



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

ESTEBAN ISAI FLORES OROZCO

**REDUÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS,
LIPOPOLISSACARÍDEOS E COLAGENASE/MMP-8 NO
TRATAMENTO ENDODÔNTICO ASSOCIADO À ATIVAÇÃO
ULTRASSÔNICA NA INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA:
estudo clínico randomizado**

ESTEBAN ISAI FLORES OROZCO

**REDUÇÃO DE BACTÉRIAS CULTIVÁVEIS,
LIPOPOLISSACARÍDEOS E COLAGENASE/MMP-8 NO
TRATAMENTO ENDODÔNTICO ASSOCIADO À ATIVAÇÃO
ULTRASSÔNICA NA INFECÇÃO ENDODÔNTICA PRIMÁRIA:
estudo clínico randomizado**

Tese 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 DOUTOR, pelo Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA RESTAURADORA.

Área de Endodontia. Linha de pesquisa: Ativação Ultrassônica na Endodontia.

Orientadora: Profa. Tit. Marcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2019

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2020]. 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).

Flores Orozco, Esteban Isai

Redução de bactérias cultiváveis, lipopolissacarídeos e colagenase/mmp-8 no tratamento endodôntico associado à ativação ultrassônica na infecção endodôntica primária: estudo clínico randomizado / Esteban Isai Flores Orozco. - São José dos Campos : [s.n.], 2019.
67 f.

Tese (Doutorado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação em Odontologia Restauradora - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2019.
Orientador: Marcia Carneiro Valera.

1. Endotoxinas. 2. Infecção endodôntica. 3. Irrigação ultrassônica. 4. Lesão periapical. 5. MMP-8. I. Carneiro Valera, Marcia, 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.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Márcia Carneiro Valera (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Flávia Goulart da Rosa Cardoso

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Associado Eduardo Bresciani

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Associado José Flávio Affonso de Almeida

Universidade Estadual de Campinas(Unicamp)

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Prof. Adjunto Daniel Rodrigo Herrera Morante

Universidade Federal Fluminense

Faculdade de Odontologia

São José dos Campos, 04 de dezembro do 2019.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus mestres,
e aos futuros endodontistas,
por fazerem da área,
minha grande paixão.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Titular **Marcia Carneiro Valera Garakis** por sempre ser paciente comigo, por me brindar a oportunidade de formar-me no profissional que eu sou hoje. Por sempre ser tão rígida comigo, eu agradeço toda a sabedoria que nesses anos próximos dela eu adquiri. Com certeza essa nossa história vai ser contada por muito tempo além.

Agradeço ao **Instituto de Ciência e Tecnologia – Universidade Estadual Paulista** na linda cidade São José dos Campos, seu **corpo docente, direção e administração** por me abrir as portas e me brindar um espaço de aprendizagem e produção científica. Estou orgulhoso do que a instituição representa e de ter me formado aqui.

Agradeço a minha Alma Mater a **Universidade Autônoma de Nayarit** em México por ter acreditado no meu projeto acadêmico, o país representa para mim um exemplo de luta diário, e a educação será sempre a melhor alternativa.

Agradeço ao corpo docente da área de Endodontia, o Professor **Claudio Antônio Talge Carvalho** e a Professora **Ana Paula Martins Gomes**, pelo apoio incondicional que me proporcionaram sempre, e lembrarei deles com aquela alegria que todos os dias os caracterizou.

Agradeço ao professor **Eduardo Bresciani** pela amizade criada, sendo ele para mim, um exemplo de vida, pela inteligência, alegria e convicção sobre o saber viver, impulsando sempre para frente os grandes projetos. Agradeço aos professores da área de Dentística Profa. **Taciana**, Profe. **Sergio** por ter compartilhado experiências e amizade, me sinto muito feliz por ter conhecido vocês.

Agradeço à Professora **Flavia Goulart da Rosa Cardoso**, pela ajuda que você me deu do começo ao fim da história na minha pós-graduação,

sempre a disposição e sem esperar nada em troca. Obrigado de coração, desejo tudo o melhor para você.

Agradeço ao Professor **José Flavio e Daniel Herrera**, fico muito feliz em serem partícipes da minha banca de defesa, agradeço pelos conhecimentos que indiretamente segui das suas carreiras, vocês representam a endodontia que faz a diferença.

Agradeço à secretaria da Pós-graduação, **Bruno Shiguemitsu**, pela grande ajuda e amizade que me proporcionaram durante todo o tempo na instituição.

Agradeço as técnicas do laboratório, **Josiana e Fernanda** e a secretaria **Liliane**, pela ajuda incondicional e pelas experiências vividas.

Agradeço ao professor **Renato Miotto Palo** por ter me mostrado o caminho para realizar meus sonhos. Por acreditar em mim sem me conhecer e me dar uma oportunidade pra continuar em frente.

Aos meus colegas e amigos da Endodontia **Diego, Alessandra, Felipe, Cristhian, Thais, Lais, Felipinho, Daniel, Ricardo** a todos vocês, obrigado. Agradeço a **Bruna Jordão** e a **Giovana Minhoto**, dras. colegas e amigas com um coração enorme, um futuro brilhante aguarda por vocês, devem saber que podem contar comigo sempre.

Agradeço a **Amjad Abu**, amigo/irmão que a Síria colocou no meu caminho, confesso que nunca conheci amizade mais fiel que a dele. Obrigado ao meu *roomie* **Guilherme Schmitt**, por me abrir as portas da tua casa, por todas aquelas conversas e histórias compartilhadas, pela amizade que vai longe. Obrigado **Eliseo Pablo Chun** pela grande amizade criada no Brasil, pelos conselhos e a parceria.

Agradeço à **Cassia Cestari, Rayana Khoury e Daiana Cavalli**, e aproveito para escrever que não existe texto que consiga expressar o grande carinho que tenho por vocês, elas representam para mim algo mais valorizado

que a amizade, porque eu cuidei delas e elas cuidaram mais ainda de mim, “igual a família faz”, elas viraram minhas irmãs.

Aos meus amigos/irmãos **Julio Ferraz, Andre Wood, Evandro Utrini, Pedro Albuquerque, Pedro Murillo, Rafo Ribeiro, Shun Maeda, Tiago Borges, Bastien, Breno, Matheus, Augusto e Paschoal** por todos nós juntos termos formado um lar, a República Saudosa Maloca.

Agradeço a minha **família**, meus pais e irmãos, por serem os pilares mais importantes da minha vida.

Agradeço a todos meus **amigos** da Pós-graduação e da Graduação por fazer parte desta história, com a mão no coração “muito obrigado”

Obrigado aos envolvidos nesta grande luta, por terem me apoiado no meu crescimento e formação, obrigado por me permitirem fazer parte da suas vidas e consequentemente, vocês parte da minha...

" A ciência, é feita de erros, mas de erros benéficos, já que conduzem pouco a pouco à verdade". Júlio Verne

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	9
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO	14
2 ARTIGO.....	18
2.1 Artigo - Flores Orozco EI, Toia CC, Corazza BJM, Khoury RD, Bresciani E, Palo RM, Valera MC. Redução de bactérias cultiváveis, lipopolissacarídeos e collagenase/mmp-8 no tratamento endodôntico associado à ativação ultrassônica na infecção endodôntica primária: estudo clínico randomizado/ Effectiveness of ultrasonically activated techniques on infectious/inflammatory contents in teeth with primary endodontic infection	18
3 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	40
REFERÊNCIAS	44
APÊNDICE	51
ANEXOS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ca(OH) ₂	Hidroxido de Cálcio
CLX	Clorexidina
CT	Comprimento de Trabalho
CUA	Ativação Ultrassônica Contínua
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
ELISA	Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
EU/mL	Unidades de Endotoxina por mL
IEP	Infecção Endodôntica Primária
LPS	Lipopolissacarídeos
MEC	Matriz Extracelular
MIC	Medicação Intracanal
MMP	Metaloproteinase da matriz
NaOCl	Hipoclorito de Sódio
PBM	Preparo Biomecânico
PMNs	Polimorfonucleares
PUA	Ativação Ultrassônica Passiva
SCR	Sistema de Canais Radiculares
UFC/mL	Unidade Formadora de Colônias por mL

Flores Orozco EI. Redução de bactérias cultiváveis, lipopolissacarídeos e collagenase/mmp-8 no tratamento endodôntico associado à ativação ultrassônica na infecção endodôntica primária: estudo clínico randomizado [tese]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2019.

RESUMO

O objetivo desse estudo clínico randomizado foi avaliar em dentes com infecção endodôntica primária (IEP) os microrganismos anaeróbios cultiváveis (UFC/mL), níveis de endotoxinas (LPS) (EU/mL) e collagenase/MMP-8 da região periapical antes e durante o tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos de irrigação final: irrigação convencional (CNI), ativação ultrassônica passiva (PUA) e ativação ultrassônica contínua (CUA). Quarenta e cinco dentes com IEP foram submetidos ao tratamento endodôntico utilizando NaOCl 2.5% como solução irrigadora seguido do uso de EDTA 17%. Os protocolos de limpeza final foram realizados com irrigação com agulha convencional (controle), PUA e CUA; na sequência os canais foram preenchidos com pasta de Ca(OH)_2 + SS por 14 dias. Foram feitas coletas do conteúdo do canal radicular após abertura coronária (S1), após diferentes protocolos de irrigação final (S2) e após uso de medicação intracanal com pasta de hidróxido de cálcio [Ca(OH)_2] (S3). O conteúdo coletado do canal foi submetido às análises por cultura microbiológica (UFC/mL) e níveis de endotoxinas (EU/mL) pelo Lisado de Amebócitos de Limulus (LAL). Após preparo dos canais e após medicação com Ca(OH)_2 foram realizadas coletas do fluido periapical para análise da expressão de MMP-8 por ELISA. A análise estatística dos dados foi realizada pelos testes Kruskal-Wallis e Dunn para análise intergrupos de UFC/mL, LPS e MMP-8, todos eles com nível de significância de 5% ($P < 0.05$). Microrganismos anaeróbios cultiváveis foram detectados em 100 % das amostras iniciais (S1) com valor médio de 1.18×10^5 CFU/mL ($20 - 1.84 \times 10^6$ CFU/mL). CUA apresentou maior efetividade na redução de microrganismos anaeróbios cultiváveis em S3 (97.27%) seguido pela PUA (96.56%) e CNI (96.2%). Endotoxinas foram identificadas em 100% das amostras em S1 com valor médio de 538.10 EU/mL (0.017×6190 EU/mL), CUA mostrou uma maior redução nos níveis de LPS em S3 (97.75 %), seguido pela PUA (97.11%) e CNI (90.42%). O protocolo de irrigação final com ativação ultrassônica PUA e CUA favoreceu a redução de MMP-8 em comparação ao grupo CNI. Houve correlação estatística positiva entre os níveis de LPS e MMP-8. Conclui-se que o preparo biomecânico produz a maior redução no número de microrganismos anaeróbios e endotoxinas; O protocolo de irrigação final com PUA e CUA em associação ao preparo biomecânico produz maior redução nos níveis de Endotoxinas e MMP-8

em comparação com CNI. Existe correlação estatística positiva entre os níveis de LPS e MMP-8 presentes nas infecções endodônticas primárias, mostrando a associação do LPS com o processo de destruição tecidual.

Palavras-chave: Endotoxinas. Infecção endodôntica. Irrigação ultrassônica. Lesão periapical. Micro-organismos. MMP-8.

Flores Orozco EI. Cultivable bacteria, lipopolysaccharides and neutrophil collagenase/mmp-8 reduction on the endodontic treatment associated to ultrasonic activation in primary endodontic infection: a randomized clinical trial [doctorate thesis]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2019.

ABSTRACT

The aim of this randomized clinical trial was to evaluate in cultivated anaerobic microorganisms (CFU / mL), endotoxin levels (LPS) (EU / mL) and periapical collagenase / MMP-8 in teeth with primary endodontic infection (EPI) before and during Endodontic treatment using different final irrigation protocols: conventional irrigation (CNI), passive ultrasonic activation (PUA) and continuous ultrasonic activation (CUA). Forty-five teeth with IEP were submitted to endodontic treatment using 2.5% NaOCl as an irrigating solution followed by 17% EDTA. Final cleaning protocols were performed with conventional needle irrigation (control), PUA and CUA; The root canals were then filled with Ca (OH)₂ paste for 14 days. Root canal contents were collected after coronary opening (S1), after root canal preparation (S2) and after intracanal calcium hydroxide paste [Ca (OH)₂] (S3). Samples of the root canal content was performed to analysis by microbiological culture (CFU/mL) and endotoxin levels (EU / mL) by Limulus Amebocyte Lysate (LAL). After canal preparation and after Ca (OH)₂ medication, periapical fluid samples were collected for analysis of MMP-8 expression by ELISA. Statistical analysis of the data was performed by Kruskal-Wallis and Dunn tests for intergroup analysis of CFU / mL, LPS and MMP-8, all with a significance level of 5% ($P < 0.05$). Cultivable anaerobic microorganisms were detected in 100% of the initial samples (S1) with a mean value of 1.18×10^5 CFU / mL ($20 - 1.84 \times 10^6$ CFU / mL). CUA showed greater effectiveness in reducing anaerobic microorganisms cultivable in S3 (97.27%) followed by PUA (96.56%) and CNI (96.2%). Endotoxins were identified in 100% of samples in S1 with a mean value of 538.10 EU / mL (0.017×6190 EU / mL), CUA showed a greater reduction in LPS levels in S3 (97.75%), followed by PUA (97.11%). and CNI (90.42%). The final irrigation protocol with ultrasonic activation PUA and CUA favored the reduction of MMP-8 compared to the CNI group. There was a positive statistical correlation between LPS and MMP-8 levels. It is concluded that the biomechanical preparation produces the greater reduction in the number of anaerobic microorganisms and endotoxins; The final irrigation protocol with PUA and CUA in combination with biomechanical preparation produces greater reduction in Endotoxin and MMP-8 levels compared to CNI. There is a positive statistical correlation between the levels of

LPS and MMP-8 present in primary endodontic infections, showing the association of LPS with the tissue destruction process.

