mim durante o meu mestrado.

Aos funcionários da Unesp, Gabi, Evelyn, Josiane, Claudinei.

À minha primeira orientadora, Thaís Torralbo Lopez-Capp, por me inspirar dentro da academia, e por abrir as portas para as minhas primeiras oportunidades, as quais foram fundamentais para eu estar aqui hoje.

Ao Phillip Leo Tomson, que me inspirou e me fez sonhar grande, mesmo que a BEPE não tenha dado certo, agradeço todo o carinho e dedicação que teve comigo.

À Karine Michelle Merlin de Almeida Pereira, por sempre ter tanto cuidado comigo e com o meu processo, e estar ao meu lado antes e durante a minha jornada no mestrado.

Aos professores da área de concentração de Endodontia do ICT – Unesp, os quais são grandes inspirações para mim: Amjad Abu Hasna, Rayana Duarte Khoury e Cláudio Antonio Talge.

Aos alunos de iniciação científica da área de Endodontia, que também foram importantíssimos para o desenvolvimento desse trabalho: Larissa Aparecida, Gabriela Oliveira, Vinícius Carvalho, Geovana Serafim, Aline Fontana, Bianca Cabral, Giovanna Bontorim.

Aos nossos pacientes da pesquisa clínica, pela confiança depositada em nós e por todo o carinho.

À Sueli Shiraishi Nozawa, Ana Maria Auseti Ribeiro, Marco Antonio Petrone, Patrícia Daher, Maria Cristina Daher, Tamires Donato, Marcela Nishikawa por todo o carinho e confiança em meu trabalho.

Às minhas amigas Caroline Nascimento Duarde e Flávia Sasso Brandão, por quem nutro muito carinho e admiração.

Às minhas companheiras de apartamento atuais: Maria Eduarda Araújo (Madu), Itza Amarisis Ribeiro Pinto, Carolina Fedel Gagliardi, Mylenne Marinho e Rodrigo Nascimento.

Às minhas antigas companheiras de apartamento Mariana Muniz, Laura Calvache Arcila, Luiza Damasceno, Ana Julia Borgia e Karen Kaufmann.

Aos meus amigos da graduação, que sinto muita saudade: Rebecca Vicentini de Oliveira Machado, Letícia Portela Pawlovski, Juliana de Souza Silva, Vitor Henrique de Paula Cardoso Jesus e Tayna Carlini Gonçalves.

Aos meus professores de Endodontia da graduação, que “plantaram a sementinha” da Endodontia em mim: Neivaldo José Alves de Souza, Lilian Maekawa, Adriana Chung e Sérgio de Oliveira.

Às minhas colegas da especialização em Endodontia, que são grandes amigas e endodontistas: Thainá Becalli, Letícia Veri, Fabiana da Costa, Simone Azevedo e Aline Rodrigues.

À Thaís Nejm, minha professora da especialização que tanto admiro como professora e como endodontista.

Aos meus professores de graduação que marcaram minha jornada acadêmica: Fábio Dupart Nascimento, Galdino Iague Neto, Ricardo Amore.

Ao Leonardo Nogueira Golçalves e Tayna Carlini Gonçalves, profissionais e amigos incríveis que me proporcionaram/proporcionam grandes oportunidades no ramo da Harmonização Orofacial e estética.

Ao Fabiano Vasconcelos, Fábio Dupart Nascimento e Paula Sena da Mata, professores do curso de especialização em Harmonização Orofacial, que foi muito importante em minha formação acadêmica.

A Daniele de Lima Silveira, Nathalia Suzana do Nascimento Soares, Maria Silva e Eli Damaris da Silva Santos que cuidam da minha autoestima e sempre tornam meus dias mais felizes.

A Ana Carolina Cambui, que nos ensinou o qPCR na USP com tanta paciência e de forma tão leve.

Aos terceiros que participaram desta pesquisa, e foram essenciais para o seu desenvolvimento: Izilvania, Amanda, Ana Beatriz Safady, Ericka Tavares Pinheiro, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Renata Falchete do Prado.

Confie na magia dos novos começos.

RESUMO

Fiamini BK. Avaliação clínica dos efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios de medicações intracanal associadas a N-acetil Cisteína [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2024.

