

# RESSALVA

Atendendo a solicitação do(a) autor(a), o texto completo desse trabalho será disponibilizado no repositório a partir de 26/02/2027.



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

**ALINE DE CASTRO SANTOS**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE MEDICAÇÕES INTRACANAL ASSOCIADAS  
AO HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE O PERFIL INFLAMATÓRIO EM  
INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS**

**ALINE DE CASTRO SANTOS**

**AVALIAÇÃO CLÍNICA DE MEDICAÇÕES INTRACANAL ASSOCIADAS AO  
HIDRÓXIDO DE CÁLCIO SOBRE O PERFIL INFLAMATÓRIO EM INFECÇÕES  
ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS**

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

2025

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).

Santos, Aline de Castro

Avaliação clínica de medicações intracanal associadas ao hidróxido de cálcio sobre o perfil inflamatório em infecções endodônticas primárias / Aline de Castro Santos. - São José dos Campos : [s.n.], 2025.  
93 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2025.

Orientador: Marcia Carneiro Valera.

1. Periodontite apical. 2. Hidróxido de cálcio. 3. N-acetilcisteína. 4. Citocinas. 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**

Este estudo clínico randomizado contribuirá de forma inovadora para a compreensão dos efeitos de diferentes medicações intracanal sobre mediadores inflamatórios, enzimas de remodelação tecidual e biomarcadores ósseos, fornecendo evidências diretas sobre sua influência na resolução da periodontite apical. Além de medicações intracanal convencionais, a inclusão da N-acetilcisteína (NAC), um antioxidante com potencial efeito anti-inflamatório, representa um avanço na busca por terapias intracanal mais eficazes.

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

This randomized clinical study will innovatively contribute to the understanding of the effects of different intracanal medications on inflammatory mediators, tissue remodeling enzymes, and bone biomarkers, providing direct evidence of their influence on the resolution of apical periodontitis. In addition to conventional intracanal medications, the inclusion of N-acetylcysteine (NAC), an antioxidant with potential anti-inflammatory effects, represents a breakthrough in the search for more effective intracanal therapies.

## **BANCA EXAMINADORA**

**Professora Titular Marcia Carneiro Valera** (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos, SP, Brasil

**Professora Dra. Rayana Duarte Khoury**

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos, SP, Brasil

**Professor Dr. Bruno das Neves Cavalcanti**

University of Michigan School of Dentistry

University of Michigan

Ann Arbor, MI, Estados Unidos

São José dos Campos, 26 de Fevereiro de 2025.

## *Dedicatória*

Dedico esse projeto primeiramente a Deus, sem Ele nada seria possível.

Dedico também aos meus pais: Maria Otilia Silva Santos e Jefferson Orlando de Castro Santos. Que sempre me apoiaram em minhas escolhas, ensinaram-me desde sempre o valor do conhecimento e estudo; fizeram muitos sacrifícios para que eu pudesse ter a melhor educação.

Minha mãe que tanto me inspirou, desde pequena lembro-me de ver estudando noites e madrugadas para seguir o seu sonho de se formar em uma universidade. Abdicou de muitos momentos para realizar este sonho. Mãe, você é meu espelho e inspiração.

À minha irmã: Bruna de Castro Santos, que sempre faz tudo ser mais leve! Você é parte dessa caminhada. Obrigada por sempre estar ao meu lado.

## *Agradecimentos*

Agradeço à Deus primeiramente, por me sustentar, me guiar e estar ao meu lado durante toda essa caminhada.

Agradeço aos meus pais e minha família, por me motivarem e sonharem meus sonhos comigo.

À minha orientadora, Professora Marcia Carneiro Valera, que acreditou no meu potencial desde o início da minha vida acadêmica, tendo me acolhido como aluna de iniciação científica e me incentivou a prestar o Mestrado. A senhora me motiva a sonhar mais alto e é inspiração por ser uma mulher que desde muito nova dedicou a sua vida a carreira acadêmica, dividindo conhecimento e ensinando a tantos alunos.

Agradeço aos meus amigos e colegas de pós-graduação: Beatriz Kowalski Fiamini, Camila Gobbi de Carvalho Barbosa, Carolina Fedel Gagliardi, Gustavo Guimarães Guerrero, Leila Paes, Letícia Ferreira e Rafael Ward. Sem vocês esse projeto não teria sido concluído. Vocês foram essenciais. Agradeço-os pela parceria, amizade e todos os momentos divididos juntos ao longo desses dois anos. Com certeza, sempre levarei muito de vocês comigo.

Ao Professor Bruno das Neves Cavalcanti, por ter aberto as portas para me receber na University of Michigan, e realizar a Capacitação no exterior. Agradeço ao Senhor também, por ter sido sempre muito solícito durante esse processo, acolhido a mim e a Carolina, ter nos ensinado tanto durante o pouco tempo em que ficamos em Ann Arbor. Professor, o senhor é inspiração, não só como profissional, mas também como pessoa. Obrigada por ter aceitado fazer parte da banca, tenho certeza de que contribuirá ainda mais com minha formação.

À Professora Rayana Duarte Khoury, sempre te falo que você é inspiração, pela sua calma, leveza e empatia que carrega consigo, não medindo esforços para ajudar

sempre que necessário. Obrigada pela paciência, prontidão e por encaixar seus horários para tirar minhas dúvidas. Admiro-te pela sua generosidade e sempre dividir seus conhecimentos conosco e te agradeço por ter aceitado fazer parte da banca; tenho certeza de que suas considerações serão enriquecedoras.