Keywords: Endotoxins. Endodontic infection. Periapical lesion. MMP-8. Ultrasonic irrigation.

1 INTRODUÇÃO

A anatomia interna do dente é formada por uma complexa rede de ramificações, presença de irregularidades e istmos, que permitem a proliferação e colonização de micro-organismos ao interior do sistema de canais radiculares (SCR)(Tennert et al., 2014). Estes micro-organismos e seus subprodutos são responsáveis pela etiologia do desenvolvimento de lesões periapicais, uma vez que interagem entre eles de forma sinérgica, ou interferindo e evadindo à resposta do hospedeiro (Takehashi et al., 1965).

As infecções endodônticas são polimicrobianas, contendo micro-organismos Gram-positivos e micro-organismos Gram-negativos predominantemente bactérias anaeróbias (Sundqvist, 1994). Estas bactérias, após sua morte, liberam lipopolisacarídeos (LPS) ou endotoxinas presentes na superfície da membrana externa da parede celular (Rietschel et al., 1996), sendo o LPS altamente citotóxico, atua sobre macrófagos, neutrófilos e fibroblastos levando à liberação de mediadores bioativos e citocinas pró-inflamatórias (Mohammadi, Dummer, 2011), mesmo estando presente em baixas concentrações consegue produzir uma resposta imune inata do hospedeiro desencadeando dano tecidual ou/e reabsorção óssea (Beutler, Poltorak, 2000; Cardoso et al., 2015; Martinho et al., 2012)

As metaloproteinases (MMPs) são enzimas responsáveis pela degradação da matriz extracelular, enzimas metalo-dependentes de zinco e Cálcio que atuam na modelagem, desenvolvimento e destruição de tecidos periapicais com a degradação de colágeno. As fibras de colágeno constituem a maior parte da matriz extracelular da região periapical e em condições patológicas são fragmentadas por MMPs collagenases (MMPs 1, 8 e 13) e degradadas por MMPs gelatinases (MMPs 2 e 9). Metaloproteinases tais como MMP-8 são importantes na patogênese periapical, uma vez que atuam na degradação da matriz orgânica

extracelular (Broverman et al., 1998) que é um dos primeiros estádios de reabsorção óssea periapical (Shin et al., 2002). Além disto, MMP-8 são ativadas por proteases bacterianas (Cazalis et al., 2009).

No tratamento endodôntico substâncias químicas são utilizadas durante o preparo biomecânico e medicação intracanal com finalidade de combater microrganismos e seus produtos e consequente diminuição do processo inflamatório periapical. Soluções como o hipoclorito de sódio (NaOCl), possui ação solvente de matéria orgânica e antimicrobiana (Cavalli et al., 2017; Kuruvilla and Kamath, 1998; Valera et al., 2014), sendo indicado como irrigante em diferentes concentrações durante o tratamento endodôntico. No entanto, o NaOCl não remove a camada de *smear layer* (Asna Ashari et al., 2009; Chang et al., 2001; Menezes et al., 2003; Valera et al., 2010), uma vez que não atua sobre a parte inorgânica desta camada. Para a melhor remoção desta camada utiliza-se agentes quelantes, sendo o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a substância química mais utilizada, com eficiência comprovada na dissolução de *smear layer* (Carvalho et al., 2008; Haapasalo et al., 2010; Valera et al., 2010). No entanto, devido a complexa anatomia dos canais radiculares e presença dos túbulos dentinários que podem permanecer parcialmente obliterados pelos resíduos mesmo após o uso dos quelantes, novos métodos de irrigação vêm sendo utilizados (Gu et al., 2009; Gulabivala et al., 2010).

Na pratica endodôntica, utiliza-se o NaOCl seguido do EDTA pois o NaOCl atua na matéria orgânica enquanto que o EDTA remove o componente inorgânico da camada residual deixada nas paredes do canal durante o preparo biomecânico (Briseno et al., 1992; Craigbaumgartner, Mader, 1987). Sendo assim, a combinação destes irrigantes associados e a ativação por ultrassom pode resultar em maior limpeza dos canais radiculares e aumento das propriedades antimicrobianas dos irrigantes (Al-Jadaa et al., 2009), contribuindo para maior sucesso da terapia endodôntica.

A irrigação ultrassônica têm sido aplicada para melhorar a limpeza durante o tratamento endodôntico devido à complexa anatomia do sistema de canais radiculares como istmos nos terços cervical e médio do canal radicular.

A irrigação ativada com ultrassom potencializa as propriedades da solução irrigadora devido aos diferentes fenômenos que ocorrem durante sua aplicação como agitação, cavitação, microcorrente acústica e geração de calor irão produzir efeitos nas estruturas dentais, especialmente sobre a dentina e camada residual (Walmsley, 1987), que em combinação com soluções irrigadoras aumentam os efeitos antimicrobianos. De acordo com Briseno et al. (1992), a utilização do NaOCl associado ao ultrassom faz com que ocorra maior eliminação de resíduos da camada de *smear layer*, levando a melhor limpeza do sistema de canais radiculares.

O ultrassom pode ser utilizado de forma intermitente ou continua sobre o NaOCl durante o tratamento endodôntico. Pesquisas têm sido desenvolvidas utilizando a Ativação Ultrassônica Passiva (PUA) para a ativação da solução irrigadora após o preparo biomecânico do canal radicular (Gu et al., 2009; Plotino et al., 2007; van der Sluis et al., 2007), além do PUA, a ativação ultrassônica continua (CUA) produz um fluxo ao interior do canal radicular permitindo a substituição da solução ininterruptamente (Castelo-Baz et al., 2016; Jiang et al., 2012). Em ambos os casos o inserto ultrassônico permanece no canal radicular sem contato com as paredes, na premissa que a energia gerada pelo inserto ultrassônico potencialize as propriedades da solução irrigadora mediante cavitação (Kato et al., 2016; Vivan et al., 2016) .

Entretanto, bactérias presentes no sistema de canais radiculares, e zonas de propagação microbiana podem permanecer após a instrumentação e irrigação, sendo necessário o uso de medicação intracanal para auxiliar na eliminação das bactérias e seus produtos, possibilitando assim atingir maior o sucesso clínico (Ferreira et al., 2015; Katebzadeh et al., 1999; Nelson-Filho et al., 2002). Entre as substâncias utilizadas, o hidróxido de cálcio (Ca (OH)_2) é a principal

medicação intracanal devido a suas propriedades antimicrobianas contra a maioria dos agentes patogênicos (Athanasiadis et al., 2007; Ferreira et al., 2015; Mohammadi, Dummer, 2011).

Assim, o presente trabalho foi delineado com objetivo de avaliar os níveis de microrganismos anaeróbios cultiváveis, níveis de endotoxinas e sua correlação com níveis de collagenase/MMP-8 da região periapical nas diferentes fases do tratamento endodôntico utilizando diferentes protocolos de irrigação final com NaOCl após preparo biomecânico. Espera-se com este estudo, verificar que a ativação do irrigante com ultrassom favorecera a limpeza e descontaminação no tratamento da infecção endodôntica primária.

2 ARTIGO(S)

2.1 Artigo - Flores Orozco EI, Toia CC, Corazza BJM, Khoury RD, Bresciani E, Palo RM, Valera MC. Efetividade das técnicas de ativação ultrassônica no conteúdo infeccioso / inflamatório em dentes com infecção endodôntica primária / *Effectiveness of ultrasonically activated techniques on infectious/inflammatory contents in teeth with primary endodontic infection**

RESUMO

Introdução: avaliar por meio de ensaio clínico randomizado o efeito de três diferentes protocolos finais de irrigação: irrigação convencional por agulha (CNI); ativação ultrassônica passiva (PUA) e ativação ultrassônica contínua (CUA) na redução de bactérias cultiváveis, lipopolissacarídeos (LPS) e collagenase neutrofílica / metaloproteinase da matriz 8 (MMP-8) de dentes com infecção endodôntica primária. **Métodos:** 45 dentes unirradiculares com infecção endodôntica primária e lesão periapical foram instrumentados por sistema lima única e solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Os dentes foram divididos aleatoriamente em três grupos (n = 15), de acordo com o protocolo final de irrigação após o preparo biomecânico: CNI; PUA e CUA. As amostras foram coletadas antes (S1) e após o preparo biomecânico (S2) e após a colocação do medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio e solução salina fisiológica (S3). Bactérias e lipopolissacarídeos cultiváveis (LPS) foram avaliados por meio de unidades formadoras de colônias bacterianas (UFC / mL) e ensaio de lisado de amebócitos de *Limulus* (EU / mL), respectivamente. Amostras de fluido intersticial foram coletadas logo após os protocolos finais de irrigação (S2 e S3) para acessar os níveis de neutrófilos collagenase / MMP-8 pelo ensaio imunoabsorvente enzimático (ELISA). Os dados foram analisados estatisticamente pelos testes de Kruskal-Wallis e Dunn, com nível de significância de 5% (P <0,05). **Resultados:** bactérias cultiváveis foram detectadas em todas as amostras iniciais (S1) com um valor mediano de 6080 (20 - 1,84 x 10⁶) UFC / mL. A CUA apresentou maior efetividade na redução (97,27%) de bactérias cultiváveis, seguido pelo PUA (96,56%) e CNI (96,2%). Também foram detectados LPS em todas as amostras iniciais (S1), com um valor mediano de 118 (0,017 x 6190) EU / mL. A CUA apresentou a maior redução dos níveis de LPS após S3 (97,75%), enquanto a PUA e CNI apresentaram reduções de 97,11% e 90,42%, respectivamente. Tanto o PUA como o CUA foram eficazes na redução do MMP-8 em comparação ao CNI. Foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de LPS e MMP-8. **Conclusões:** o preparo biomecânico

*Artigo elaborado de acordo com as normas do Periódico *Journal of Endodontics* (Print version ISSN 0099-2399). Submetido em: xx/xx/xxxx.

garante a maior redução de bactérias cultiváveis e LPS. A ativação ultrassônica (PUA e CUA) como protocolo final de irrigação associado ao preparo biomecânico apresentou a maior redução nos níveis de LPS e MMP-8 em comparação à CNI. Existe uma correlação positiva entre LPS e MMP-8 relacionada ao processo de reabsorção óssea e estabelecimento de lesão periapical.

Palavras-chave: Endotoxinas. Infecção endodôntica primária. Irrigação ultrassônica. Lesão periapical. Micro-organismos. MMP-8.

ABSTRACT

Introduction: to evaluate via a randomized clinical trial the effect of three different final irrigation protocols: conventional needle irrigation (CNI); passive ultrasonic activation (PUA) and continuous ultrasonic activation (CUA) on the reduction of cultivable bacteria, lipopolysaccharides (LPS) and neutrophil collagenase/matrix metalloproteinase 8 (MMP-8) from primarily infected root canals. **Methods:** forty-five single-rooted teeth with primary endodontic infection and periapical lesion were instrumented by a single-file reciprocating system and 2,5% sodium hypochlorite solution. Teeth were randomly divided into three groups (n=15) according to the final irrigation protocol after biomechanical preparation: CNI; PUA and CUA. Samples were collected before (S1) and after the biomechanical preparation (S2), and after the placement of the intracanal medication based on calcium hydroxide and physiological saline solution (S3). Cultivable bacteria and lipopolysaccharides (LPS) were evaluated by means of bacterial colony-forming units (CFU/mL) and Limulus Amebocyte Lysate assay (EU/mL), respectively. Interstitial fluid samples were collected right after the final irrigation protocols (S2 and S3) to access the neutrophil collagenase/MMP-8 levels by the enzymatic immunosorbent assay (ELISA). Data were statistically analyzed by Kruskal-Wallis and Dunn tests at a significance level of 5% ($P < 0.05$). **Results:** cultivable bacteria were detected in all initial samples (S1) with a median value of 6080 ($20 - 1.84 \times 10^6$) CFU/mL. CUA showed more effectiveness on the reduction (97.27%) of cultivable bacteria, being followed by PUA (96.56%) and CNI (96.2%). LPS were detected in all initial samples (S1) as well, with a median value of 118 (0.017×6190) EU/mL. CUA showed the greatest reduction of LPS levels after S3 (97.75 %), while PUA and CNI presented the reduction of 97.11% and 90.42%, respectively. Both PUA and CUA were effective on the reduction of MMP-8 compared to CNI. A positive correlation between LPS and MMP-8 levels was found. **Conclusions:** biomechanical preparation ensures the greatest reduction of cultivable bacteria and LPS. CUA as a final irrigation protocol associated with the biomechanical preparation showed the greatest reduction on the LPS and MMP-8 levels compared to PUA and CNI. There is a

positive correlation between LPS and MMP-8 related to the process of bone resorption and periapical lesion establishment.