A interação entre fatores microbianos em canais radiculares com polpa necrótica e a reação inflamatória contra a invasão desses agentes agressores nos tecidos perirradiculares do hospedeiro ocasiona o desenvolvimento, progressão e disseminação da periodontite apical. Este estudo clínico randomizado teve como objetivo avaliar a desinfecção dos canais radiculares e o processo inflamatório periapical após o preparo biomecânico e o uso de diferentes medicações intracanaís (MIC), monitorando o perfil bacteriano; níveis de endotoxinas; modulação inflamatória através da quantificação de citocinas inflamatórias em dentes com infecções endodônticas primárias e periodontite apical. Foram relacionados os níveis de endotoxinas e perfil microbiano com sinais e sintomas clínicos; e a quantidade de citocinas foi correlacionada com o volume da lesão periapical (mm^3), através do uso de tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC). Para atingir o objetivo proposto, 29 dentes permanentes e unirradiculares apresentando necrose pulpar e lesão periapical foram submetidos à terapia endodôntica em sessão múltipla. Foram coletadas amostras do interior dos canais após a abertura coronária (S1); após o preparo biomecânico (S2), e após 14 dias da MIC (S3), com hidróxido de cálcio + solução salina fisiológica (Ca(OH)_2 + soro fisiológico); hidróxido de cálcio + N-acetil cisteína (Ca(OH)_2 + NAC); e N-acetil cisteína + clorexidina (NAC + CHX). Os conteúdos coletados foram analisados quanto ao perfil microbiológico por *Checkerboard DNA-DNA hybridization* e quantificação de endotoxinas pelo teste *Limulus Amebocyte Lysate - LAL*. Também foram feitas coletas do fluido intersticial apical após o preparo biomecânico (SF1) e após 14 dias de MIC (SF2) para a quantificação de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-17 e TNF- α) pelo ensaio multiplex. Todos os dados obtidos foram tabulados no software *GraphPad Prism 8* e foram analisados estatisticamente. O teste de Dunn comparou espécies bacterianas entre grupos de MIC, enquanto o teste de Kruskal-Wallis comparou níveis de LPS. A correlação entre o volume das lesões periapicais e as citocinas inflamatórias foi analisada pelo teste de Spearman ($p < 0,1$). Em relação às espécies bacterianas, LPS e sinais e sintomas clínicos, a NAC combinada com Ca(OH)_2 ou CHX mostrou resultados semelhantes ao grupo controle (Ca(OH)_2 + solução salina). As citocinas inflamatórias IL-1 β e TNF- α demonstraram correlação com o volume de destruição óssea periapical em casos de infecção endodôntica primária em dentes unirradiculares, sugerindo que ambas podem influenciar diretamente o processo de reabsorção óssea periapical. Conclui-se que diferentes MICs associadas a NAC são eficazes na desinfecção dos canais radiculares, equiparando-se ao Ca(OH)_2 + soro fisiológico, que já é uma MIC bem estabelecida em Endodontia, e a IL-1 β e o TNF- α se correlacionaram positivamente com a destruição óssea periapical.

Palavras-chave: Acetilcisteína; Citocinas; Clorexidina; Endotoxinas; Hidróxido de Cálcio; Periodontite apical.

ABSTRACT

Fiamini BK. Clinical evaluation of antimicrobial and anti-inflammatory effects of intracanal medications associated with N-acetyl cysteine [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2024.

The interaction between microbial factors in root canals with necrotic pulp and the inflammatory response against these aggressive agents in the host's periradicular tissues leads to the development, progression, and dissemination of apical periodontitis. This randomized clinical trial aimed to evaluate root canal disinfection and the periapical inflammatory process following biomechanical preparation and the use of different intracanal medications (MIC). The study monitored the bacterial profile, endotoxin levels, and inflammatory modulation through the quantification of inflammatory cytokines in teeth with primary endodontic infections and apical periodontitis. Endotoxin levels and microbial profiles were correlated with clinical signs and symptoms, while cytokine levels were correlated with the volume of the periapical lesion (mm³) using cone-beam computed tomography (CBCT). To achieve the proposed objective, 45 permanent, single-rooted teeth with pulp necrosis and periapical lesions underwent multi-session endodontic therapy. Samples were collected from the canal interiors after coronal opening (S1), after biomechanical preparation (S2), and after 14 days of MIC treatment (S3) using calcium hydroxide + saline solution (Ca(OH)₂ + saline solution); calcium hydroxide + N-acetylcysteine (Ca(OH)₂ + NAC); and N-acetylcysteine + chlorhexidine (NAC + CHX). The collected contents were analyzed for microbial profile using Checkerboard DNA-DNA hybridization and for endotoxin quantification using the Limulus Amebocyte Lysate (LAL) test. Apical interstitial fluid samples were also collected after biomechanical preparation (SF1) and after 14 days of MIC (SF2) for the quantification of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-17, and TNF- α) using a multiplex assay. All data obtained were tabulated in GraphPad Prism 8 software and statistically analyzed. Dunn's test compared bacterial species between MIC groups, while the Kruskal-Wallis test compared LPS levels. The correlation between periapical lesion volume and inflammatory cytokines was analyzed using Spearman's test ($p < 0.1$). Regarding bacterial species, LPS, and clinical signs and symptoms, NAC combined with Ca(OH)₂ or CHX showed results similar to the control group (Ca(OH)₂ + saline solution). The inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α showed a correlation with the volume of periapical bone destruction in cases of primary endodontic infection in single-rooted teeth, suggesting that both may directly influence the process of periapical bone resorption. It is concluded that different MICs combined with NAC are effective in disinfecting root canals, comparable to Ca(OH)₂ + saline solution, which is already a well-established MIC in Endodontics, and that IL-1 β and TNF- α positively correlate with periapical bone destruction.