Ao meu namorado e melhor amigo, Cássio dos Santos Giovanini, que esteve comigo desde o início dessa caminhada, me motivando, me apoiando... feito dos momentos árdus, mais leves. Seu jeito calmo, cuidadoso, paciente e parceiro é o que mais admiro em você e que tenho como espelho.

As minhas amigas: Ana Beatriz Teodoro, Letícia Lança, Beatriz Sahadi e Carolina Fedel Gagliardi, que durante minha estadia no exterior foram família! Obrigada por tanto em tão pouco tempo meninas, vocês foram essenciais nessa etapa.

Aos meus amigos que tornaram a caminhada mais leve.

A Josi, Gabi e Evelyn pelo auxílio nos agendamentos de exame, atendimentos e por fazerem o trabalho de vocês sempre com tanto cuidado, carinho e dedicação. Vocês são incríveis.

A Liliane e Lucy, ex e atual secretárias do Departamento de Odontologia Restauradora, pela ajuda com os documentos de PAADES, estágios e dúvidas.

Ao Carlos Guedes, por sempre tirar minhas dúvidas, me atender e me auxiliar em todo o processo do envio a bolsa FAPESP.

Ao Professor Alexandre Luiz Souto Borges, por estar sempre disponível, atendendo as minhas dúvidas sobre as normas da pós-graduação ou quaisquer outros assuntos.

À CAPES pela concessão da bolsa em meu primeiro ano de mestrado. E em seguida pela bolsa de Capacitação no exterior.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado em meu segundo ano, e pelo financiamento deste projeto (Processo: 2023/16412-8 e 2022/09805-0).

À todos os funcionários do ICT que estão todos os dias trabalhando para o funcionamento de nossa universidade.

Aos pacientes que se comprometeram em participar dessa pesquisa e que confiaram em nosso atendimento. Sem vocês, esse projeto não seria concluído. Obrigada!

À todos que fizeram parte dessa jornada: Muito Obrigada!

"Faça, porque se você não fizer, em breve, o resto será silêncio."

Leandro Karnal

## RESUMO

Santos AC. Avaliação clínica de medicações intracanal associadas ao hidróxido de cálcio sobre o perfil inflamatório em infecções endodônticas primárias [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2025.

A terapia endodôntica visa controlar a infecção e modular a resposta inflamatória por meio da limpeza e modelagem dos canais radiculares, associadas ao uso de medicações intracanal (MICs). Este estudo clínico avaliou a ação da N-acetilcisteína (NAC) associada ao hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) como medicação intracanal, comparando sua eficácia com o  $\text{Ca(OH)}_2$  associado à solução salina. Foram selecionados dentes unirradiculares com infecção endodôntica primária e lesão periapical, submetidos ao preparo biomecânico com lima única reciprocante e irrigação com hipoclorito de sódio 2,5%. **Artigo 1:** Avaliou os níveis de perfil inflamatório inicial, correlacionando mediadores inflamatórios (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ), lipopolissacarídeos (LPS) e volume da lesão periapical com MMP-9. Foram realizadas tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC), para análise do volume da lesão periapical e a mensuração foi realizada através do software ITK-SNAP. A análise dos biomarcadores, foram realizadas a partir de coletas do fluido intersticial da região periapical (SF) e analisados através do ensaio de multiplex. Já para análise de LPS, foi realizada coleta do interior do canal radicular, que foi quantificado pelo ensaio cinético-cromogênico de amebócitos de limulus. Os dados foram analisados pelos testes estatísticos apropriados. Os achados indicaram uma associação direta entre esses biomarcadores, sugerindo o envolvimento ativo da MMP-9 no desenvolvimento da periodontite apical. Além disso, o estudo reforça a importância da MMP-9 no processo inflamatório periapical. **Artigo 2:** Este estudo avaliou níveis de citocinas (IL-4, IL-7 e TNF- $\alpha$ ) na região periapical, antes e após 14 dias do uso de medicações intracanal de  $\text{Ca(OH)}_2$  + solução salina, e  $\text{Ca(OH)}_2$  + NAC, através da coleta do fluido intersticial. A quantificação dos mediadores inflamatórios, foi realizada por teste de multiplex, e os dados foram submetidos aos testes estatísticos que revelou tendência à redução das citocinas após o uso das MICs ( $p>0,05$ ), exceto pela IL-17, que apresentou aumento no grupo tratado com  $\text{Ca(OH)}_2$  + NAC. **Artigo 3:** Quantificou marcadores ósseos (osteoprotegerina, esclerostina e RANKL) e metaloproteinases de matriz (MMP-8 e MMP-13) antes e após as MICs de  $\text{Ca(OH)}_2$  + solução salina e  $\text{Ca(OH)}_2$  + NAC. Observou-se redução significativa de MMP-8 e MMP-13 no grupo  $\text{Ca(OH)}_2$  + soro ( $p<0,05$ ), enquanto os marcadores ósseos não demonstraram variação significativa. Os achados desses estudos contribuem para a compreensão do papel das metaloproteinases e citocinas na periodontite apical e reforçam a necessidade de investigações adicionais para validar o impacto da NAC na resposta inflamatória e no metabolismo ósseo periapical.

Palavras-chave: Periodontite apical; hidróxido de cálcio; N-acetilcisteína; citocinas.

## ABSTRACT

Santos AC. Clinical evaluation of intracanal medications associated with calcium hydroxide on the inflammatory profile in primary endodontic infections [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2025.