Keywords: Endotoxins. Microorganisms. MMP-8. Primary endodontic infection. Ultrasonic activation.

INTRODUCTION

Primary endodontic infections are polymicrobial, composed of Gram-positive and Gram-negative bacteria, with facultative and obligate anaerobic bacteria conspicuously dominating the microbiota (1). During the death and disruption of Gram-Negative bacteria, lipopolysaccharides (LPS), also known as endotoxins – a component of their outer membrane – are released into the circulation (2). LPS cause a reaction on the indirect immune system, acting on neutrophils generating an uncontrolled inflammatory response which induces the release of bioactive mediators (3,4), including enzymes and reactive oxygen species (5). Even at low concentrations, LPS are the most potent stimuli for immune cells regarding the release of several inflammatory mediators such as interleukins, prostaglandins and matrix metalloproteinases (6–8). Such local immune response is complex and involves degradation of the periapical tissue (9,10). Matrix metalloproteinases (MMPs), a diverse group of the calcium-dependent zinc-containing endopeptidases family, are also involved in the inflammatory process being strongly related with the breakdown of the extracellular matrix, the main component of the connective tissue (11). Several subtypes of MMPs have been identified in apical periodontitis acting according to their target protein such as collagenase (12), gelatinases (13), stromelysin (12), and matrixin (14). During pathological conditions, the MMP-8 subtype, also known as neutrophil collagenase, plays a pivotal role in denaturing and cleaving type I, II and III collagens, which is the most prevalent component of the extracellular matrix (15,16).

Periapical immune response is predominantly a reaction to bacterial infection present in necrotic root canals (17–19). The use of irrigation solution during biomechanical preparation will act on disinfection and lubrication of the root canal system (20). Although the effectiveness of irrigation relies on both the mechanical flushing action and the ability of irrigants to kill bacteria (21) and dissolve tissue (22), it has been suggested that the flushing action may be the most important factor (23).

Although conventional needle irrigation (CNI) is the most widely used technique in clinical practice it has been reported to be ineffective in flushing out tissue remnants and cleaning the most apical portions of the root canal system, depending on depth of insertion, needle shape and design, pressure and flow rate (24,25). To overcome the limitations of CNI and considering the high incidence of isthmuses in the root canal system and their inaccessibility to mechanical instrumentation, several techniques have been proposed to complement the prior conventional irrigation in order to improve the delivery of antibacterial solutions.

Machine-assisted agitation systems have been suggested as an alternative to enhance the delivery of irrigating solutions to mechanically inaccessible areas of the complex root canal system. Passive ultrasonic activation (PUA) of the irrigant is an intermittent ultrasonically activated irrigation method which requires a vibrating instrument within the canal and replenishment of the solution with a syringe after each activation cycle promoting a micro acoustic current effect, hydrodynamic agitation, cavitation and heat generation on the irrigant, enhancing the NaOCl effect (26). Meanwhile, the continuous ultrasonic activation (CUA) method allows the solution to be uninterruptedly replaced via an ultrasonically activated irrigation needle (27).

Of a clinical relevance, elevated MMP levels have been correlated with nonhealing lesions (28,29). To date, there are no clinical studies investigating the influence of different ultrasonically activation techniques in the reduction of inflammatory mediators. In order to provide a more accurate perspective between technical procedures with biological conditions, the aim of the present study was to assess the efficacy of different ultrasonically activated irrigation methods in the removal of cultivable bacteria, LPS and MMP-8/collagenase.

Materials and Methods

Patient Selection

This randomized clinical trial was approved by the local Institute Review Board (CEP: 83576418.0.0000.0077) and registered at the Brazilian Clinical Trials Registry (ensaiosclinicos.gov.br) Primary ID:RBR-7CXWG5.

The sample size was determined based on the findings of a previous study (30) and a power calculation was performed through the <https://sealedenvelope.com/power/binary-equivalence/website>, under binary outcome and equivalence trial option. The calculation

indicated that must be a minimum of 15 patients per group with a significance level set at 0.05 and power $\beta = 0.80$.

A total of 157 patients attending the School of Dentistry, Institute of Science and Technology, São José dos Campos, São Paulo, Brazil, from January 2017 to September 2018 were evaluated for primary endodontic treatment. A detailed dental and general history was obtained from each patient. The inclusion criteria was determined based on clinical and radiographic examinations indicating the presence of periapical radiolucent lesion. Pulp necrosis was checked with the negative cold sensitivity test. Teeth that could not be isolated with rubber dam, presenting periodontal pockets deeper than 3mm and those who had received antibiotic treatment during the past 3 months and/or who had any systemic health disorder that might affect the inflammatory response, were excluded. Accordingly, 45 patients were included in the study and all volunteers signed a free and informed consent form.

Clinical procedures and Sample collections

All instruments and materials used were treated with Co^{60} gamma radiation (Ipen - Institute for Energy and Nuclear Research, São Paulo, SP, Brazil) for 6 hours at 20 KGy to sterilize and eliminate pre-existing endotoxins (30). The disinfection of the operatory field was performed by isolating the teeth with rubber dam and disinfecting the crown and surrounding structures with 30% H_2O_2 (volume / volume) for 30 seconds, followed by 2.5% NaOCl in the same way and inactivated with sodium thiosulfate 5% (30). To check the sterility of the external surfaces, a control sample collection was performed by streaking a swab sample onto blood agar plate which was further incubated aerobically and anaerobically (30).

The access cavity preparation was performed with a high-speed sterile/apyrogenic diamond bur without the use of water spray under manual irrigation with sterile / pyrogen-free saline solution. Prior to the coronary opening carious lesions and infiltrated restorations were removed to obtain a major elimination of contaminants. Then, before pulp chamber communication, the access cavity was newly disinfected and the sterility of the internal surface of the access cavity was also checked according to the protocol as previously described.

Prior to the first sampling (S1 - baseline), a K-file #15 (Dentsply Maillefer, Balaigues, Switzerland) was introduced to confirm the working length previously determined radiographically. Briefly, an endotoxin sample was obtained by introducing three #15 sterile/pyrogen-free paper tip (Dentsply-Maillefer, Balaigues, Switzerland) consecutively into

the full length of the root canal and retained in position for 60 s. Immediately after, the samples were stored in a pyrogen-free microtube containing 1 mL of Limulus Amoebocyte Lysate (LAL) water (Lonza, Walkersville, MD, USA) and frozen at -20°C for further endotoxin dosage. . For bacterial culture analysis, this procedure was repeated introducing three paper points consecutively into the full length of the root canal which were removed and placed in a sterile microtube containing 1 mL of Viability Medium Göteborg Agar III (VMGA III) transport medium (31) for microbial culture. The samples were transported to an anaerobic chamber.

Next, the working length (-1 mm) was determined using electronic apical locator (RomiApex A-15; Romidan Dental Solution, Kiryat-Ono, Israel) and confirmed by a digital periapical radiograph. Biomechanical preparation was performed by a single operator using the Reciproc R40 files (VDW, Munich, Germany) according to the manufacturer's instructions using an electric motor (VDW Silver, VDW, Munich, Germany). The instrumentation was performed in a crown down technique by introducing the instrument in an in-and-out pecking motion with 3 mm amplitude and slight apical pressure. In each third, after three pecking movements, the instrument was removed and cleaned, and the root canal was irrigated with 8 mL of 2.5% NaOCl by using a disposable syringe and a 30-G NaviTip needle (Ultradent, South Jordan, UT, USA), standardizing a total of 24 mL of 2.5% NaOCl during instrumentation. The foraminal debridement was performed with a # 30 K-type file working into the full length of the root canal.

Then all participants were divided into 3 groups using the simple randomization method according to the Consort 2010 - Consolidated Standards of Reporting Trials, namely: an external (independent) researcher prepared envelopes with a paper sheet inside and the name of the technique written on it. An assistant opened the envelope prior to the procedure and informed the operator the final irrigation protocol to be used: Conventional Needle Irrigation (CNI), Passive Ultrasonic Activation (PUA) or Continuous Ultrasonic Activation (CUA) technique. All participants and laboratory evaluators were blinded.

CNI After foraminal debridement, the root canal was irrigated with 8 mL of 2.5% NaOCl in a flow rate of 8mL/min using a syringe and a 30-gauge 27-mm sideport needle (NaviTip, Ultradent, South Jordan, UT, USA) inserted 1 mm short from the working length.

PUA. Initially, root canal was irrigated with 4 mL of 2.5% NaOCl, using a syringe and a 27 mm 30-gauge side exit needle inserted 1 mm short from the working length, and the PUA was performed using the noncutting Irrisonic Power tip # 20 / 0.01 (Irrisonic, Helse, São Paulo, Brazil) mounted on a piezoelectric ultrasonic device (ALT - Ribeirão Preto, SP, Brazil) at a

power setting of 10%, which was placed at 1 mm from the WL and activated for 30 seconds. Then the irrigating solution was renewed with 4 mL of 2.5% NaOCl and the PUA was performed again for another 30 seconds.

CUA. The root canal was continuously irrigated with 8 mL of 2.5% NaOCl using a syringe and a 27 mm 30-gauge side exit needle concomitant with ultrasonic activation of the using the noncutting Irrisonic Power tip #20/0.01 (Irrisonic, Helse, São Paulo, Brazil) inserted at 1mm short from the WL mounted on a piezoelectric ultrasonic device (ALT - Ribeirão Preto, SP, Brazil) at a minimum power of 10000 Hz for 60 s.

In all groups the final irrigation protocol was performed using the same volume (8mL) of 2.5% NaOCl for the same amount of time in action / activation (Figure 2). For 2.5% NaOCl inactivation the root canal was irrigated using 5 mL of 5% sodium thiosulfate, followed by a 10 mL irrigation with pyrogen-free/sterile saline solution. A final rinse with 17% ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) which remained in the root canal for 5 minutes.

In all groups, second sampling (S2) for microbiological culture and LPS analysis was collected as previously described. For MMP-8 measurement, the samples were collected from the interstitial fluid by introducing two sterile paper points 1mm over the apex, reaching the periapical tissues and retained in position for 60s. The paper points were gently removed and placed in a sterile microtube which were stored at -80 ° C (Figure 2) for further enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

The canals were dried with sterile paper cones and filled with calcium hydroxide intracanal medication (Biodynamics, Ibirapurã, PR, Brazil) manipulated with physiological saline solution (Sanobiol Laboratory, Pouso Alegre, MG, Brazil) in a 1:1 ratio, for a 14-day period. The medication was inserted into the root canal with the aid of a lentulo spiral (Dentsply / Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Switzerland) until the canal was completely filled. Then, the teeth were sealed with a coltosol layer (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) followed by provisional restoration with glass ionomer cement (S.S. White Articles Dental Ltd., Rio de Janeiro, RJ, Brazil).

After two weeks the patient was newly submitted to anesthesia and the provisional restoration was removed aseptically similar to the first session prior to coronary opening. The intracanal medication was removed with the aid of a Kerr 30 file and 10 ml of sterile saline solution and then the third sampling was performed as previously described for S2. , one sample for endotoxin analysis, three samples for microbiological culture analysis and one sample for MMP-8 measurement.

Culture procedure (CFU/mL)

The transport media containing the root canal samples were thoroughly shaken for 60 seconds (Vortex; Marconi, Piracicaba, São Paulo, Brazil). Serial 10-fold dilutions were made up to 10^{-3} . Fifty microliters of the serial dilutions were plated onto 5% defibrinated sheep blood fastidious anaerobe agar (FAA; Lab M, Bury, UK) by using sterile plastic spreaders to culture non-selective obligate anaerobes and facultative anaerobes. The plates were incubated at 37°C in anaerobic atmosphere for up to 14 days. After this period, colony-forming units (CFUs) were visually quantified for each plate.

Quantification of Endotoxin (LPS)

The kinetic chromogenic LAL assay (Lonza; Basel, Switzerland) was used for quantification of endotoxins; *Escherichia coli* endotoxin was used as standard. To determine the presence or absence of interfering agents, a positive control (root canal sample contaminated with a known amount of endotoxin) was included for each sample. Five standard endotoxin solutions (0.005-50 endotoxin units - EU/mL), positive control, root canal samples, and 100 µl of apyrogenic water (reaction blank) were added to an apyrogenic 96-well plate. The tests were carried out in quadruplicate. The plate was incubated at 37 °C ± 1 °C for 10 min in a Kinetic-QCL reader (Lonza, Walkersville, MD, USA), which was coupled to a microcomputer by means of the WinKQCL software. Next, 100 mL of chromogenic reagent was added to each well. A software continuously monitored the absorbance at 405 nm and automatically calculated the log/log-linear correlation between reaction time of each standard solution and corresponding endotoxin concentration.