Keywords: Cytokines; Chlorhexidine; Endotoxins; Calcium hydroxide; N-acetyl cysteine; Apical periodontitis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO7

2 ARTIGOS12

2.1 Artigo 1.....12

2.2 Artigo 2.....41

CONSIDERAÇÕES GERAIS58

REFERÊNCIAS.....61

ANEXO A67

ANEXO B74

1 INTRODUÇÃO

A polpa dental é um tecido conjuntivo frouxo altamente especializado contido no interior da cavidade pulpar que desempenha funções muito importantes para a homeostasia do complexo dentino-pulpar, dentre elas, a formação de dentina, resposta sensorial e resposta imunológica (Demarco et al., 2011; Tennert et al., 2014). Quando a polpa é sujeita a estímulos agressores, como trauma dental ou exposição à cárie profunda, a escassez de circulação colateral diminui o aporte sanguíneo nesta região, e logo, o tecido pulpar torna-se suscetível à lesão irreversível, que pode culminar com sua rápida degeneração e posterior necrose tecidual (Tennert et al., 2014).

O caráter microbiano das infecções endodônticas primárias é representado por bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (Gomes et al., 2004; Rôças, Siqueira e Santos, 2004), que estão envolvidas com os sintomas clínicos e com a patogênese das reações inflamatórias periapicais (Assed et al., 1996; Sundqvist, 1992). As bactérias Gram-negativas possuem lipopolissacarídeos (LPS) na membrana externa da parede celular, que são endotoxinas e potentes agentes inflamatórios liberados durante a morte e reprodução celular (Pitts, Williams e Morton, 1982). O LPS é um padrão molecular associado a patógenos (PAMP) que, ao ser reconhecido por seus receptores de reconhecimento padrão (PRRs) em células de resposta imune, como os macrófagos, inicia a resposta do hospedeiro para eliminar o agente agressor. Frente à liberação do LPS, o reconhecimento dessa substância pelo sistema imunológico ocorre através dos receptores *Toll-like*, que também são responsáveis por identificar ligantes endógenos induzidos durante a resposta inflamatória (Akira, Takeda e Kaisho, 2001).

A resposta inflamatória do hospedeiro às infecções endodônticas é influenciada por citocinas e quimiocinas inflamatórias, fundamentais para a sinalização celular e com um papel crucial na modulação das respostas imunológicas diante da infecção endodôntica, essas proteínas desempenham funções vitais, incluindo ativação, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose dos linfócitos (Burska; Boissinot; Ponchel, 2014; Seymour; Taylor, 2000). Elas são secretadas por diferentes tipos celulares presentes nos tecidos lesados,

desempenham um papel fundamental na modulação da atividade celular durante o processo inflamatório, alterando as funções celulares ou recrutando células de defesa para a região agredida (Borish; Steinke, 2003). Além disso, as citocinas são subdivididas em citocinas que aprimoram as respostas imunológicas celulares (pró-inflamatórias) e aquelas que favorecem as respostas de anticorpos (anti-inflamatórias) (Burska; Boissinot; Ponchel, 2014). Em conjunto com as prostaglandinas, as citocinas, incluindo interleucinas e o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), desempenham um papel fundamental na promoção e controle da resposta inflamatória, essas substâncias contribuem ativando e diferenciando os osteoclastos, células encarregadas da reabsorção óssea na região apical (Nair et al., 1996).

A interleucina 1 β (IL-1 β), produzida por diversos tipos celulares, incluindo macrófagos, osteoclastos, PMNs e fibroblastos, é um mediador eficaz da reabsorção óssea, tanto na osteoporose quanto em lesões perirradiculares em Endodontia (Fouad, 1997; He et al., 2020; Lim et al., 1994; Morsani et al., 2011). Estudos indicam que a IL-1 β está correlacionada com sinais e sintomas clínicos, bem como com a extensão da destruição óssea periapical (Lim et al., 1994; Tani-Ishii; Wang; Stashenko, 1995). A interleucina 6 (IL-6), por sua vez, é crucial na remodelação óssea e na ativação e diferenciação de células do sistema imunológico e osteoclastos. Em lesões periapicais, a IL-6 está presente em níveis avançados e associada a casos sintomáticos, desempenhando um papel pró-inflamatório e contribuindo para a reabsorção óssea (Azuma et al., 2021; Jakovljevic et al., 2015).

O TNF- α é outro mediador inflamatório eficaz que induz a perda de massa óssea e é reconhecido como o principal mediador da resposta inflamatória aguda, especialmente quando desencadeada por bactérias Gram-negativas e outros micro-organismos infecciosos (Birkedal-Hansen, 1993). O TNF- α atua nas células estromais, aumentando a expressão de fatores de reabsorção óssea e promovendo a diferenciação dos osteoclastos, mesmo na ausência de níveis elevados de RANKL, exercendo um impacto significativo na diferenciação dos osteoclastos (Gupta, 2002; Lam, 2000).