Endodontic therapy aims to control infection and modulate the inflammatory response through root canal cleaning and shaping, combined with the use of intracanal medications (ICMs). This clinical study evaluated the action of N-acetylcysteine (NAC) associated with calcium hydroxide [ $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ] as an intracanal medication, comparing its efficacy with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  combined with saline solution. Single-rooted teeth with primary endodontic infection and periapical lesions were selected and subjected to biomechanical preparation using a single reciprocating file and irrigation with 2.5% sodium hypochlorite. **Article 1:** Evaluated initial inflammatory profile levels, correlating inflammatory mediators (IL-6, IL-1 $\beta$ , and TNF- $\alpha$ ), lipopolysaccharides (LPS), and periapical lesion volume with MMP-9. Cone-beam computed tomography (CBCT) was performed to analyze the periapical lesion volume, and the measurement was conducted using ITK-SNAP software. Biomarker analysis was performed from interstitial fluid (SF) collections from the periapical region and analyzed through a multiplex assay. Additionally, for LPS analysis, samples were collected from the root canal and quantified using the kinetic chromogenic limulus amebocyte lysate assay. The data were analyzed using appropriate statistical tests. The findings indicated a direct association between these biomarkers, suggesting the active involvement of MMP-9 in the development of apical periodontitis. Furthermore, the study reinforces the importance of MMP-9 in the periapical inflammatory process. **Article 2:** This study evaluated cytokine levels (IL-4, IL-17, and TNF- $\alpha$ ) in the periapical region before and after 14 days of intracanal medication with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + saline solution and  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + NAC through interstitial fluid collection. The quantification of inflammatory mediators was performed using a multiplex assay, and the data were subjected to statistical tests, revealing a tendency for cytokine reduction after the use of ICMs ( $p > 0.05$ ), except for IL-17, which showed an increase in the group treated with  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + NAC. **Article 3:** Quantified bone markers (osteoprotegerin, sclerostin, and RANKL) and matrix metalloproteinases (MMP-8 and MMP-13) before and after ICMs of  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + saline solution and  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + NAC. A significant reduction in MMP-8 and MMP-13 was observed in the  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  + saline group ( $p < 0.05$ ), while bone markers did not show significant variation. The findings from these studies contribute to the understanding of the role of metalloproteinases and cytokines in apical periodontitis and highlight the need for further investigations to validate the impact of NAC on the inflammatory response and periapical bone metabolism.

**Keywords:** Apical periodontitis; Calcium hydroxide; N-acetylcysteine; cytokines.

## SUMÁRIO

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |           |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1 INTRODUÇÃO .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | <b>13</b> |
| <b>2 ARTIGOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | <b>18</b> |
| 2.1 Artigo 1 – Santos AC, Barbosa CGC, Gagliardi CF, Guerrero GG, Fiamini BK, Khoury RD, Valera MC. MMP-9 e sua influência no desenvolvimento da lesão periapical a partir da interação com citocinas inflamatórias e endotoxina / .....                                                                                                           | <b>18</b> |
| 2.2 Artigo 2 – Santos AC, Barbosa CGC, Gagliardi CF, Guerrero GG, Fiamini BK, Khoury RD, Valera MC. Medicações intracanal sobre o perfil inflamatório na periodontite apical primária: um estudo clínico randomizado / <i>Intracanal Medication on the inflammatory profile in primary apical periodontitis: A randomized clinical trial</i> ..... | <b>36</b> |
| 2.3 Artigo 3 – Santos AC, Barbosa CGC, Gagliardi CF, Guerrero GG, Fiamini BK, Khoury RD, Valera MC. ....                                                                                                                                                                                                                                           | <b>55</b> |
| <b>3 CONSIDERAÇÕES GERAIS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>72</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            | <b>74</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <b>82</b> |

## 1 INTRODUÇÃO

O tecido pulpar possui diversas funções importantes para a manutenção da saúde dental, como resposta imune e formação de dentina, que ocorre frente a agressões, como contaminação dos canais por bactérias, por lesões de cárie, infiltrações de restaurações, trincas ou até mesmo pelo periodonto e corrente sanguínea (Tennert et al., 2014). Uma vez que o sistema de canais radiculares estando contaminado, isso levará a uma série de eventos inflamatórios na região apical e periapical que resultará em uma lesão periapical (Nair, 1997).

A lesão periapical advém dessa inflamação que ocorre após a invasão bacteriana nos canais necrosados, onde há uma diversidade de microrganismos presentes, com espécies Gram-negativas e Gram-positivas (Machado et al., 2020). O ácido lipoteicoico (LTA) compõe a parede celular das bactérias Gram-positivas, e possui importante papel na resposta tecidual crônica após a bacteriólise (Barbosa-Ribeiro et al., 2016). Já a parede celular das espécies Gram-negativas é composta por lipopolissacarídeos (LPS) que são endotoxinas capazes de induzir resposta inflamatória exacerbada do hospedeiro quando da sua reprodução ou morte celular (Liu et al., 2019). O LPS, é reconhecido no organismo através de receptores de reconhecimento padrão, Toll-like (TLR) (Akira et al., 2001), e a partir desses estímulos ativam o sistema complemento, onde a via C5a é quimiotática e atrai células imune, além de induzir a secreção de interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) (Zou et al., 2021).

O TNF- $\alpha$  está associado a reabsorção óssea, onde este é capaz de recrutar osteoclastos e promover sua ativação e diferenciação (Gravallese et al., 2000; Takayanagi et al., 2000). Para ser ativado, o TNF- $\alpha$  requer a ativação da via do Fator Nuclear KappaB ligante (RANKL), onde a partir desse receptor proteínas são ativadas e vão se traduzir na ativação dos osteoclastos em que é então, iniciado o processo de reabsorção óssea (Iotsova et al., 1997). Zhang et al. mostraram que RANKL e TNF associados, induzem a expressão de determinados genes que aceleram acentuadamente esse processo (Zhang et al., 2001).