Quantification of Matrix Metalloproteinases 8 by ELISA

After unfreeze, the tubes containing samples of interstitial fluid (SIF1 and SIF2) received 600 mL of apyrogenic phosphate buffered saline (PBS) and were shaken for 30 minutes, centrifuged at 3.000 rpm for 15 minutes, and aliquoted for quantification of matrix metalloproteinases by using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The matrix metalloproteinases evaluated was MMP-8 (R&D Systêms, Inc. Minneapolis, MN, USA). All reagents, samples and plate were brought to room temperature. The standard curve was made with the standards provided in the kit and the samples were added in each well containing the

specific monoclonal antibody for each marker to be quantified. Quantification was performed in duplicate and revealed with a solution containing chromogenic substrate and hydrogen peroxide. Optical densities (OD) were read with an ELISA plate reader at a wavelength of 450 nm.

Statistical Analysis

The data collected (i.e. CFU/mL, endotoxin concentration and MMP-8) were statistically analyzed by using the GraphPad Prism software, version 6.01 (GraphPad Software, LLC, CA, USA). Kolmogorov-Smirnov and Lilliefors normality tests were performed in order to allow visualization and distribution of the data. Kruskal-Wallis and Dunn tests were used in the inter-group analysis for CFU/mL, endotoxins concentration and MMP-8. All statistical tests were performed at a significance level of 5% ($P < 0.05$).

RESULTS

Upper and lower anterior teeth were included, of which 10 were upper central incisors (10/45), 13 upper lateral incisors (13/45), 6 lower central incisors (6/45), 2 lower lateral incisor (2/45), 1 upper canine (1/45), 4 lower canines (4/45), 2 upper first premolars (2/45), 5 lower first premolars (5/45) and 2 second lower premolars (2/45). The age range of patients ranged from 18 to 60 years old (55.5% men and 44.5% women) (Table 1).

Culture Procedure

Cultivable microorganisms were detected in 100% of the initial samples (S1) with a mean value of 1.18×10^5 CFU / mL (20 - 1.84×10^6 CFU / mL). All groups presented reduction of cultivable bacteria in S2, PUA presented smaller number of cultivable bacteria compared to CNI ($p < 0.05$). No differences were observed between PUA and CUA ($p > 0.05$). In S3 CUA showed a greater effectiveness in reducing cultivable anaerobic microorganisms (97.27%) followed by PUA (96.56%) and CNI (96.2%). The mean values of PUA and CUA remained similar to S2.

Table 1. Effectiveness of CNI , PUA and CUA protocols for removal of cultivable bacteria (CFUs/mL) in teeth primary endodontic infection

Final Irrigation Protocol	Cultivable Bacteria (CFUs/mL)			
		Baseline Sampling (S1)	After final irrigation protocol (S2)	After removal of IM (S3)
CNI	Mean	161744	3837.33	6136
	Mediana	13400	40	460
	± SD	±390658	±9263	±15763
	Range	0-1424000	0-30080	0-62280
		Aa	Ab	Aab
PUA	Mean	178846.67	10.66	305.33
	Mediana	2340	0	0
	± SD	±483793	±24.92	±781.6
	Range	0-1840000	0-80	0-2560
		Aa	Bb	Bb
CUA	Mean	14190	401.4	457.1
	Mediana	8000	0	20
	± SD	±22365	±766.1	±1357
	Range	200-76800	0-28000	0-5120
		Aa	ABb	Bb

*CNI, Conventional Needle Irrigation; PUA, Passive Ultrasonic Activation; CUA, Continuous Ultrasonic Activation

**Different uppercase letters represent significant differences difference inter-groups; Different lowercase letters represent significant differences intra-groups

Quantification of Endotoxins (LPS): Kinetic Chromogenic LAL Assay

The presence of endotoxins was verified in 100% (45/45) of the initial samples (S1) of root canal, with an average value of 538.10 EU / mL (0.017 x 6190 EU / mL). Table 2 shows in S1 all groups were similar in LPS levels. After final irrigation protocol (S2) there was a statistically significant reduction for all groups ($P < 0.05$), with a higher reduction percentage for the CUA group (93.4%), followed by the PUA group (87.23%) and CNI (80.1 %). Regarding the treatment steps (intragroups), there is a significant reduction of LPS in S2 with maintenance of this reduction in the third collection for CNI and CUA, for the PUA group the significant reduction happens only in S3 (Table 2).

Table 2. Effectiveness of CNI, PUA and CUA protocols for removal of levels of Endotoxins in teeth with primary endodontic infection

Final Irrigation Protocol	Levels of Endotoxins (EU/mL)			
		Baseline sampling (S1)	After final irrigation protocol (S2)	After removal of IM (S3)
CNI	Mean	999.27	151.30	95.63
	Mediana	522	8.22	18.4
	± SD	±1596	±337.0	±196.0
	Range	1.76-6190	0.38-1143	0.489-758
		Aa	Ab	Ab
PUA	Mean	426.27	54.40	12.27
	Mediana	55.6	4.74	4.45
	± SD	±722.1	±94.69	±22.69
	Range	2.28-2380	0.473-325	0.337-86
		Aa	ABab	ABb
CUA	Mean	179	11.32	4.4
	Mediana	34.8	1.1	1.77
	± SD	±239.5	±24.16	±5.414
	Range	0.01- 770	0.05 – 85.3	0.15 – 16.7
		Aa	Bb	Bb

*CNI, Conventional Needle Irrigation; PUA, Passive Ultrasonic Activation; CUA, Continuous Ultrasonic Activation

**Different uppercase letters represent significant differences difference inter-groups; Different lowercase letters represent significant differences intra-groups

Quantification of Matrix Metalloproteinases (MMP-8) (pg/mL)

The intragroup MMP-8 quantification was similar in the second (S2) and third collection (S3) in the different protocols performed. Comparing the groups in the different final irrigation protocols, the MMP8 values were higher for the CNI group in both S2 and S3. MMP-8 values were lower and similar in ultrasonic activation between PUA and CUA in both S2 and S3. The results of MMP-8 (pg / mL) measurement are shown in Table 3.

Table 3. Effectiveness of PUA, CUA and CNI protocols for removal of levels of MMP-8 in primary endodontic infection

Final Irrigation Protocol	Levels of MMP-8 (pg/mL)		
		After final irrigation protocol (S2)	After removal of IM (S3)
CNI	Mean	8422934,8	9572469,93
	Mediana	3493159,72	3516808,49
	± SD	± 13500000	± 14340000
	Range	0 - 51310000	135035-54570000
		Aa	Aa
PUA	Mean	1144,00	1900,84
	Mediana	0	0
	± SD	± 2383	± 2651
	Range	0 - 8704	0 - 8981
		Ba	Ba
CUA	Mean	3347,32	2120,24
	Mediana	3266,67	820,58
	± SD	± 3136	± 2862
	Range	0 - 10620	0 - 8329
		Ba	Ba

*CNI, Conventional Needle Irrigation; PUA, Passive Ultrasonic Activation; CUA, Continuous Ultrasonic Activation

**Different uppercase letters represent significant differences difference inter-groups; Different lowercase letters represent significant differences intra-groups

Endotoxins (LPS) and Matrix metalloproteinase (MMP-8) correlation

There was a significant correlation between LPS and MMP-8. This correlation was classified as weak since small increases in LPS correlate with large increases in MMP-8 ($P < 0.05$) ($r = 0.3669$).

DISCUSSION

Apical periodontitis is a consequence of root canal infection characterized by a local periradicular immune response (32). In clinical practice, successful endodontic treatment is achieved by biomechanical preparation associated with different irrigant solutions aiming to reduce the levels of microorganisms and their by-products from the root canal space (33). However, because of the complex nature of root canal anatomy, some areas remain inaccessible and untouched, regardless of instrumentation and irrigation techniques used (30,33) and the

persistence of microbial infection leads to destruction of the mineralized tissues and degradation of several extracellular matrix components around the root apex (34).

Various irrigation techniques and new agitation devices that rely on different mechanisms of irrigant transfer, have been used to improve antiseptics of the root canal system. This study aimed to investigate the effects of three different final irrigation techniques on microbial load and endotoxins within the root canal and on the levels of MMP-8 present in the periapical region. The novelty of the present study lies in the limited literature on this theme from a biological sight.

CNI with syringe is the most common method in endodontic therapy, but the flushing action of this conventional method is not quite sufficient to remove debris from the root canal (26,35,36). In order to overcome this limitation, ultrasonic agitation of the irrigant has been suggested as a supplementary step to improve antiseptics of the root canal system after instrumentation. An oscillating instrument is placed up to the apical third of the root canal promoting a continuous movement of the chemical substances (37–39). In the present study, two different activation techniques using ultrasonic device were compared with CNI. The main difference between the two ultrasonic techniques applied relied in the application of the irrigation solution which can be performed by either intermittent (PUA) or continuous flushing (CUA) (40–43). Both methods are efficient (35,44) in removing dentinal debris from root canals, however, little is known about its repercussion on the inflammatory contents.

The microbiological results were similar to those reported by Cavalli et al. (30) since all the initial root canals samples supported the microbial growth of cultivable anaerobic bacteria in primary endodontic infection. The data obtained showed a reduction in the number of cultivable anaerobic microorganisms after instrumentation using 2.5% NaOCl in the different irrigation protocols. However, the PUA group showed a greater reduction in the number of cultivable bacteria (97.85%) compared to the CNI (97.62%) and CUA (85.67%) groups, consequently establishing a statistical difference of cultivable microorganisms comparing the different groups tested. In S3, the results showed a reduction in the bacterial colony count in the CUA, PUA and CNI groups by 97.27%, 96.56% and 96.2% respectively. According to previous studies, the ultrasonic activation of the irrigant promotes greater cleaning and smear layer removal leading to a greater microbial reduction (45–47). The accumulated hard tissue debris in the inaccessible areas is an undesirable side effect of the biomechanical preparation because it may harbor persistent microorganisms while preventing access for antibacterial irrigation solutions (48,49). Although, there are conflicting results of in

vitro studies regarding the antimicrobial efficacy of ultrasonic devices, there is no clinical study comparing these two modalities of ultrasonic activation (27,50).

Culture technique is a reliable method for assessing the effectiveness of antimicrobial agents to reduce viable bacterial cells (51). Nevertheless, it is important to point out that negative samples does not necessarily indicates the absence of bacteria, since they could be below detection levels (51). Although sampling biofilm using paper points presents some limitations, this approach is a well established protocol considering that all “floating” species present in the main canal are or were members of the endodontic biofilm (52). The quantification of MMPs from periradicular tissues has been previously described (6).

Because bacteria and their by-products, such as endotoxins, are considered potential modulators of MMPs expression, the present study also determined the levels of LPS present in root canal infection and correlated them with the levels of MMP-8 found in apical lesions. LPSs were detected in all root canal samples of primarily infected root canals, which is in accordance with previous findings (6,53,54). Moreover, even in lower amounts, endotoxins present in root canals were positively correlated with larger amounts of MMP-8.

The data obtained showed that all final irrigation protocols were capable of statistically significant reduce the levels of LPS, but none of them were able to completely eliminate the endodotoxins from the root canal. In its lipid structure, LPS requires a longer time to occur inactivation (55). In this context, after having performed the therapeutic phase with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ for 14 days, LPS levels showed a higher percentage reduction in the CUA protocol (97.27%) followed by PUA (96.56%) and statistically differing with CNI (96.2%). This event can be justified by the cleaning that generates the physical-mechanical action of irrigation along with ultrasonic activation, reaching a larger number of open dentinal tubules in the apical portion of the tooth (56).

The use of calcium hydroxide dressing as an intracanal medication is widely accepted because it exhibits antimicrobial activity, neutralizes bacterial toxins, is biocompatible with the periapical tissues, inhibits inflammatory root and bone resorption and stimulates mineralization (57–59). In the present study, all teeth samples were found to be positive for MMP-8, which supports the role of MMPs in the establishment/development of the periapical inflammatory process (16). After the final irrigation protocol, both groups with ultrasonic activation (PUA and CUA) presented lower levels of MMP-8 expression compared to the CNI group. To the best of our knowledge, this is the first study investigating the efficacy of final irrigation protocols on the expression of MMPs in the interstitial fluid of the periapical tissue. Nevertheless, after being submitted to treatment with calcium hydroxide as the root canal

dressing, none of the groups were capable to reduce the levels of MMP-8 expressed after 14 days with intracanal medication. This finding conflicts with a previous study which have reported a markedly reduction of MMP-8 levels measured in the fluid inside the root canals of necrotic teeth following root canal therapy with a calcium hydroxide paste (16,52,60,61).

In conclusion, the use of ultrasonic devices, with either intermittent or continuous flow, presented lower levels of MMP-8 but the levels did not altered following root canal therapy with a calcium hydroxide paste. A positive correlation between LPS and MMP-8 was observed.