Já a interleucina 17 (IL-17), inicialmente identificada como pró-inflamatória e secretada por células T ativadas, desempenha um papel crucial na defesa contra infecções bacterianas e fúngicas, mas quando em excesso, contribui para a inflamação crônica e persistente (Beringer; Noack; Miossec, 2016; McGeachy; Cua;

Gaffen, 2019; Moseley et al., 2003; Veerdonk et al., 2011). A ação benéfica ou prejudicial da IL-17 depende da quantidade produzida e da forma como seus sinais são recebidos e transmitidos dentro das células respondentes (McGeachy, Cua, Gaffen, 2019).

Assim, o tratamento de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical, tem como objetivos a eliminação dos micro-organismos e seus produtos bem como prevenir a reinfecção intrarradicular, a fim de possibilitar condições favoráveis para a cura dos tecidos periapicais (Siqueira; Rôças, 2008). Para isso, é realizado o preparo biomecânico associado a substâncias químicas auxiliares como o hipoclorito de sódio, que dentre suas atividades, possui capacidade de dissolução de matéria orgânica e ação antimicrobiana (Haapasalo et al., 2010). No entanto, para complementar a antisepsia do sistema de canais radiculares e modular a inflamação na região apical e periapical, o uso de medicação intracanal (MIC) tem sido amplamente recomendado (Barbosa-Ribeiro et al., 2018).

O hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2) tem sido utilizado como MIC por apresentar ação sobre micro-organismos, cuja atividade está relacionada à dissociação iônica em íons Ca^{2+} e OH^- , além de possuir ação sobre LPS de bactérias Gram-negativas (Mohammadi; Dummer, 2011) e atuar no processo inflamatório periapical (Martinho et al., 2015). Entretanto, diversos estudos (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013; Lima et al., 2015; Pinheiro et al., 2003, 2015; Prada et al., 2019) têm demonstrado que determinados micro-organismos podem resistir à ação do Ca(OH)_2 e das demais manobras de descontaminação adotadas durante o tratamento endodôntico (Guerreiro-Tanomaru et al., 2013; Lima et al., 2015; Mayer, 2015; Pinheiro et al., 2003; Prada et al., 2019). Assim, a associação do hidróxido de cálcio com outras substâncias, como a clorexidina (CHX), tem o potencial de ser utilizada como MIC de forma mais eficaz nas infecções endodônticas (Mohammadi; Dummer, 2011; Valera et al., 2010).

O uso da CHX associada ao hidróxido de cálcio aumenta a atividade antimicrobiana da medicação (Mohammadi; Abbott, 2009) uma vez que soma a ação da duas medicações (Signoretto et al., 2011) resultando em amplo espectro de ação antimicrobiana, ação antifúngica, propriedade da substantividade, cuja atividade no canal dura até 12 semanas e portanto seu uso pode minimizar a recontaminação, além de ser biocompatível (Mohammadi, Abbott, 2009). Entretanto, os trabalhos da

literatura mostram que ainda existe a necessidade da busca por uma medicação com maior atividade antimicrobiana, especialmente nos biofilmes bacterianos (Rabin et al., 2015) e que atue na resolução do processo inflamatório periapical.

Nesse contexto, a N-acetil cisteína (NAC) é uma substância química derivada da cisteína com ação antioxidante pela presença do grupo tiol (Samuni et al., 2013) que estimula a síntese de glutatona (GSH), atua na desintoxicação e eliminam espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cacciatore et al., 2010). A NAC também tem capacidade de inibir as citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-6 (Palacio; Markert; Martínez, 2011) e se mostrou eficaz contra patógenos e biofilme endodônticos em estudos *in vitro* (Choi et al., 2018; Moon et al., 2016).

Em estudos clínicos realizados por nosso grupo de pesquisa, verificou-se que Ca(OH)₂ + CHX gel 2% e NAC mostraram uma atividade antimicrobiana mais ampla do que Ca(OH)₂ + soro fisiológico contra patógenos endodônticos na infecção primária do canal radicular (Martinho et al., 2022). Sendo assim, associar a NAC com outras substâncias químicas pode favorecer o aumento do espectro de ação antimicrobiano dessa substância. Além disso, a atividade antibiofilme associada a capacidade anti-inflamatória da NAC também demonstra grande potencial, uma vez que, além de combater a infecção, a terapia endodôntica terá melhores resultados quando se aumenta os eventos regenerativos intrínsecos dos tecidos perirradiculares danificados (Virdee et al., 2022).