Para resolução desse processo, é indicado o tratamento endodôntico, e o preparo biomecânico do canal radicular é uma etapa essencial deste, cujo objetivo é a remoção completa do tecido pulpar, microrganismos e dentina infectada, além da modelagem do sistema de canais radiculares através da ação mecânica de instrumentos endodônticos e ação química de soluções auxiliares, fornecendo condições adequadas para o selamento da cavidade pulpar e reparo dos tecidos periapicais (Versiani et al., 2018).

Dessa forma, embora a instrumentação reduza a quantidade de bactérias do canal (Hulsmann et al., 2005), é indicado uso de substâncias químicas irrigadoras que apresentem ação antimicrobiana (Haapasalo et al., 2010), para auxílio na limpeza e eliminação de microrganismos presentes no interior do sistemas de canais radiculares (Ferreira et al., 2015).

O hipoclorito de sódio é a solução irrigadora amplamente indicada para uso na terapia endodôntica, a qual apresenta atuação na dissolução de tecidos e atividade antimicrobiana (Haapasalo et al., 2010). A fim de intensificar esse processo antibacteriano, visto que apesar de reduzir significativamente os microrganismos presentes, a etapa do preparo biomecânico não elimina completamente os microrganismos do interior do canal, é indicada a utilização de medicação intracanal (MIC), entre as consultas (Cavalli et al., 2017; Ferreira et al., 2015). A MIC age contra os microrganismos presentes nas áreas onde os instrumentos não conseguem atuar, como reentrâncias, istmos, canais acessórios e túbulos dentinários, bem como modular a inflamação periapical (Barbosa-Ribeiro et al., 2019; Martinho et al., 2015).

O hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$  é uma medicação intracanal, que tem sua atividade antimicrobiana pela dissociação dos íons  $Ca^{2+}$  e  $OH^-$ , em que os íons hidroxila apresentam alta reatividade (Mohammadi, Dummer, 2011). Além disso, há evidência da efetividade dessa medicação também sobre as endotoxinas e a diminuição na diferenciação de osteoclastos (Silva et al., 2002), como também da diminuição de citocinas inflamatórias como  $TNF-\alpha$  e  $IL-1\beta$ , e de metaloproteinases (MMPs) (Barbosa-Ribeiro et al., 2019).

Há evidência de que mesmo após a medicação intracanal de hidróxido de cálcio, alguns microrganismos são capazes de resistir, como *Enterococcus faecalis* (um

dos microrganismos mais associados a infecções endodônticas persistentes (Lima et al., 2015; Najafi et al., 2020). Para ampliar o espectro de ação, a clorexidina (CHX) tem sido associada ao hidróxido de cálcio (Zancan et al., 2019).

A N-acetilcisteína (NAC), também foi proposta como um potencial agente terapêutico alternativo no tratamento endodôntico (Karapinar et al., 2016), a fim de atuar sobre comunidade bacterianas organizadas em biofilme que mostra ser importante fator de virulência para a infecção endodôntica (Ferreira et al., 2015; Rabin et al., 2015). Essa substância química é derivada da cisteína que apresenta atividade antioxidante pela presença do grupo tiol (Samuni et al., 2013) e que estimula a síntese de GSH, atuando na desintoxicação, eliminação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (Cacciatore et al., 2010) e combate radicais livres usando a interação com radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, pois é uma fonte de grupo sulfidril nas células (Dinicola et al., 2014). Além disso, a NAC mostrou em estudos *in vitro* que pode desorganizar completamente biofilmes polimicrobianos endodônticos (Choi et al., 2018; Moon et al., 2016) e que na associação a outros antimicrobianos, tem maior espectro de ação, penetrando em camadas mais profundas do biofilme (Dinicola et al., 2014). Em outro estudo *in vitro*, essa substância foi capaz de atuar contra *E. faecalis* e *S. mutans*, onde foi utilizada como irrigante (Bhasin et al., 2019).

Ainda a N-acetilcisteína, mostrou importante papel como medicação intracanal, atuando no aumento da expressão de mediadores lipídicos como Resolvinas, que possuem atividade pró-resolução do processo inflamatório (Corazza et al., 2020). Foi capaz de atuar sobre citocinas presentes no processo inflamatório, onde observou-se diminuição da expressão de interleucina-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e fator de crescimento transformador (TGF- $\beta$ ) em macrófagos (Karapinar et al., 2016). Essas citocinas favorecem a progressão do processo inflamatório, onde o TNF- $\alpha$  atua como ativador de RANKL e osteoprotegerina (OPG). A regulação da remodelação óssea normal e patológica ocorre quando RANKL se liga ao receptor RANK, que está presente na membrana celular de precursores de osteoclastos. Já OPG, é responsável pela proteção óssea à reabsorção excessiva (Boyce, Xing, 2008).

Frente a condição de inflamação outra citocina responsável pelo recrutamento de células para combater a infecção, é a IL-17, que recruta neutrófilos pela liberação de peptídeos antimicrobianos e quimiocinas (Chung et al., 2009). São capazes ainda

de recrutar linfócitos e auxilia a expressão de algumas citocinas que leva a progressão da inflamação apical (Monin, Gaffen, 2018). Além disso, em um estudo *in vitro*, essa citocina mostrou ser capaz de aumentar a produção de RANKL (Duka et al., 2019). Outra interleucina envolvida nesse processo é a IL-4, que é uma citocina anti-inflamatória capaz de inibir de maneira seletiva a sinalização do TNF e de bloquear vias que vão ativar o receptor RANK que resulta na interrupção da diferenciação de osteoclastos. Ainda a IL-4 tem atuação sobre a expressão de IL-1 e osteoprotegerina (OPG), regulando a reabsorção óssea (Freire et al., 2021; Palmqvist et al., 2006).