ACNOWLEDGEMENTS

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

REFERENCES

- 1 Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(4):522–30. Doi: 10.1016/0030-4220(94)90047-7.
- 2 Gorbet Maud B, Sefton Michael V. Endotoxin: the uninvited guest. *Biomaterials* 2005;26(34):6811–7. Doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.04.063.
- 3 Rietschel E T, Brade H, Holst O, et al. Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996;216:39–81.
- 4 Ricucci Domenico, Siqueira José F, Bate Anna L, Pitt Ford Thomas R. Histologic investigation of root canal-treated teeth with apical periodontitis: a retrospective study from twenty-four patients. *J Endod* 2009;35(4):493–502. Doi: 10.1016/j.joen.2008.12.014.
- 5 Qiu Zheng, Chen Jianghai, Xu Hanmei, et al. Inhibition of neutrophil collagenase/MMP-8 and gelatinase B/MMP-9 and protection against endotoxin shock. *J Immunol Res* 2014;2014:747426. Doi: 10.1155/2014/747426.
- 6 Martinho Frederico C., Teixeira Flávia F.C., Cardoso Flávia G.R., et al. Clinical investigation of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix

- metalloproteinases, and matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase complexes and their networks in apical periodontitis. *J Endod* 2016;42(7):1082–8. Doi: 10.1016/j.joen.2016.04.001.
- 7 Martinho Frederico C, Chiesa Wanderson Miguel Maia, Leite Fabio R M, Cirelli Joni A, Gomes Brenda P F A. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE(2) production. *J Endod* 2011;37(5):602–7. Doi: 10.1016/j.joen.2010.12.005.
 - 8 Martinho Frederico C, Chiesa Wanderson Miguel Maia, Leite Fabio R M, Cirelli Joni A, Gomes Brenda P F A. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod* 2010;36(9):1467–74. Doi: 10.1016/j.joen.2010.06.012.
 - 9 Beutler B, Poltorak A. The search for Lps: 1993-1998. *J Endotoxin Res* 2000;6(4):269–93.
 - 10 Cardoso Flávia G R, Ferreira Nádia S, Martinho Frederico C, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod* 2015;41(7):1015–9. Doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005.
 - 11 Woessner J F. The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci* 1994;732:11–21. Doi: 10.1111/j.1749-6632.1994.tb24720.x.
 - 12 Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Zervas A, et al. MMP-3 mRNA and MMP-3 and MMP-1 proteins in bladder cancer: a comparison with clinicopathologic features and survival. *Appl Immunohistochem Mol Morphol AIMM* 2001;9(2):130–7. Doi: 10.1097/00129039-200106000-00005.
 - 13 Vasala Kaija, Pääkkö Paavo, Turpeenniemi-Hujanen Taina. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein as a prognostic marker in bladder cancer. *Urology* 2003;62(5):952–7. Doi: 10.1016/S0090-4295(03)00660-5.
 - 14 Guan Kao Peng, Ye Hai Yun, Yan Zheng, Wang Ying, Hou Shu Kun. Serum levels of endostatin and matrix metalloproteinase-9 associated with high stage and grade primary transitional cell carcinoma of the bladder. *Urology* 2003;61(4):719–23. Doi:

- 10.1016/S0090-4295(02)02429-9.
- 15 Pozo P, Valenzuela M A, Melej C, et al. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res* 2005;40(3):199–207. Doi: 10.1111/j.1600-0765.2005.00786.x.
 - 16 Paula-Silva Francisco Wanderley Garcia, da Silva Léa Assed Bezerra, Kapila Yvonne Lorraine. 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.
 - 17 Siqueira José F., Rôças Isabela N. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J* 2007:267–80. Doi: 10.1590/s0103-64402007000400001.
 - 18 De Brito Luciana Carla Neves, Fonseca Teles Flávia Rocha, Teles Ricardo Palmier, Totola Antônio Helvécio, Vieira Leda Quércia, Ribeiro Sobrinho Antônio Paulino. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod* 2012;38(4):481–5. Doi: 10.1016/j.joen.2011.12.010.
 - 19 Parolia Abhishek. Role of Cytokines, Endotoxins (LPS), and Lipoteichoic Acid (LTA) in Endodontic Infection. *J Dent Oral Disord Ther* 2015;2(4):01–5. Doi: 10.15226/jdodt.2014.00132.
 - 20 Haapasalo Markus, Shen Ya, Qian Wei, Gao Yuan. Irrigation in Endodontics. *Dent Clin North Am* 2010;54(2):291–312. Doi: 10.1016/j.cden.2009.12.001.
 - 21 Gulabivala Kishor, Patel Bina, Evans Glynis, Ng Yuan-Ling. Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endod Top* 2005;10(1):103–22. Doi: 10.1111/j.1601-1546.2005.00133.x.
 - 22 Lee S.-J., Wu M.-K., Wesselink P. R. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J* 2004;37(10):672–8. Doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00848.x.
 - 23 Baker Neil A., Eleazer Paul D., Averbach Robert E., Seltzer Samuel. Scanning electron microscopic study of the efficacy of various irrigating solutions. *J Endod* 1975;1(4):127–35. Doi: 10.1016/S0099-2399(75)80097-5.

- 24 Zmener Osvaldo, Pameijer Cornelis H., Serrano Susana Alvarez, Palo Renato Mito, Iglesias Elaine Faga. Efficacy of the NaviTip FX Irrigation Needle in Removing Post Instrumentation Canal Smear Layer and Debris in Curved Root Canals. *J Endod* 2009;35(9):1270–3. Doi: 10.1016/j.joen.2009.05.001.
- 25 Boutsoukis Christos, Lambrianidis Theodor, Verhaagen Bram, et al. The effect of needle-insertion depth on the irrigant flow in the root canal: evaluation using an unsteady computational fluid dynamics model. *J Endod* 2010;36(10):1664–8. Doi: 10.1016/j.joen.2010.06.023.
- 26 van der Sluis L. W. M., Versluis M., Wu M. K., Wesselink P. R. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J* 2007;40(6):415–26. Doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x.
- 27 Rödiger Tina, Zimmermann Felix, Konietschke Frank, Sydow Hans Georg, Wiegand Annette. Comparison of the antibacterial efficacy of sonic- and two ultrasonic-activated irrigation techniques in reducing intracanal *Enterococcus faecalis* populations. *Quintessence Int* 2018;49(9):689–97. Doi: 10.3290/j.qi.a40776.
- 28 Beidler Stephanie K., Douillet Christelle D., Berndt Daniel F., Keagy Blair A., Rich Preston B., Marston William A. Multiplexed analysis of matrix metalloproteinases in leg ulcer tissue of patients with chronic venous insufficiency before and after compression therapy. *Wound Repair Regen* 2008;16(5):642–8. Doi: 10.1111/j.1524-475X.2008.00415.x.
- 29 Liu Yu, Min Danqing, Bolton Thyra, et al. Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 2009;32(1):117–9. Doi: 10.2337/dc08-0763.
- 30 Cavalli Daiana, Toia Cássia Cestari, Flores Orozco Esteban Isai, 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.
- 31 Möller A J. Microbiological examination of root canals and periapical tissues of human teeth. Methodological studies. *Odontol Tidskr* 1966;74(5):Suppl:1-380.
- 32 Nair P N R. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures.

- Crit Rev Oral Biol Med 2004;15(6):348–81.
- 33 Vera Jorge, Siqueira José F, Ricucci Domenico, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod* 2012;38(8):1040–52. Doi: 10.1016/j.joen.2012.04.010.
 - 34 Sorsa Timo, Tjäderhane Leo, Kontinen Yrjö T., et al. Matrix metalloproteinases: Contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;306–21. Doi: 10.1080/07853890600800103.
 - 35 van der Sluis Lucas W M, Vogels Maikel P J M, Verhaagen Bram, Macedo Ricardo, Wesselink Paul R. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod* 2010;36(4):737–40. Doi: 10.1016/j.joen.2009.12.004.
 - 36 Plotino G, Pameijer C, Mariagrande N, SOMMA F. Ultrasonics in Endodontics: A Review of the Literature. *J Endod* 2007;33(2):81–95. Doi: 10.1016/j.joen.2006.10.008.
 - 37 Nakamura V. C., Pinheiro E. T., Prado L. C., et al. Effect of ultrasonic activation on the reduction of bacteria and endotoxins in root canals: a randomized clinical trial. *Int Endod J* 2018;51:e12–22. Doi: 10.1111/iej.12783.
 - 38 Andrabi Syed M.ukhtar Un Nisar, Kumar Ashok, Zia Afaf, Iftekhhar Huma, Alam Sharique, Siddiqui Shiraz. Effect of passive ultrasonic irrigation and manual dynamic irrigation on smear layer removal from root canals in a closed apex in vitro model. *J Investig Clin Dent* 2014;5(3):188–93. Doi: 10.1111/jicd.12033.
 - 39 Munoz Hugo Roberto, Camacho-Cuadra Karla. In vivo efficacy of three different endodontic irrigation systems for irrigant delivery to working length of mesial canals of mandibular molars. *J Endod* 2012;38(4):445–8. Doi: 10.1016/j.joen.2011.12.007.
 - 40 Uzunoglu Emel, Görduysus Melahat, Görduysus Ömer. A comparison of different irrigation systems and gravitational effect on final extrusion of the irrigant. *J Clin Exp Dent* 2015;7(2):e218-23. Doi: 10.4317/jced.52158.
 - 41 Helvacıoğlu Kıvanç Bağdagül, Deniz Arısu Hacer, Yanar Nazlı Özge, Silah Hülya Mercan, İnam Recai, Görgül Güliz. Apical extrusion of sodium hypochlorite activated with two laser systems and ultrasonics: a spectrophotometric analysis. *BMC Oral*

- Health 2015;15:71. Doi: 10.1186/s12903-015-0056-0.
- 42 Gu Li-sha, Kim Jong Ryul, Ling Junqi, Choi Kyung Kyu, Pashley David H, Tay Franklin R. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod* 2009;35(6):791–804. Doi: 10.1016/j.joen.2009.03.010.
 - 43 van der Sluis Lucas, Wu Min-Kai, Wesselink Paul. Comparison of 2 flushing methods used during passive ultrasonic irrigation of the root canal. *Quintessence Int* 2009;40(10):875–9.
 - 44 Macedo R. G., Verhaagen B., Wesselink P. R., Versluis M., van der Sluis L. W. M. Influence of refreshment/activation cycles and temperature rise on the reaction rate of sodium hypochlorite with bovine dentine during ultrasonic activated irrigation. *Int Endod J* 2014;47(2):147–54. Doi: 10.1111/iej.12125.
 - 45 Bueno Carlos Roberto Emerenciano, Cury Marina Tolomei Sandoval, Vasques Ana Maria Veiga, et al. Cleaning effectiveness of a nickel-titanium ultrasonic tip in ultrasonically activated irrigation: a SEM study. *Braz Oral Res* 2019;33(0):e017. Doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0017.
 - 46 Souza Caio Cesar, Bueno Carlos Eduardo, Kato Augusto Shoji, Limoeiro Ana Grasiela, Fontana Carlos Eduardo, Pelegrine Rina Andrea. Efficacy of passive ultrasonic irrigation, continuous ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation device in penetration into main and simulated lateral canals. *J Conserv Dent* 2019;22(2):155. Doi: 10.4103/JCD.JCD_387_18.
 - 47 Neelakantan Prasanna, Ounsi Hani F., Devaraj Sharmila, Cheung Gary S. P., Grandini Simone. Effectiveness of irrigation strategies on the removal of the smear layer from root canal dentin. *Odontology* 2019;107(2):142–9. Doi: 10.1007/s10266-018-0373-2.
 - 48 Paqué Frank, Laib Andres, Gautschi Hanspeter, Zehnder Matthias. Hard-Tissue Debris Accumulation Analysis by High-Resolution Computed Tomography Scans. *J Endod* 2009;35(7):1044–7. Doi: 10.1016/j.joen.2009.04.026.
 - 49 Paqué F, Boessler C, Zehnder M. Accumulated hard tissue debris levels in mesial roots of mandibular molars after sequential irrigation steps. *Int Endod J* 2011;44(2):148–53. Doi: 10.1111/j.1365-2591.2010.01823.x.