A associação de NAC com CHX já foi testada *in vitro* apresentando resultados favoráveis como MIC contra biofilme de *Enterococcus faecalis* demonstrando a ação sinérgica dessa associação (Palaniswamy et al., 2016). Em estudo realizado *in vitro* por nosso grupo de pesquisa (dados ainda não publicados), também verificou-se excelente ação antimicrobiana da NAC associada ao Ca(OH)₂ sobre biofilme de *E. faecalis*. Além disso, a NAC interfere no processo de neoformação óssea em implantes, pois reduz a expressão do Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL) com consequente melhor osteointegração (Lee et al., 2013).

A diminuição da densidade mineral óssea causada pelos produtos bacterianos decorrentes da infecção endodôntica é visualizado na radiografia como uma área radiolúcida em torno do ápice radicular (Bender, 1997), e o tamanho da radiolucência periapical antes e após o tratamento endodôntico é rotineiramente

comparado com o uso de radiografia periapical (RP) em duas dimensões (2D). No entanto, de acordo com as recomendações da AAE (American Association of Endodontists) e AAOMR (American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology) (EUA, 2015) a utilização da tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) se faz necessária para análise de fatores pré-operatórios, tais como a presença e o tamanho real da lesão periapical, que desempenham um papel importante no resultado e no acompanhamento do tratamento endodôntico. Sendo assim, no presente estudo foi utilizada a TCFC para avaliar o volume das lesões periapicais.

Devido à busca contígua por medicamentos que atuem tanto na microbiota e produtos dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares, bem como que atuam no processo inflamatório periapical, e associada à ampla experiência de nosso grupo com estudos clínicos randomizados, a finalidade do presente projeto foi avaliar novas associações de medicações intracanal sobre microrganismos presentes no sistema de canais radiculares e seu papel no processo inflamatório periapical.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

O combate à infecção endodôntica nos canais radiculares representa um desafio em Endodontia, onde a MIC pode ter um papel substancial durante o tratamento endodôntico. Desta forma, o artigo 1 exposto anteriormente, apresenta a NAC, uma substância química com diversas características promissoras e desejáveis para uma MIC, como a sua atividade antibacteriana (Choi et al., 2018; Martinho et al., 2022; Moon et al., 2016; Olofsson; Hermansson; Elwing, 2003; Palaniswamy et al., 2016; Pérez-Giraldo et al., 1997; Quah et al., 2012; Calefi et al., 2022; Ulusoy et al., 2016; Zhao; Liu, 2010), e a sua capacidade de desorganizar comunidades bacterianas em biofilmes (Choi et al., 2018; Pérez-Giraldo et al., 1997; Quah et al., 2012) o que pode torná-la uma alternativa, além do Ca(OH)_2 .

Este estudo utilizou a *checkerboard DNA-DNA hybridization* para identificar bactérias em infecções endodônticas primárias em dentes unirradiculares. As amostras iniciais (S1) apresentaram uma média de 35 espécies por canal radicular, confirmando a natureza polimicrobiana dessas infecções (Cavalli et al., 2017; Gomes et al., 2004; Nair, 2004; Siqueira et al., 2004). A espécie bacteriana Gram- negativa mais prevalente foi a *Prevotella melaninogenica*, enquanto *Streptococcus sanguinis* foi a mais prevalente entre as Gram-positivas. Estudos clínicos anteriores relataram uma média menor de espécies bacterianas iniciais por canal radicular (Cavalli et al., 2017; Ferreira et al., 2015; Machado et al., 2020). Além disso, a composição bacteriana após a abertura coronária e antes do preparo biomecânico não coincidiu completamente entre estudos anteriores e o presente estudo (Cavalli et al., 2017; Ferreira et al., 2015; Machado et al., 2020).

Após o preparo biomecânico, houve uma redução significativa no número de espécies bacterianas, mas a composição não mudou significativamente. A etapa MIC resultou em um aumento no número de espécies bacterianas após a preparo biomecânico, exceto para o grupo de medicação com Ca(OH)_2 + NAC. *Fusobacterium nucleatum* foi a bactéria mais prevalente após a MIC por 14 dias, especialmente nos grupos de medicação com Ca(OH)_2 + solução salina e Ca(OH)_2 + NAC. O preparo biomecânico associado a MIC se mostraram cruciais para reduzir a quantidade de endotoxinas.

Além disso, certas espécies bacterianas e níveis mais altos de endotoxinas

estão diretamente relacionados aos sinais e sintomas clínicos (Cavalli et al., 2017; Jacinto et al., 2005). No entanto, devido ao tamanho amostral limitado, não foi possível estabelecer essa relação estatisticamente. Pacientes do grupo NAC + CHX relataram menos dor pós-tratamento, sugerindo melhor eficácia clínica.