A OPG compete pelo sítio de ligação RANK com RANKL, e quando está em maior nível no tecido, há diminuição da progressão da lesão periapical regulando assim, a reabsorção óssea (Cavalla et al., 2021; Estrela et al., 2016). Ademais também mostrou importante papel no sistema imune, tendo aumentado a produção de células responsáveis pela defesa do organismo, quando da sua diminuição no meio (Kimura et al., 2020). A via de sinalização Wingless (Wnt) é outra via que atua sobre o mecanismo ósseo, estimulando células mesenquimais para que se diferenciem em osteoblastos (Delgado-Calle et al., 2017), participando da remodelação, desenvolvimento e homeostase óssea (Kramer et al., 2010). Uma glicoproteína que é antagonista dessa via, expressa pelo gene *Sost*, é a esclerostina (Brunkow et al., 2001). A esclerostina é uma proteína produzida por osteócitos que regula a remodelação óssea, inibindo a formação óssea e promovendo a reabsorção óssea; a via de sinalização da Wnt/b-catenina pode sofrer inibição por algumas moléculas como a SOST e impedir a ligação da proteína Wnt com seus receptores, suprimindo a osteogênese (Omran et al., 2022).

É importante ressaltar que RANKL é um fator necessário em lesões ósseas independentemente do processo inflamatório e que a maioria das citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , parecem agir indiretamente facilitando sua expressão (Spelling et al., 2008). Portanto, uma vez que MMPs são liberadas em presença de bactérias e fatores de virulência bacteriano (Sorsa et al., 2016), células do periodonto são estimuladas por mediadores inflamatórios como IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  (Cox et al., 2006).

O aumento dessas citocinas no meio, está associada à progressão da lesão periapical, onde estas podem ativar enzimas que são capazes de degradar matriz

extracelular na região dos tecidos periapicais. Essas enzimas são conhecidas como metaloproteinases (MMPs) (Page-McCaw et al., 2007; Paula-Silva et al., 2010). As MMPs são subdivididas em collagenases, gelatinases, estromelisinases e outros tipos; as collagenases, em específico a MMP-8 e MMP-13, são responsáveis principalmente pela degradação de colágenos fibrilares dos tipos I, II e III (Tsubota et al., 2002). Em um estudo conduzido em ratos por Matsui et al., em 2011, o aumento da expressão de MMP-8 nos tecidos periapicais, foi observado após uma semana de exposição pulpar, enquanto a expressão de MMP-13 aumentou após 2 semanas, o que corrobora com os achados de Wahlgren et al. em 2002, que relatou grande quantidade de MMP-8 na polpa inflamada (Matsui et al., 2011).

Ainda outra metaloproteinase envolvida, é a MMP-9, a mais investigada dentre todas e que participa de diversos processos biológicos, clivando muitas proteínas da matriz extracelular (Huang, 2018). A liberação dessa metaloproteinase no meio está ligada à presença de bactérias, a qual frente a lipopolissacarídeos (LPS), parece ter sua produção aumentada em mastócitos (Tanaka et al., 2001). Há evidência de que as células mononucleares são as principais responsáveis pela expressão de MMPs (Paula-Silva et al., 2010). Ainda, em lesões periapicais a MMP-9 também foi expressa por macrófagos e linfócitos (Carneiro et al., 2009). Em outros tecidos, sua expressão é induzida a partir de LPS no meio, que é capaz de intensificar a inflamação (DeLeon-Pennell et al., 2014; Yang et al., 2019) e na periodontite apical a presença de bactérias Gram-negativas e MMP-9 estão relacionadas a aumento da dor (Ahmed et al., 2013).

A destruição óssea causada a partir dos processos acima supracitados, se resulta em uma área radiolúcida ao redor do ápice radicular (Bender, 1997). Contudo, o tamanho real dessa lesão é dada através da utilização da tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) e que segundo as recomendações da AAE (American Association of Endodontics), a utilização deste exame é necessária para análise da real presença da lesão periapical. Dessa forma, para avaliação da presença e volume desta, foi realizada TCFC previamente aos procedimentos clínicos.

Isso posto, o presente estudo propôs avaliar clinicamente a ação de diferentes medicações intracanais à base de hidróxido de cálcio sobre a inflamação periapical em dentes com infecção endodôntica primária, além das relações entre os mediadores da inflamação (MMP-9, LPS, IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e volume de lesão.

### 3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os achados deste estudo demonstram uma correlação significativa entre a MMP-9, endotoxinas bacterianas, citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ ) e o volume da lesão periapical, reforçando o papel central das metaloproteinases na progressão da doença (de Paula e Silva et al., 2020). A ativação do sistema imune pelo LPS bacteriano leva à produção exacerbada dessas moléculas inflamatórias, promovendo um ambiente propício para a degradação da matriz extracelular e a reabsorção óssea (Liu et al., 2019).

A relação entre MMP-9 e periodontite apical, no entanto, ainda apresenta aspectos controversos. Enquanto alguns estudos sugerem que a MMP-9 atua predominantemente na destruição tecidual e progressão da doença (Barreiros et al., 2018; Carneiro et al., 2009; Francio et al., 2023), outros indicam um possível papel regulador dessa enzima na resposta inflamatória, limitando a produção de citocinas pró-inflamatórias e reduzindo a reabsorção óssea em certas condições (Zhang et al., 2019). Essas divergências ressaltam a necessidade de investigações adicionais para esclarecer os mecanismos pelos quais a MMP-9 influencia a resposta imune e a remodelação óssea.