- 50 Matos Felipe de Souza, Khoury Rayana Duarte, Carvalho Cláudio Antonio Talge, Martinho Frederico Canato, Bresciani Eduardo, Valera Marcia Carneiro. Effect of EDTA and QMIX Ultrasonic Activation on the Reduction of Microorganisms and Endotoxins in Ex Vivo Human Root Canals. *Braz Dent J* 2019;30(3):220–6. Doi: 10.1590/0103-6440201902470.
- 51 Herrera D R, Martinho F C, De-Jesus-Soares A, et al. Clinical efficacy of EDTA ultrasonic activation in the reduction of endotoxins and cultivable bacteria. *Int Endod J* 2017;50(10):933–40. Doi: 10.1111/iej.12713.
- 52 Duque Thais M., Prado Maira, Herrera Daniel R., Gomes Brenda P.F.A. Periodontal and endodontic infectious/inflammatory profile in primary periodontal lesions with secondary endodontic involvement after a calcium hydroxide-based intracanal medication. *Clin Oral Investig* 2019;23(1):53–63. Doi: 10.1007/s00784-018-2401-6.
- 53 Martinho Frederico C, Nascimento Gustavo G, Leite Fabio R M, Gomes Ana P M, Freitas Lilian F, Camões Izabel C G. 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.
- 54 Martinho Frederico C, Leite Fabio R M, Chiesa Wanderson M M, Nascimento Gustavo G, Feres Magda, Gomes Brenda P F A. Signaling pathways activation by primary endodontic infectious contents and production of inflammatory mediators. *J Endod* 2014;40(4):484–9. Doi: 10.1016/j.joen.2013.10.022.
- 55 Siqueira J F, Rôças I N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod* 2005;31(6):411–23.
- 56 Pacheco-Yanes Juan, Provenzano José C, Marceliano-Alves Marília F, et al. Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study. *Clin Oral Investig* 2019. Doi: 10.1007/s00784-019-02970-5.
- 57 Leonardo M R, Almeida W A, Ito I Y, da Silva L A. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*

- 1994;78(2):232–8. Doi: 10.1016/0030-4220(94)90153-8.
- 58 Silva Léa Assed Bezerra, Nelson-Filho Paulo, Leonardo Mário Roberto, Rossi Marcos A., Pansani Cyneu Aguiar. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28(2):94–8. Doi: 10.1097/00004770-200202000-00011.
 - 59 Leonardo Mario R, Hernandez Maria E F T, Silva Léa A B, Tanomaru-Filho Mário. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102(5):680–5. Doi: 10.1016/j.tripleo.2006.03.021.
 - 60 Wahlgren J., Salo T., Teronen O., Luoto H., Sorsa T., Tjäderhane L. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) in pulpal and periapical inflammation and periapical root-canal exudates. *Int Endod J* 2002;35(11):897–904. Doi: 10.1046/j.1365-2591.2002.00587.x.
 - 61 Barbosa-Ribeiro Marlos, Arruda-Vasconcelos Rodrigo, de-Jesus-Soares Adriana, 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.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

No presente ensaio clínico randomizado, níveis de microrganismos, LPS e sua correlação com collagenase MMP-8 foram avaliados após diferentes protocolos de irrigação final (CNI, PUA e CUA), com o intuito de melhorar a descontaminação na terapia endodôntica. Diferentes protocolos de desinfecção têm sido implementados na tentativa de eliminar os microrganismos e seus subprodutos presentes no interior do sistema de canais radiculares. A ativação do irrigante com ultrassom foi utilizada como coadjuvante na limpeza após instrumentação, potencializando a ação da substância química pela ação física promovida pela cavitação, transmissão acústica e aquecimento do irrigante. Estas propriedades do ultrassom, além de permitir maior penetração da solução irrigadora, favorece a limpeza e pode potencializar a ação dos irrigantes, melhorando a atividade antimicrobiana (Lee et al., 2004; Robinson et al., 2018; van der Sluis, 2015)

Nesse estudo foi utilizado hipoclorito de sódio 2.5% como solução irrigadora por ser considerado uma das soluções mais utilizadas, em associação ao preparo biomecânico do canal radicular devido sua propriedade antimicrobiana e capacidade de dissolver tecido pulpar (Guerisoli et al., 2002; Mohammadi, 2008). Para a irrigação do canal radicular foram utilizados 24 mL de NaOCl 2.5% durante o PBM, dividido por terços radiculares, melhorando a neutralização do conteúdo necrótico, metodologia semelhante utilizada em outros estudos (Cardoso et al., 2016; Cavalli et al., 2017).

Entretanto, NaOCl é incapaz de remover a camada de *smear layer* (Asna Ashari et al., 2009; Chang et al., 2001; Menezes et al., 2003; Valera et al., 2010), uma vez que não atua sobre a parte inorgânica da camada residual. Assim, para melhor remoção desta camada, torna-se necessário o uso de uma solução que tenha propriedades desmineralizantes (Hülsmann et al., 2003), sendo o ácido

etilenodiaminotetracético (EDTA) a substância química mais utilizada, com eficiência comprovada na dissolução de *smear layer* (Carvalho et al., 2008; Haapasalo et al., 2010; Valera et al., 2010). O EDTA reage com os íons de cálcio na dentina e forma quelatos de cálcio solúveis, sendo que o mesmo descalcifica a dentina a uma profundidade de 20-30 μm . (Anas Al-Jadaa et al., 2009). No presente estudo foi utilizado 1mL de EDTA, até que o canal fosse preenchido, deixando-o atuar somente na camada residual por 5 minutos, como preconizado em trabalhos anteriores (Cardoso et al., 2016).

Vários métodos têm sido pesquisados para a quantificação e identificação de bactérias, assim como, para a quantificação de endotoxinas. No presente estudo o conteúdo coletado do canal radicular foi armazenado em VMGA III (Ali et al., 1995), seguido da semeadura em placas de petri contendo meio de cultura FAA e BHI, auxiliando na detecção de microrganismos anaeróbios estritos ou facultativos e aeróbios, respectivamente.

O desenvolvimento das infecções endodônticas primárias origina-se pela proliferação de múltiplas comunidades bacterianas (Sundqvist, 1994). Na metodologia do presente estudo, coletas do conteúdo do canal radicular mostraram a presença de bactérias anaeróbias cultiváveis na coleta realizada após abertura coronária (S1) em todas as amostras. Verificou-se ainda uma redução no número de MO anaeróbios cultiváveis após PBM (S2) utilizando NaOCl 2.5% nos diferentes protocolos de irrigação. No entanto, o grupo PUA apresentou maior redução no número de bactérias cultiváveis (97.85%), em comparação aos grupos CNI (97.62%) e CUA (85.67%), consequentemente se estabelece uma diferença estatística de microrganismos cultiváveis comparando os diferentes grupos testados. Após a remoção da MIC (S3) os resultados mostraram uma redução na contagem de colônias bactérias nos grupos CUA, PUA e CNI de 97.27%, 96,56% e 96.2% respectivamente. Corroborando os resultados com estudos anteriores, a ação ultrassônica em combinação à ação do irrigante promove maior limpeza e remoção de *smear layer*. consequentemente atingindo

uma maior efetividade antimicrobiana (Bueno et al., 2019, Neelakantan et al., 2019; Souza et al., 2019). Os resultados mostram que o protocolo de irrigação com PUA promove uma maior redução no número de MO, após PBM quando comparado com CNI (S2) (Nagendrababu et al., 2018). Além disso, é relevante destacar a efetividade na descontaminação obtida pela ação da cavitação promovida pelo ultrassom associado a ação do NaOCl que foi renovado durante a irrigação (Bueno et al., 2019), mostrando melhores resultados de descontaminação em S3 quando comparados CUA com CNI.

Estudos anteriores mostram que fatores de virulência de bactérias gram-negativas como LPS estão associadas ao desenvolvimento de lesões periapicais (Cardoso et al., 2015; Jacinto et al., 2005) . Além disto, LPS pode gerar uma reação incontrolada direta e iminente sobre leucócitos especificamente neutrófilos ocasionando a ativação de MMPs. No presente estudo, os resultados analisados relacionados aos níveis de collagenase/MMP-8 presentes na região periapical mostram que ao utilizar o protocolo de irrigação associado com CUA houve uma redução porcentual de 36.65% (S2). Em S3 não verificou-se diferença entre PUA e CUA que foram diferentes à irrigação convencional.

É sabido que as bactérias Gram-negativas possuem na sua estrutura diversos fatores de virulência como endotoxinas, que desencadeiam uma reação inflamatória associada à sintomatologia e reabsorção óssea (Martinho et al., 2017). No presente estudo verificou-se grande quantidade de LPS em todas as amostras analisadas (S1). Os resultados mostram uma redução estatística significativa após os diferentes protocolos de irrigação final (S2), mas sem obter uma total eliminação, sendo que a CUA reduziu (93.4%) seguido de PUA (87.23%) e CNI (84.85%) (S2). Devido a estrutura lipídica do LPS, para que ocorra sua inativação é preciso maior tempo de ação da substância química auxiliar (Siqueira, Rôças, 2005). Após uso de $(Ca(OH)_2)$ por 14 dias como medicação intracanal, níveis de LPS reduziram na CUA, e PUA, havendo diferenças estatísticas entre CUA e CNI. A limpeza que acontece pela ação físico-

mecânica da irrigação junto a ativação ultrassônica, pode favorecer maior penetração do irrigante nos túbulos dentinários abertos na porção apical do dente (Pacheco-Yanes et al., 2019), melhorando assim a limpeza com consequente redução de MO e seus produtos.

Dos métodos de irrigação, o uso do ultrassom para ativação do irrigante de forma passiva (PUA) têm mostrado resultados favoráveis na limpeza e desinfecção na terapia endodôntica (Bueno et al., 2019; Pacheco-Yanes et al., 2019), produzindo cavitação e micro-corrente acústica ativando a solução e favorecendo a limpeza dos túbulos dentinários. A irrigação com CUA, têm sido sugerido como protocolo clínico a fim de melhorar a desinfecção após PBM (Jiang et al., 2012). Esta técnica vem somar as características de ação física cavitacional e transmissão de energia acústica com a dissolução do tecido orgânico e ação antimicrobiana do irrigante, permitindo uma substituição continua da substância dentro do canal radicular (Layton et al., 2015).

Até a finalização desse estudo, não há relato na literatura endodôntica sobre a correlação entre LPS e collagenase/MMP-8. Verificou-se uma correlação fraca entre LPS e MMP-8 uma vez que pequenos aumentos de LPS desencadeiam grandes aumentos de MMP-8 (Reynaud af Geijersstam et al., 2005; Shin et al., 2011).

O tratamento realizado nos diferentes grupos avaliados foi considerado como sucesso clínico, considerando ausência de fistula, dor ou mobilidade. Os achados nesse estudo clínico poderão somar uma alternativa à terapia clínica.

Os estudos (Patan-Zugaj et al., 2018; Qiu et al., 2014) demonstram que mesmo níveis baixos de LPS podem desencadear a liberação de altos níveis de collagenase/MMP-8, corroborando essa informação com o presente estudo. Assim verificou-se que o uso de hipoclorito de sódio como irrigante têm a capacidade de reduzir os níveis de microrganismos, endotoxinas (Carvalho et al., 2016) e collagenase MMP-8 durante o preparo biomecânico, sendo essa ação favorecida pela ativação ultrassônica, tanto passiva quanto continua.

REFERÊNCIAS*

- Al-Jadaa A, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Necrotic pulp tissue dissolution by passive ultrasonic irrigation in simulated accessory canals: impact of canal location and angulation. *Int Endod J*. 2009;42(1):59–65. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01497.x. PMID: 19125981.
- Al-Jadaa Anas, Paqué F, Attin T, Zehnder M. Acoustic hypochlorite activation in simulated curved canals. *J Endod*. 2009;35(10):1408–11. doi: 10.1016/j.joen.2009.07.007. PMID: 19801241.
- Ali RW, Bancescu G, Nielsen O, Skaug N. Viability of four putative periodontal pathogens and enteric rods in the anaerobic transport medium VMGA III. *Oral Microbiol Immunol*. 1995;10(6):365–71. doi: 10.1111/j.1399-302x.1995.tb00168.x. PMID: 8602345.
- Asna Ashari M, Fayaz F, Moezzi Ghadim N, Alim Marvasti L, Mehrabi Y. Evaluation of the antimicrobial effects of MTAD, NaOCl against selected endodontic pathogens. *Iran Endod J*. 2009;4(2):63–8. PMID: 23940488.
- Athanassiadis B, Abbott P V, Walsh LJ. The use of calcium hydroxide, antibiotics and biocides as antimicrobial medicaments in endodontics. *Aust Dent J*. 2007;52(1 Suppl):S64-82. PMID: 17546863.
- Beutler B, Poltorak A. The search for Lps: 1993-1998. *J Endotoxin Res*. 2000;6(4):269–93. PMID: 11521047.
- Briseno M. BM, Wirth R, Hamm G, Standhartfnger W. Efficacy of different irrigation methods and concentrations of root canal irrigation solutions on bacteria in the root canal. *Dent Traumatol*. 1992;8(1):6–11. doi: 10.1111/j.1600-9657.1992.tb00218.x. PMID: 1396362.
- Broverman RL, Nguyen KH, da Silveira A, Brinkley LL, Macauley SP, Zeng T, et al. Changes in the expression of extracellular matrix (ECM) and matrix metalloproteinases (MMP) of proliferating rat parotid acinar cells. *J Dent Res*. 1998;77(7):1504–14. doi: 10.1177/00220345980770070501. PMID: 9663435.
- Bueno CRE, Cury MTS, Vasques AMV, Sarmiento JL, Trizzi JQ, Jacinto RC, et al. Cleaning effectiveness of a nickel-titanium ultrasonic tip in ultrasonically activated irrigation: a SEM study. *Braz Oral Res*. 2019;33(0):e017. doi: 10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0017. PMID: 30892412.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [cited 2019 Aug 20]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Cardoso FG da R, Chung A, Martinho FC, Camargo CHR, Carvalho CAT, Gomes BPF de A, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Braz Dent J*. 2016;27(4):412–8. doi: 10.1590/0103-6440201600520. PMID: 27652703.

Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LRC, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015a;41(7):1015–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PMID: 25935504.

Cardoso FGR, Ferreira NS, Martinho FC, Nascimento GG, Manhães LRC, Rocco MA, et al. Correlation between Volume of Apical Periodontitis Determined by Cone-beam Computed Tomography Analysis and Endotoxin Levels Found in Primary Root Canal Infection. *J Endod*. 2015b;41(7):1015–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.02.005. PMID: 25935504.

Carvalho AS, Camargo CHR, Valera MC, Camargo SEA, Mancini MNG. Smear layer removal by auxiliary chemical substances in biomechanical preparation: a scanning electron microscope study. *J Endod*. 2008;34(11):1396–400. doi: 10.1016/j.joen.2008.08.012. PMID: 18928856.

Carvalho AS, Oliveira LD de, Cardoso FG da R, Oliveira FE de, Valera MC, Carvalho CAT. Limewater and Polymyxin B Associated with NaOCl for Endotoxin Detoxification in Root Canal with Necrotic Pulp. *Braz Dent J*. 2016;27(5):573–7. doi: 10.1590/0103-6440201600934. PMID: 27982236.

Castelo-Baz P, Varela-Patiño P, Cantatore G, Domínguez-Perez A, Ruíz-Piñón M, Miguéns-Vila R, et al. In vitro comparison of passive and continuous ultrasonic irrigation in curved root canals. *J Clin Exp Dent*. 2016;8(4):e437–41. doi: 10.4317/jced.53023. PMID: 27703613.

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*. 2017a;43(8):1237–45. doi: 10.1016/j.joen.2017.03.032. PMID: 28606669.

Cazalis J, Tanabe S, Gagnon G, Sorsa T, Grenier D. Tetracyclines and chemically modified tetracycline-3 (CMT-3) modulate cytokine secretion by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Inflammation*. 2009;32(2):130–7. doi: 10.1007/s10753-009-9111-9. PMID: 19238528.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(4):446–50. doi: 10.1067/moe.2001.116812. PMID: 11598582.

Craigbaumgartner J, Mader C. A scanning electron microscopic evaluation of four root canal irrigation regimens. *J Endod.* 1987;13(4):147–57. doi: 10.1016/S0099-2399(87)80132-2.

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. PMID: 25892513.

Gu L, Kim JR, Ling J, Choi KK, Pashley DH, Tay FR. Review of contemporary irrigant agitation techniques and devices. *J Endod.* 2009;35(6):791–804. doi: 10.1016/j.joen.2009.03.010. PMID: 19482174.

Guerisoli DMZ, Marchesan MA, Walmsley AD, Lumley PJ, Pecora JD. Evaluation of smear layer removal by EDTAC and sodium hypochlorite with ultrasonic agitation. *Int Endod J.* 2002;35(5):418–21. PMID: 12059911.

Gulabivala K, Ng Y-L, Gilbertson M, Eames I. The fluid mechanics of root canal irrigation. *Physiol Meas.* 2010;31(12):R49-84. doi: 10.1088/0967-3334/31/12/R01. PMID: 21071831.

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. PMID: 20433979.

Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A. Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J.* 2003;36(12):810–30. doi: 10.1111/j.1365-2591.2003.00754.x. PMID: 14641420.

Jacinto RC, Gomes BPFA, 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(Pt 8):777–83. doi: 10.1099/jmm.0.45976-0. PMID: 16014432.

Jiang L-M, Lak B, Eijssvogels LM, Wesselink P, van der Sluis LWM. Comparison of the Cleaning Efficacy of Different Final Irrigation Techniques. *J Endod.* 2012;38(6):838–41. doi: 10.1016/j.joen.2012.03.002. PMID: 22595122.

Takehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20(3):340–9. doi: 10.1016/0030-4220(65)90166-0. PMID:

14342926.

Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. *J Endod.* 1999;25(5):364–8. doi: 10.1016/S0099-2399(06)81173-8. PMID: 10530263.

Kato AS, Cunha RS, da Silveira Bueno CE, Pelegri RA, Fontana CE, de Martin AS. Investigation of the Efficacy of Passive Ultrasonic Irrigation Versus Irrigation with Reciprocating Activation: An Environmental Scanning Electron Microscopic Study. *J Endod.* 2016;42(4):659–63. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.016. PMID: 26906240.

Kuruvilla JR, Kamath MP. Antimicrobial activity of 2.5% sodium hypochlorite and 0.2% chlorhexidine gluconate separately and combined, as endodontic irrigants. *J Endod.* 1998;24(7):472–6. doi: 10.1016/S0099-2399(98)80049-6. PMID: 9693573.

Layton G, Wu W-I, Selvaganapathy PR, Friedman S, Kishen A. Fluid Dynamics and Biofilm Removal Generated by Syringe-delivered and 2 Ultrasonic-assisted Irrigation Methods: A Novel Experimental Approach. *J Endod.* 2015;41(6):884–9. doi: 10.1016/j.joen.2015.01.027. PMID: 25749254.

Lee S-J, Wu M-K, Wesselink PR. The effectiveness of syringe irrigation and ultrasonics to remove debris from simulated irregularities within prepared root canal walls. *Int Endod J.* 2004;37(10):672–8. doi: 10.1111/j.1365-2591.2004.00848.x. PMID: 15347291.

Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012;38(6):740–5. doi: 10.1016/j.joen.2012.02.021. PMID: 22595105.

Martinho FC, Gomes BPFA. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008;34(3):268–72. doi: 10.1016/j.joen.2007.11.015. PMID: 18291273.

Martinho FC, de Rabello DGD, Ferreira LL, Nascimento GG. Participation of endotoxin in root canal infections: A systematic review and meta-analysis. *Eur J Dent.* 2017;11(03):398–406. doi: 10.4103/ejd.ejd_84_17. PMID: 28932155.

Menezes ACSC de, Zanet CG, Valera MC. Smear layer removal capacity of disinfectant solutions used with and without EDTA for the irrigation of canals: a SEM study. *Pesqui Odontol Bras.* 2003;17(4):349–55. PMID: 15107918.

Mohammadi Z. Sodium hypochlorite in endodontics: an update review. *Int Dent J.* 2008;58(6):329–41. PMID: 19145794.

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. PMID: 21535021.

Nagendrababu V, Jayaraman J, Suresh A, Kalyanasundaram S, Neelakantan P. Effectiveness of ultrasonically activated irrigation on root canal disinfection: a systematic review of in vitro studies. *Clin Oral Investig*. 2018;22(2):655–70. doi: 10.1007/s00784-018-2345-x. PMID: 29372445.

Neelakantan P, Ounsi HF, Devaraj S, Cheung GSP, Grandini S. Effectiveness of irrigation strategies on the removal of the smear layer from root canal dentin. *Odontology*. 2019;107(2):142–9. doi: 10.1007/s10266-018-0373-2. PMID: 29956060.

Nelson-Filho P, Leonardo MR, Silva LAB, Assed S. Radiographic evaluation of the effect of endotoxin (LPS) plus calcium hydroxide on apical and periapical tissues of dogs. *J Endod*. 2002;28(10):694–6. PMID: 12398166.

Pacheco-Yanes J, Provenzano JC, Marceliano-Alves MF, Gazzaneo I, Pérez AR, Gonçalves LS, et al. Distribution of sodium hypochlorite throughout the mesial root canal system of mandibular molars after adjunctive irrigant activation procedures: a micro-computed tomographic study. *Clin Oral Investig*. 2019. doi: 10.1007/s00784-019-02970-5. PMID: 31240405.

Patan-Zugaj B, Gauff FC, Egerbacher M, Licka TF. Endotoxin-induced changes of type VII collagen- cleaving matrix metalloproteinases in lamellar tissue of extracorporeally perfused equine limbs. *Am J Vet Res*. 2018;79(9):986–94. doi: 10.2460/ajvr.79.9.986. PMID: 30153058.

Plotino G, Pameijer C, Mariagrande N, SOMMA F. Ultrasonics in Endodontics: A Review of the Literature. *J Endod*. 2007;33(2):81–95. doi: 10.1016/j.joen.2006.10.008. PMID: 17258622.

Qiu Z, Chen J, Xu H, Van den Steen PE, Opdenakker G, Wang M, et al. Inhibition of neutrophil collagenase/MMP-8 and gelatinase B/MMP-9 and protection against endotoxin shock. *J Immunol Res*. 2014;2014:747426. doi: 10.1155/2014/747426. PMID: 25762310.

Reynaud af Geijersstam A, Sorsa T, Stackelberg S, Tervahartiala T, Haapasalo M. Effect of *E. faecalis* on the release of serine proteases elastase and cathepsin G, and collagenase-2 (MMP-8) by human polymorphonuclear leukocytes (PMNs). *Int Endod J*. 2005;38(9):667–77. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.01011.x. PMID: 16104981.

Rietschel ET, Brade H, Holst O, Brade L, Müller-Loennies S, Mamat U, et al.

Bacterial endotoxin: Chemical constitution, biological recognition, host response, and immunological detoxification. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1996;216:39–81. PMID: 8791735.

Robinson JP, Macedo RG, Verhaagen B, Versluis M, Cooper PR, van der Sluis LWM, et al. Cleaning lateral morphological features of the root canal: the role of streaming and cavitation. *Int Endod J*. 2018;51:e55–64. doi: 10.1111/iej.12804. PMID: 28654211.

Shin S-J, Lee W, Lee J-I, Baek S-H, Kum K-Y, Shon W-J, et al. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2011;112(4):548–54. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.04.026.

Shin S, Lee J, Baek S, Lim S. Tissue Levels of Matrix Metalloproteinases in Pulp and Periapical Lesions. *J Endod*. 2002;28(4):313–5. doi: 10.1097/00004770-200204000-00013. PMID: 12043871.

Siqueira JF, Rôças IN. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 1--current molecular technologies for microbiological diagnosis. *J Endod*. 2005;31(6):411–23. PMID: 15917679.

van der Sluis LWM. Endodontologie in beweging: nieuwe concepten, materialen en technieken 3. De rol van activatie van wortelkanaalspoelmiddelen tijdens de wortelkanaalbehandeling. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 2015;122(10):533–8. doi: 10.5177/ntvt.2015.10.15181. PMID: 26465016.

van der Sluis LWM, Versluis M, Wu MK, Wesselink PR. Passive ultrasonic irrigation of the root canal: a review of the literature. *Int Endod J*. 2007;40(6):415–26. doi: 10.1111/j.1365-2591.2007.01243.x. PMID: 17442017.

Souza C, Bueno C, Kato A, Limoeiro A, Fontana C, Pelegri R. Efficacy of passive ultrasonic irrigation, continuous ultrasonic irrigation versus irrigation with reciprocating activation device in penetration into main and simulated lateral canals. *J Conserv Dent*. 2019;22(2):155. doi: 10.4103/JCD.JCD_387_18. PMID: 31142985.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994;78(4):522–30. doi: 10.1016/0030-4220(94)90047-7. PMID: 7800383.

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. PMID: 24767562.

Valera MC, Chung A, Menezes MM, Fernandes CEF, Carvalho CAT, Camargo SEA, et al. Scanning electron microscope evaluation of chlorhexidine gel and liquid associated with sodium hypochlorite cleaning on the root canal walls. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010;110(5):e82-7. doi: 10.1016/j.tripleo.2010.04.051. PMID: 20692188.

Valera MC, Maekawa LE, Chung A, Cardoso FGR, Oliveira LD de, Oliveira CL de, et al. The effect of sodium hypochlorite and ginger extract on microorganisms and endotoxins in endodontic treatment of infected root canals. *Gen Dent*. 2014;62(3):25–9. PMID: 24784510.

Vivan RR, Duque JA, Alcalde MP, Só MVR, Bramante CM, Duarte MAH. Evaluation of Different Passive Ultrasonic Irrigation Protocols on the Removal of Dentinal Debris from Artificial Grooves. *Braz Dent J*. 2016;27(5):568–72. doi: 10.1590/0103-6440201600725. PMID: 27982235.

Walmsley AD. Ultrasound and root canal treatment: the need for scientific evaluation. *Int Endod J*. 1987;20(3):105–11. doi: 10.1111/j.1365-2591.1987.tb00600.x. PMID: 3333651.

APÊNDICE A – Detalhamento da metodologia

Aspectos éticos

Este projeto foi submetido para aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNESP em São José dos Campos (ICT-UNESP) (ANEXO A).

Seleção de pacientes

A seleção dos pacientes foi realizada por meio de anamnese, exame clínico e radiográfico (Sensor de Radiografia Digital Imagem Dental Master Fit, Br) em pessoas que acudiram à clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora do Instituto (ICT-UNESP) pela necessidade de realizar um tratamento endodôntico.