A partir dos resultados expostos no artigo 1, foi possível observar que, apesar do baixo espaço amostral, os grupos de MIC associadas à NAC (Ca(OH)_2 + NAC e NAC + CHX) apresentaram resultados semelhantes aos do grupo controle (Ca(OH)_2 + soro fisiológico) em relação a redução microbiana e de seus subprodutos. Ademais, os sinais e sintomas clínicos dos grupos de medicação associados à NAC foram semelhantes ao do grupo controle (Ca(OH)_2 + soro fisiológico). Logo, a NAC se mostra uma alternativa para o Ca(OH)_2 , o qual é uma MIC consagrada e utilizada há mais de um século em Endodontia (Siqueira; Lopes, 1999).

Há uma deficiência de estudos *in vitro* e *in vivo* que investiguem os efeitos da NAC contra patógenos endodônticos e seus subprodutos, logo, sugere-se que mais pesquisas com espaços amostrais maiores e acompanhamento de longo prazo sejam realizadas para validar os achados do presente estudo e explorar as amplas aplicações clínicas da NAC em Endodontia.

Além disso, no artigo 2 exposto anteriormente, foi analisada a correlação existente entre o volume da destruição óssea periapical e a quantidade de citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-17a e TNF- α), em casos de infecção endodôntica primária em dentes unirradiculares.

Neste estudo clínico, foi encontrada uma correlação moderada e leve respectivamente entre a quantidade de IL-1 β e de TNF- α presente no fluido periapical e o volume de destruição óssea periapical. Esses achados estão alinhados com os resultados obtidos por Popovska et al. (2017), que também relataram uma correlação moderada entre o tamanho das lesões periapicais e a quantidade de IL-1 β . Além disso, observou-se que a IL-1 β está presente em lesões periapicais crônicas durante estágios de exacerbação aguda e em granulomas nos estágios iniciais de desenvolvimento. Adicionalmente, em um estudo clínico realizado por Bakhsh et al. (2022), foram observados níveis mais altos de IL-1 β e IL-6 em lesões periapicais maiores. Em comparação com o presente estudo, esses achados são consistentes com IL-1 β , mas não com IL-6, que não mostrou

correlação com o volume de destruição óssea periapical. Em outro estudo clínico realizado por Ataonlu et al. (2002), os níveis de IL-1 β e TNF- α em exsudatos periapicais foram analisados, e níveis mais altos de IL-1 β foram encontrados em comparação com TNF- α , e maiores quantidades de IL-1 β foram associadas a áreas maiores de radiolusência periapical, bem como no presente estudo, onde a correlação com a destruição óssea periapical da IL-1 β foi maior em relação ao TNF- α .

No entanto, as citocinas inflamatórias IL-6 e IL-17a não apresentaram correlação. No que concerne a IL-6, os resultados estão alinhados com os achados de Hofbauer et al. (1999), onde o TNF- α e IL-1 β estimulam os níveis estáveis de mRNA do ligante da osteoprotegerina, um fator crucial para induzir a osteoclastogênese em várias células da linhagem osteoblástica humana, enquanto IL-6 não demonstrou esse efeito. No entanto, como sugerido por Azuma et al. (2014), durante a formação de lesões periapicais, há um aumento local de IL-6 em resposta à infecção, o que pode induzir a formação de novos osteoclastos a partir de células progenitoras hematopoiéticas, bem como ativar osteoclastos pré-existent. Isso poderia teoricamente estabelecer uma relação direta entre IL-6 e o volume de lesões periapicais. No entanto, esses achados não se alinham com os resultados deste estudo clínico. Além disso, em um estudo clínico conduzido por Martinho et al. (2012), o tamanho de lesões periapicais observadas radiograficamente correlacionou-se com TNF- α e IL-6, mas não com IL-1 β . Embora os resultados para TNF- α entrem em acordo com este estudo, os resultados para IL-6 e IL-1 β não encontraram suporte.

De acordo com os achados do presente estudo, IL-17a não apresentou correlação com o volume da destruição óssea periapical. Além disso, entre as citocinas estudadas nesta pesquisa, IL-17a exibiu a menor expressão. Consistente com esses achados, Ajuz et al. (2014) não encontraram correlação entre o volume de lesões periapicais e a IL-17a. Há uma falta de estudos que investiguem a atuação da IL-17a na periodontite apical, destacando a necessidade de mais pesquisas.