Outro aspecto relevante identificado neste estudo é a correlação positiva entre MMP-9 e IL-6, que tem um papel dual na periodontite apical, podendo tanto contribuir para a inflamação quanto exercer um efeito modulador na reabsorção óssea (Azuma et al., 2014). Além disso, a IL-6 e a IL-1 $\beta$  têm sido associadas à superexpressão em tecidos periapicais, possivelmente devido a mecanismos epigenéticos, como a hipometilação do DNA (Adeodato et al., 2023). Essa inter-relação entre citocinas e MMPs reforça a hipótese de que a degradação tecidual ocorre por um mecanismo em cascata, onde diferentes moléculas interagem e amplificam o processo inflamatório (Cox et al., 2006).

No contexto da reabsorção óssea, sabe-se que as MMPs participam ativamente do processo, degradando o colágeno e a matriz extracelular expostos após a ação dos osteoclastos em meio ácido (Radzki et al., 2024). Especificamente, a MMP-9 tem sido associada à remodelação óssea, sendo expressa por osteoclastos e

influenciando diretamente a extensão da reabsorção óssea em lesões periapicais (Okada et al., 1995; Lu & Rabie, 2006). Esses achados corroboram os dados deste estudo, que demonstraram uma associação direta entre a MMP-9 e o volume da lesão periapical.

Apesar dos avanços na compreensão dos mecanismos inflamatórios da periodontite apical, muitos desafios ainda persistem. A variabilidade na expressão de mediadores inflamatórios e enzimas de degradação da matriz dificulta a padronização de estratégias terapêuticas e ressalta a necessidade de biomarcadores preditivos para guiar a conduta clínica. Além disso, a identificação de possíveis alvos terapêuticos, como inibidores seletivos de MMPs ou moduladores da resposta imune, pode representar um avanço significativo na preservação dos tecidos periapicais.

Diante desse cenário, este estudo contribui para o entendimento da periodontite apical ao evidenciar a inter-relação entre MMP-9, endotoxinas bacterianas e citocinas pró-inflamatórias. No entanto, mais estudos são necessários para aprofundar a compreensão desses mecanismos e avaliar potenciais intervenções terapêuticas. O avanço nas pesquisas pode levar ao desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o manejo da periodontite apical, minimizando a destruição tecidual e melhorando os desfechos clínicos dos pacientes.

## REFERÊNCIAS

Ahmed GM, El-Baz AA, Hashem AAR, Shalaan AK. Expression levels of matrix metalloproteinase-9 and gram-negative bacteria in symptomatic and asymptomatic periapical lesions. *J Endod*. 2013;39(4):444–8. doi: 10.1016/J.JOEN.2012.11.009.

Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: Critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2001; 2(8):675-680. doi: 10.1038/90609.

Barbosa-Ribeiro M, Arruda-Vasconcelos R, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, de Almeida JFA, et al. Effectiveness of calcium hydroxide-based intracanal medication on infectious/inflammatory contents in teeth with post-treatment apical periodontitis. *Clin Oral Investig*. 2019;23(6):2759–66. doi: 10.1007/s00784-018-2719-0.

Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CCR, Almeida JFA, Gomes BPFA. Quantification of Lipoteichoic Acid Contents and Cultivable Bacteria at the Different Phases of the Endodontic Retreatment. *J Endod*. 2016;42(4):552–6. doi: 10.1016/J.JOEN.2016.01.002.

Bender IB. Factors influencing the radiographic appearance of bony lesions. *J Endod*. 1997;23(1):5–14. doi: 10.1016/S0099-2399(97)80199-9.

Bhasin P, Sharma M, Bindal D, Tomar D, Sarin A, Sharma N. An In Vitro Evaluation of Antimicrobial Effects of Three Different Root Canal Irrigating Solutions against *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus mutans*. *J Contemp Dent Pract*. 2019;20(2):221–5. doi: 10.5005/jp-journals-10024-2501.

Boyce BF, Xing L. Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling. *Arch Biochem Biophys*. 2008;473(2):139–46. doi: 10.1016/J.ABB.2008.03.018.

Brunkow ME, Gardner JC, Van Ness J, Paeper BW, Kovacevich BR, Proll S, et al. Bone dysplasia sclerosteosis results from loss of the SOST gene product, a novel cystine knot-containing protein. *Am J Hum Genet*. 2001;68(3):577–89. doi: 10.1086/318811.

Cacciatore I, Cornacchia C, Pinnen F, Mollica A, Di Stefano A. Prodrug approach for increasing cellular glutathione levels. *Molecules*. 2010; doi: 10.3390/molecules15031242.

Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Monteiro Bramante C, Figueira R, et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009;107(1):127–32. doi: 10.1016/J.TRIPLEO.2008.07.030.

Cavalla F, Letra A, Silva RM, Garlet GP. Determinants of Periodontal/Periapical Lesion Stability and Progression. *J Dent Res*. 2021;100(1):29–36. doi: 10.1177/0022034520952341.

Cavalli D, Toia CC, Flores Orozco EI, Khoury RD, Cardoso FG da R, 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. doi: 10.1016/J.JOEN.2017.03.032.

Choi YS, Kim C, Moon JH, Lee JY. Removal and killing of multispecies endodontic biofilms by N-acetylcysteine. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2018;49(1):184–8. doi: 10.1016/j.bjm.2017.04.003.