REFERÊNCIAS

- Ajuz NC, Antunes H, Mendonça TA, Pires FR, Siqueira JF, Armada L. Immunoexpression of interleukin 17 in apical periodontitis lesions. *J Endod*. 2014;40(9):1400–3.
- Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature*. 2001;2(8).
- Assed S, Ito IY, Leonardo MR, Silva LAB, Lopatin DE. Anaerobic microorganisms in root canals of human teeth with chronic apical periodontitis detected by indirect immunofluorescence. *Dent Traumatol*. 1996;12(2):66–9.
- Ataonlu T, Üngör M, Serpek B, Halilonlu S, Ataonlu H, Ari H. Interleukin-1 β and tumour necrosis factor- α levels in periapical exudates. *Int Endod J*. 2002;35:181–5.
- Azuma MM, Cardoso CBM, Samuel RO, Pipa CB, Bomfim SRM, Narciso LG, et al. Omega-3 fatty acids alter systemic inflammatory mediators caused by apical periodontitis. *J Endod*. 2021;47(2):272–7.
- Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezani-Junior E, Cintra LTA. The role of IL-6 on apical periodontitis: A systematic review. *Int Endod J*. 2014;47(7):615–21.
- Bakhsh A, Moyes D, Proctor G, Mannoci F, Niazi SA. The impact of apical periodontitis, non-surgical root canal retreatment and periapical surgery on serum inflammatory biomarkers. *Int Endod J*. 2022;55(9):923–37.
- Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, Zaia AA, Cezar C, Ferraz R, Flávio J, et al. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2018;1–8.
- Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *J Endod*. 1997;23(1):5–14.
- Beringer A, Noack M, Miossec P. IL-17 in chronic inflammation: From discovery to targeting. *Trends Mol Med*. 2016;22(3):230–41.
- Borish LC, Steinke JW. Cytokines and chemokines. *J Allergy Clin Immunol*. 2003;111:460–75.
- Burska A, Boissinot M, Ponchel F. Cytokines as biomarkers in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*. 2014;2014:1–25.

Cacciatore I, Cornacchia C, Pinnen F, Mollica A, Di Stefano A. Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. *Molecules*. 2010;15(3):1242–64.

Calefi PHS, Queiroz IOA, Alcalde MP, De Oliveira SHP, VIVAN RR, Weckwerth PH, et al. Comparison of the physicochemical properties, antimicrobial action, and cytotoxicity of ambroxol hydrochloride, N-acetylcysteine, and calcium hydroxide pastes. *Eur Endod J*. 2022;7(3):217–22.

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FGR, Alves MC, et al. Effectiveness in the removal of endotoxins and microbiological profile in primary endodontic infections using 3 different instrumentation systems: A randomized clinical study. *J Endod*. 2017;43(8):1237–45.

Choi YS, Kim C, Moon JH, Lee JY. Removal and killing of multispecies endodontic biofilms by N-acetylcysteine. *Braz J Microbiol*. 2018;49(1):184–8.

Corazza BJM, Martinho FC, Khoury RD, Toia CC, Orozco EIF, Prado RF, et al. Clinical influence of calcium hydroxide and N-acetylcysteine on the levels of resolvins E1 and D2 in apical periodontitis. *Int Endod J*. 2021;54(1):61–73.

Demarco FF, Conde MCM, Cavalcanti BN, Casagrande L, Sakai VT, Nor JE. Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*. 2011;22:3–13.

Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci*. 2003;11(4):269–82.

Ferreira NS, Martinho FC, Cardoso FGR, Nascimento GG, Carvalho CAT, Valera MC. Microbiological profile resistant to different intracanal medications in primary endodontic infections. *J Endod*. 2015;41(6):824–30.

Fouad AF. IL-1 α and TNF- α expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *J Dent Res*. 2000;79(12):1981–6.

Gomes BPA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa ELR, Ferraz CCR, Zaia AA, et al. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol*. 2004;19(28):71–6.

Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*. 1999;25(3):255–9.

Jacinto RC, Gomes BPA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol*. 2005;54(8):777–83.

Machado FP, Khoury RD, Toia CC, Flores Orozco EI, de Oliveira FE, de Oliveira LD, et al. Primary versus post-treatment apical periodontitis: microbial composition, lipopolysaccharides and lipoteichoic acid levels, signs and symptoms. *Clin Oral Investig*. 2020;24(9):3169–79.

Martinho FC, Corazza BJM, Khoury RD, Orozco EIF, Toia CC, Machado FP, et al. Impact of N-acetylcysteine (NAC) and calcium hydroxide intracanal medications in primary endodontic infection: a randomized clinical trial. *Clin Oral Investig*. 2022.

Martinho FC, Nascimento GG, Leite FRM, Gomes APM, Freitas LF, Cam ICG. Clinical influence of different intracanal medications on Th1-type and Th2-type cytokine responses in apical periodontitis. *J Endod*. 2015;41(2):169–75.

McGeachy MJ, Cua DJ, Gaffen SL. The IL-17 Family of Cytokines in Health and Disease. *Immunity*. 2019;50(4):892–906.

Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *International Endodontic Journal*. 2009;42(4):288–302.

Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *International Endodontic Journal*. 2011;44(8):697–730.

Moon J, Choi Y, Lee H, Heo JS, Chang SW, Lee J. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *Journal of Microbiology*. 2016;54(4):322–9.

Morsani JM, Aminoshariae A, Han YW, Montagnese TA, Mickel A. Genetic predisposition to persistent apical periodontitis. *Journal of Endodontics*. 2011;37(4):455–9.

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2003;14(2):155–74.

Nair SP, Meghji S, Wilson M, Reddi K, White P, Henderson B. Bacterially Induced Bone Destruction: Mechanisms and Misconceptions. *Infection and Immunity*. 1996;64(7):2371–80.

Olofsson AC, Hermansson M, Elwing H. N-acetyl-L-cysteine affects growth, extracellular polysaccharide production, and bacterial biofilm formation on solid surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003;69(8):4814–22.

Nair PNR. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine*. 2004;15(6):348–81.

Nerwich A, Figdor D, Messer HH. pH Changes in Root Dentin over a 4-Week Period following Root Canal Dressing with Calcium Hydroxide. *Journal of Endodontics*. 1993;19(6).

Ørstavik D. Time-course and risk analyses of the development and healing of chronic apical periodontitis in man. *International Endodontic Journal*. 1996;29:150–5.

Palacio JR, Markert UR, Martínez P. Anti-inflammatory properties of N-acetylcysteine on lipopolysaccharide-activated macrophages. *Inflammation Research*. 2011;60(7):695–704.

Palaniswamy U, Lakkam SR, Arya S, Aravelli S. Effectiveness of N-acetyl cysteine, 2% chlorhexidine, and their combination as intracanal medicaments on *Enterococcus faecalis* biofilm. *Journal of Conservative Dentistry*. 2016;19:17–20.

Pérez-Giraldo C, Rodríguez-Benito A, Mórán FJ, Hurtado C, Blanco MT, Gómez-García AC. Influence of N-acetylcysteine on the formation of biofilm by *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 1997;39:643–7.

Pinheiro ET, Gomes BPFA, Ferraz CCR, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiology and Immunology*. 2003;18(2):100–3.

Pinheiro ET, Candeir GT, Teixeira SR, Shin RC, Prado LC, Gavini G, et al. RNA-based Assay Demonstrated *Enterococcus faecalis* Metabolic Activity after Chemomechanical Procedures. *Journal of Endodontics*. 2015;41(9).

Pitts DL, Williams BL, Morton TH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *Journal of Endodontics*. 1982;8(1).

Popovska I, Dimova C, Evrosimoska B, Stojanovska V, Muratovska I, Cetenović B, et al. Relationship between IL-1 β production and endodontic status of human periapical lesions. *Vojnosanitetski Pregled*. 2017;74(12):1134–9.

Prada I, Micó-Muñoz P, Giner-Lluesma T, Micó-Martínez P, Collado-Castellano N, Manzano-Saiz A. Influence of microbiology on endodontic failure. Literature review. *Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal*. 2019;24(3):364–72.

Quah SY, Wu S, Lui JN, Sum CP, Tan KS. N-acetylcysteine inhibits growth and eradicates biofilm of *Enterococcus faecalis*. *Journal of Endodontics*. 2012;38(1):81–5.

Rôças IN, Siqueira JF, Santos KRN. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *J Endod*. 2004;30(5):315–20.

Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1830(8):4117–29.

Signoretti FGC, Gomes BPFA, Montagner F, Barrichello TF, Jacinto RC. Influence of 2% chlorhexidine gel on calcium hydroxide ionic dissociation and its ability of reducing endotoxin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011;111(5):653–8.

Siqueira JF, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*. 1999;32:361–9.

Siqueira JR, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod*. 2008;34(11):1291–301.

Sjögren U, Figdor D, Spångberg L, Sundqvist G. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. *Int Endod J*. 1991;24:119–25.

Sundqvist G. Ecology of the root canal flora. *J Endod*. 1992;18(9):427–30.

Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10:213–9.

Tennert C, Fuhrmann M, Wittmer A, Karygianni L, Altenburger MJ, Pelz K, et al. New bacterial composition in primary and persistent/secondary endodontic infections with respect to clinical and radiographic findings. *J Endod*. 2014;40(5):670–7.

Ulusoy AT, Kalyoncuoglu E, Reis A, Cehreli ZC. Antibacterial effect of N-acetylcysteine and taurolidine on planktonic and biofilm forms of *Enterococcus faecalis*. *Dent Traumatol*. 2016;32:212–8.

Valera MC, Salvia ACRD, Maekawa LE, Camargo SEA, Carvalho CAT, Koga-Ito CY. Antimicrobial analysis of chlorhexidine gel and intracanal medications against microorganisms inoculated in root canals. *Minerva Stomatol*. 2010;59:415–21.

Veerdonk FLV, Netea MG, Invernizzi CA, Joosten LAB. Inflammasome activation and IL-1 β and IL-18 processing during infection. *Trends Immunol*. 2011;32(3):110–6.

Virdee SS, Bashir N, Camilleri J, Cooper PR, Tomson PL. Exploiting dentine matrix proteins in cell-free approaches for periradicular tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev*. 2022;28(4):707–32.

Wang JD, Humfa WR. Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentine. *Int Endod J*. 1988;21:17–26.

Zhao T, Liu Y. N-acetylcysteine inhibits biofilms produced by *Pseudomonas aeruginosa*. BMC Microbiol. 2010;10(1).