Chung Y, Chang SH, Martinez GJ, Yang XO, Nurieva R, Kang HS, et al. Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling. *Immunity*. 2009;30(4):576–87. doi: 10.1016/J.IMMUNI.2009.02.007.

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*. 2020;iej.13403. doi: 10.1111/iej.13403.

Cox SW, Eley BM, Kiili M, Asikainen A, Tervahartiala T, Sorsa T. Collagen degradation by interleukin-1beta-stimulated gingival fibroblasts is accompanied by release and activation of multiple matrix metalloproteinases and cysteine proteinases. *Oral Dis*. 2006;12(1):34–40. doi: 10.1111/J.1601-0825.2005.01153.X.

DeLeon-Pennell KY, de Castro Brás LE, Iyer RP, Bratton DR, Jin YF, Ripplinger CM, et al. *P. gingivalis* lipopolysaccharide intensifies inflammation post-myocardial

infarction through matrix metalloproteinase-9. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;76:218–26. doi: 10.1016/J.YJMCC.2014.09.007.

Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. *Bone.* 2017;96:29–37. doi: 10.1016/J.BONE.2016.10.007.

Dinicola S, De Grazia S, Carlomagno G, Pintucci JP. N-acetylcysteine as powerful molecule to destroy bacterial biofilms. A systematic review. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2014;18(19):2942–8. doi: 10.1111/j.1440-1584.2011.01213.x.

Duka M, Eraković M, Dolićanin Z, Stefanović D, Čolić M. Production of Soluble Receptor Activator of Nuclear Factor Kappa-B Ligand and Osteoprotegerin by Apical Periodontitis Cells in Culture and Their Modulation by Cytokines. *Mediators Inflamm.* 2019;2019. doi: 10.1155/2019/8325380.

Estrela C, Decurcio DDA, Silva JA, Batista AC, De Souza Lima NC, De Freitas Silva BS, et al. Immune-inflammatory cell profile and receptor activator of nuclear factor kappa B ligand/osteoprotegerin expression in persistent apical periodontitis after root canal retreatment failure. *J Endod.* 2016;42(3):439–46. doi: 10.1016/j.joen.2015.11.012.

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. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031.

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. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.031.

Freire MS, Oliveira NG, Lima SMF, Porto WF, Martins DCM, Silva ON, et al. IL-4 absence triggers distinct pathways in apical periodontitis development. *J Proteomics.* 2021;233. doi: 10.1016/J.JPROT.2020.104080.

Gravallese EM, Manning C, Tsay A, Naito A, Pan C, Amento E, et al. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* 2000;43(2):250–8. doi: 10.1002/1529-0131(200002)43:2<250::AID-ANR3>3.0.CO;2-P.

Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y. Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am*. 2010;54(2):291–312. doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001.

Huang H. Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) as a Cancer Biomarker and MMP-9 Biosensors: Recent Advances. *Sensors (Basel)*. 2018;18(10). doi: 10.3390/S18103249.

Hulsmann M, Peters OA, Dummer PMH. Mechanical preparation of root canals: shaping goals, techniques and means. *Endod Topics*. 2005;10(1):30–76. doi: 10.1111/j.1601-1546.2005.00152.x.

Iotsova V, Caamaño J, Loy J, Yang Y, Lewin A, Bravo R. Osteopetrosis in mice lacking NF-kappaB1 and NF-kappaB2. *Nat Med*. 1997;3(11):1285–9. doi: 10.1038/NM1197-1285.

Karapinar SP, Ulu YZA, Ozcelik B, Buzoglu HD, Ceyhan D, Peynircioglu BB, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol*. 2016;68:48–54. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.03.017.

Karapinar SP, Ulu YZA, Ozcelik B, Buzoglu HD, Ceyhan D, Peynircioglu BB, et al. The effect of N-acetylcysteine and calcium hydroxide on TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$ 1 in lipopolysaccharide-activated macrophages. *Arch Oral Biol*. 2016;68:48–54. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.03.017.

Kimura S, Nakamura Y, Kobayashi N, Shiroguchi K, Kawakami E, Mutoh M, et al. Osteoprotegerin-dependent M cell self-regulation balances gut infection and immunity. *Nat Commun*. 2020;11(1). doi: 10.1038/S41467-019-13883-Y.

Kramer I, Halleux C, Keller H, Pegurri M, Gooi JH, Weber PB, et al. Osteocyte Wnt/beta-catenin signaling is required for normal bone homeostasis. *Mol Cell Biol*. 2010;30(12):3071–85. doi: 10.1128/MCB.01428-09.

Lima SMDF, Sousa MGDC, Freire MDS, Almeida JA De, Cantuária APDC, Silva TAME, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *J Endod*. 2015;41(7):1061–5. doi: 10.1016/J.JOEN.2015.02.016.

Liu M, Mu H, Peng W, Zhao L, Hu W, Jiang Z, et al. Time-dependent C5a and C5aR expression in dental pulp cells following stimulation with LTA and LPS. *Int J Mol Med*. 2019;44(3):823. doi: 10.3892/IJMM.2019.4246.

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. doi: 10.1007/S00784-019-03191-6.

Martinho FC, Nascimento GG, Leite FRM, Gomes APM, Freitas LF, Camões 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. doi: 10.1016/J.JOEN.2014.09.028.

Matsui H, Yamasaki M, Nakata K, Amano K, Nakamura H. Expression of MMP-8 and MMP-13 in the development of periradicular lesions. *Int Endod J*. 2011;44(8):739–45. doi: 10.1111/J.1365-2591.2011.01880.X.

Mohammadi Z, Dummer PMH. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J*. 2011;44(8):697–730. doi: 10.1111/J.1365-2591.2011.01886.X.

Monin L, Gaffen SL. Interleukin 17 Family Cytokines: Signaling Mechanisms, Biological Activities, and Therapeutic Implications. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018;10(4). doi: 10.1101/CSHPERSPECT.A028522.

Moon JH, Choi YS, Lee HW, Heo JS, Chang SW, Lee JY. Antibacterial effects of N-acetylcysteine against endodontic pathogens. *Journal of Microbiology*. 2016;54(4):322–9. doi: 10.1007/s12275-016-5534-9.

Nair PNR. Apical periodontitis: a dynamic encounter between root canal infection and host response. *Periodontol* 2000. 1997;13:121–48. doi: 10.1111/j.1600-0757.1997.tb00098.x.

Najafi K, Ganbarov K, Gholizadeh P, Tanomand A, Rezaee MA, Mahmood SS, et al. Oral cavity infection by *Enterococcus faecalis*: virulence factors and pathogenesis.

Reviews and Research in Medical Microbiology. 2020;31(2):51–60. doi: 10.1097/MRM.000000000000168.

Omran A, Atanasova D, Landgren F, Magnusson P. Sclerostin: From Molecule to Clinical Biomarker. *Int J Mol Sci.* 2022;23(9). doi: 10.3390/IJMS23094751.

Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221–33. doi: 10.1038/NRM2125.

Palmqvist P, Lundberg P, Persson E, Johansson A, Lundgren I, Lie A, et al. Inhibition of hormone and cytokine-stimulated osteoclastogenesis and bone resorption by interleukin-4 and interleukin-13 is associated with increased osteoprotegerin and decreased RANKL and RANK in a STAT6-dependent pathway. *Journal of Biological Chemistry.* 2006;281(5):2414–29. doi: 10.1074/jbc.M510160200.

Paula-Silva FWG, da Silva LAB, Kapila YL. Matrix Metalloproteinase Expression in Teeth with Apical Periodontitis Is Differentially Modulated by the Modality of Root Canal Treatment. *J Endod.* 2010;36(2):231–7. doi: 10.1016/J.JOEN.2009.10.030.

Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem.* 2015;7(4):493–512. doi: 10.4155/FMC.15.6.

Samuni Y, Goldstein S, Dean OM, Berk M. The chemistry and biological activities of N-acetylcysteine. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1830(8):4117–29. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.016.

Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of Calcium Hydroxide on Bacterial Endotoxin In Vivo. *J Endod.* 2002;28(2):94–8. doi: 10.1097/00004770-200202000-00011.

Sorsa T, Gursoy UK, Nwhator S, Hernandez M, Tervahartiala T, Leppilahti J, et al. Analysis of matrix metalloproteinases, especially MMP-8, in gingival crevicular fluid, mouthrinse and saliva for monitoring periodontal diseases. *Periodontol* 2000. 2016;70(1):142–63. doi: 10.1111/PRD.12101.

Spelling P, Bonfa E, Caparbo VF, Pereira RMR. Osteoprotegerin/RANKL system imbalance in active polyarticular-onset juvenile idiopathic arthritis: a bone damage

biomarker? Scand J Rheumatol. 2008;37(6):439–44. doi: 10.1080/03009740802116224.

Takayanagi H, Iizuka H, Juji T, Nakagawa T, Yamamoto A, Miyazaki T, et al. Involvement of receptor activator of nuclear factor  $\kappa$ B ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 2000;43(2):259–69. doi: 10.1002/1529-0131(200002)43:2<259::AID-ANR4>3.0.CO;2-W.

Tanaka A, Yamane Y, Matsuda H. Mast cell MMP-9 production enhanced by bacterial lipopolysaccharide. *J Vet Med Sci.* 2001;63(7):811–3. doi: 10.1292/JVMS.63.811.

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. doi: 10.1016/J.JOEN.2013.10.005.

Tsubota M, Sasano Y, Takahashi I, Kagayama M, Shimauchi H. Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in Rat Periodontium during Tooth Eruption. *J Dent Res.* 2002;81(10):673–8. doi: 10.1177/154405910208101004/ASSET/IMAGES/LARGE/10.1177\_154405910208101004-FIG3.JPEG.

Versiani MA, Carvalho KKT, Mazzi-Chaves JF, Sousa-Neto MD. Micro-computed Tomographic Evaluation of the Shaping Ability of XP-endo Shaper, iRaCe, and EdgeFile Systems in Long Oval-shaped Canals. *J Endod.* 2018;44(3):489–95. doi: 10.1016/j.joen.2017.09.008.

Yang CC, Lin CC, Hsiao L Der, Kuo JM, Tseng HC, Yang CM. Lipopolysaccharide-Induced Matrix Metalloproteinase-9 Expression Associated with Cell Migration in Rat Brain Astrocytes. *Int J Mol Sci.* 2019;21(1). doi: 10.3390/IJMS21010259.

Zancan RF, Calefi PHS, Borges MMB, Lopes MRM, de Andrade FB, Vivan RR, et al. Antimicrobial activity of intracanal medications against both *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans* biofilm. *Microsc Res Tech.* 2019;82(5):494–500. doi: 10.1002/JEMT.23192.

Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM, Mukherjee A, Abu-Amer Y. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways. *J Biol Chem*. 2001;276(1):563–8. doi: 10.1074/JBC.M008198200.

Zou Z, Bhandari J, Xiao B, Liang X, Zhang Y, Yan G. Effect of using diode laser on *Enterococcus faecalis* and its lipoteichoic acid (LTA) in chronic apical periodontitis. *Lasers Med Sci*. 2021;36(5):1059–66. doi: 10.1007/S10103-020-03146-4.