Seleção dos casos

O número de casos selecionados teve como base um cálculo amostral prévio. O cálculo amostral considerou uma taxa de sucesso de 98% para o Grupo Controle/ Irrigação Convencional com agulha (G1/CNI) + hidróxido de cálcio e soro fisiológico como medicação intracanal durante o tratamento endodôntico

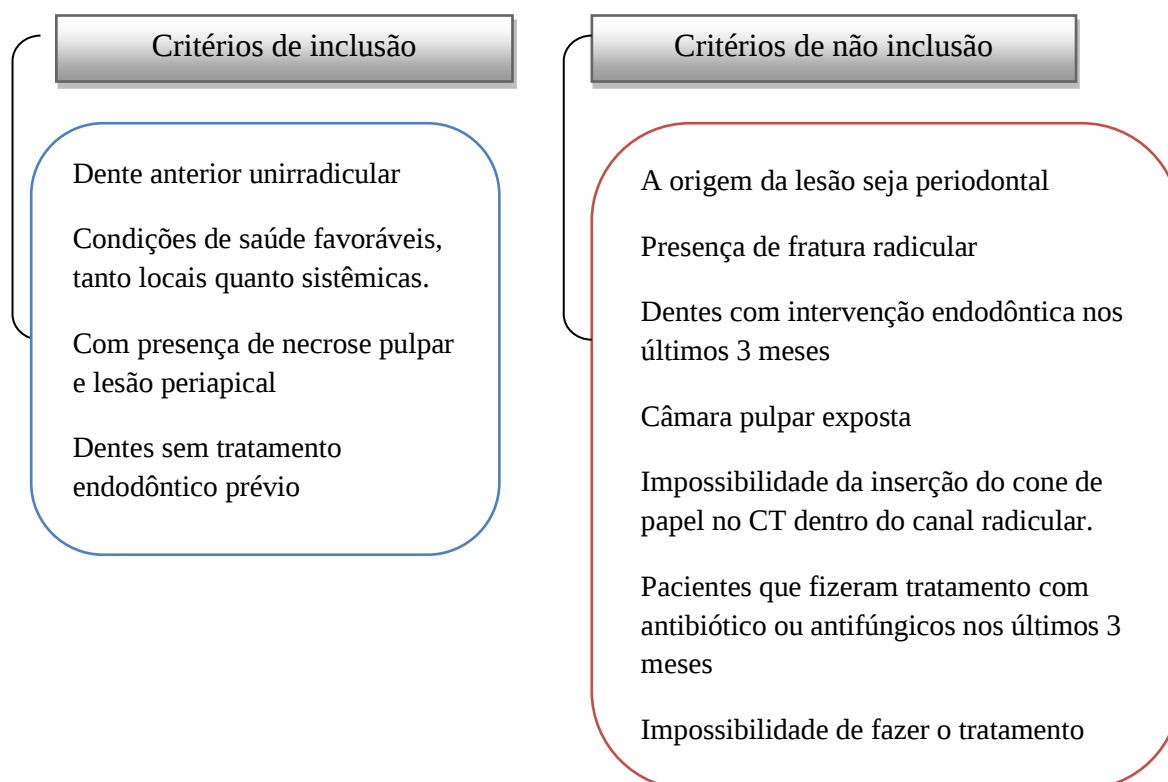
(Fleming, 2010). Assim, atendendo um nível de significância do 5%, um “test power” de 80% e um limite de equivalência de 20%, foi determinado um mínimo de 15 pacientes por grupo para observar uma diferença maior de 20% de sucesso entre os grupos. O cálculo amostral foi realizado usando o site: <https://sealedenvelope.com/power/binary-equivalence/>. Foram selecionados 45 dentes unirradiculares (n=15) com presença de necrose pulpar e lesão periapical (Figura 1), o paciente assinou um termo de consentimento livre e esclarecido fazendo constar que ele forma parte da pesquisa e deverá cumprir com as condições estabelecidas. Os dentes selecionados seguiram critérios de inclusão e exclusão previamente estabelecidos, foram inclusos dentes unirradiculares com presença de necrose pulpar e lesão periapical, foram excluídos os casos de dentes com tratamento endodôntico prévio, com presença de doença periodontal, fratura radicular, exposição da camará pulpar ao meio bucal, pacientes em uso de antibióticos ou antifúngicos em um período menor de três meses prévio ao tratamento endodôntico, impossibilidade de vedamento absoluto prévio e após tratamento ou impossibilidade de inserção do cone de papel para a coleta das amostras no interior do canal radicular no comprimento pré-odontométrico (Figura 2). Foram anotados os dados pessoais de cada um dos pacientes e se realizou uma historia medica-odontologica, obtendo informação dos sinais e sintomas, dados como a presença de fistula ou edema, presença de restaurações ou caries e fraturas também foram coletados. Foram realizadas provas de dor à percussão, palpação ou presença de mobilidade, Além de ter realizado uma criteriosa sondagem periodontal. Os pacientes para sua intervenção estiveram em condições de saúde favoráveis, tanto locais quanto sistêmicas que permitam a realização do tratamento. Esses pacientes inclusos foram submetidos à CBTC no departamento de Radiologia do próprio instituto (ICT-UNESP) para a avaliação do caso e confirmação da destruição óssea periapical na região do dente em seleção.

Figura 1 – Radiografia digital do dente com presença de necrose pulpar e lesão periapical selecionado para tratamento endodôntico



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – Descrição dos critérios de inclusão e exclusão



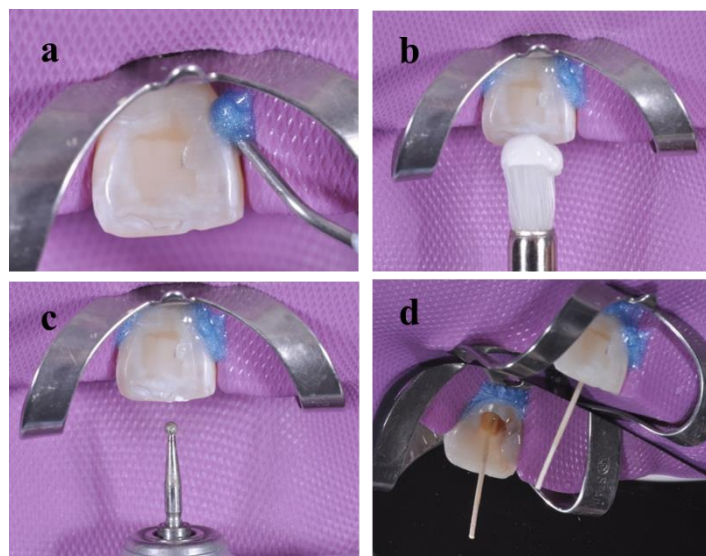
Fonte: Elaborado pelo autor.

Intervenção Odontológica e Sequência do tratamento

Todos os instrumentais e materiais utilizados foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 horas) e todos os passos subsequentes foram realizados de forma asséptica.

Inicialmente os pacientes foram submetidos à anestesia na região do elemento dentário e o mesmo foi individualmente isolado da cavidade oral com auxílio de grampos (S.S. White Duflex, Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e lençol de borracha (Madeitex, São José dos Campos, SP, Brasil). Depois os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) e um vedamento da interface coroa/lençol foi feito utilizando uma barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam – FGM Produtos Odontológicos, Joinville, SC, Brasil). O dente isolado recebeu profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ Brasil) e escova de Robinson (Microdont – Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Em seguida, foi realizada a desinfecção do campo operatório utilizando cotonetes (Jiangsu Medical Materials Co. Ltda, Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Para evitar a contaminação química do canal radicular com essa solução e a interferência com a cultura microbiológica, foi realizada a neutralização do hipoclorito de sódio com tiosulfato de sódio 5% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Se realizou abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica apirogênica. Terminada a abertura coronária, foi realizada a **1ª Coleta** do conteúdo do canal radicular (Figura 3).

Figura 3 – Intervenção odontológica



Legenda: a) Isolamento do campo operatório e selamento com barreira gengival fotopolimerizável; b) profilaxia do campo operatório com escova de Robson e pasta profilática; c) abertura coronária; d) primeira coleta com cone de papel absorvente

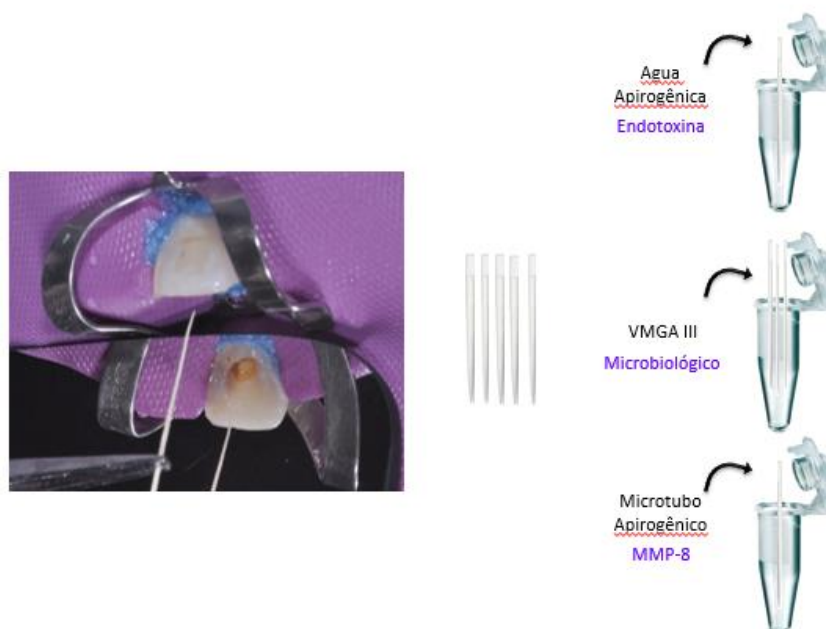
Fonte: Elaborado pelo autor.

Coletas do conteúdo do canal radicular

Para a coleta de amostras do canal radicular, 5 cones de papel apirogênicos foram introduzidos um de cada vez no interior do canal radicular, respeitando-se o comprimento pré-odontométrico (CPO) permanecendo nesta posição por 60 segundos. O primeiro cone de papel introduzido no canal radicular foi armazenado em microtubo (1,5 mL) (Axygen INC, Union City, CA, USA) estéril e apirogênico, contendo 1 mL de água apirogênica (Equipler Indústria Farmacêutica, Aparecida de Goiânia, GO, Brasil) para posterior análise de endotoxinas. Os próximos 3 cones de papel foram armazenados em microtubo (1,5 mL) esterilizado contendo 1 mL de VMGA III (Viability Medium Göteborg Agar) para posterior análise microbiológica, o quinto e último cone foi introduzido um mm Além do comprimento real do dente para a coleta do

substrato intersticial periapical e armazenado em um microtubo aprotogênico para análise de MMP-8 (a primeira coleta omite este quinto cone) (Figura 4).

Figura 4 – Coletas do conteúdo do canal radicular



Fonte: Elaborado pelo autor.

Divisão dos grupos experimentais

Os grupos foram divididos conforme o protocolo final de irrigação após preparo biomecânico: Irrigação Convencional com agulha (G1/CNI), Ativação Ultrassônica Passiva (G2/PUA) e Ativação Ultrassônica Contínua (G3/CUA) (Quadro 1). Para a divisão dos grupos, foi realizada randomização de acordo com o *Consort 2010 - Consolidated Standards of Reporting Trials* (Schulz, 2010), a partir do sorteio de papéis com o tipo de tratamento a ser executado antes do procedimento.

Divisão dos grupos experimentais

Divisão dos grupos experimentais			
Grupos	n	Irrigação Final	Procedência
CNI (G1)	15	NaOCl 2.5%: 8ml (Total 1 min)	Byoformula, São José dos Campos, SP, Brasil
PUA (G2)	15	NaOCl 2.5%: 4 ml + 30 s de PUI + 4 ml + 30 s de PUI (Total 1 min)	
CUA (G3)	15	NaOCl 2.5%: 8ml de CUI (Total 1 min)	

Fonte: Elaborado pelo autor.

Preparo Biomecânico

Uma vez feita a **1ª Coleta**, o preparo dos canais radiculares foi executado por um único operador, com o sistema de lima única de Níquel Titânio Reciproc R40 (VDW GmbH, Munich, Germany) conicidade 40/.06 e motor específico VDW Silver Reciproc. O preparo foi efetuado em sentido coroa-ápice, realizando neutralização por terços cervical, médio e apical. A odontometria foi feita com o uso do localizador apical *RomiApex* (RomiBras LTDA, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Foi realizado desbridamento foraminal com lima #30 tipo K e o comprimento de trabalho será determinado subtraindo 1 mm do comprimento total do dente. Durante o preparo do canal radicular foram utilizados 24 ml de

solução de hipoclorito de sódio 2.5%, divididos nos terços cervical, médio e apical.

No **Grupo 1** (Irrigação Convencional com agulha/CNI) o terço apical foi irrigado da mesma forma que os terços cervical e médio com 8ml de NaOCl 2.5% (Byoformula, São Jose dos Campos, SP, Brasil), seguido da neutralização com tiosulfato de sódio e irrigação com 10 ml de solução salina fisiológica foi realizada a **2ª Coleta**. Após os canais foram inundados com 1mL de EDTA 17% (Inodon, Porto Alegre, RS, Brasil) apenas agitados com lima manual por 5 minutos, depois o canal foi irrigado com 10 ml de solução salina fisiológica.

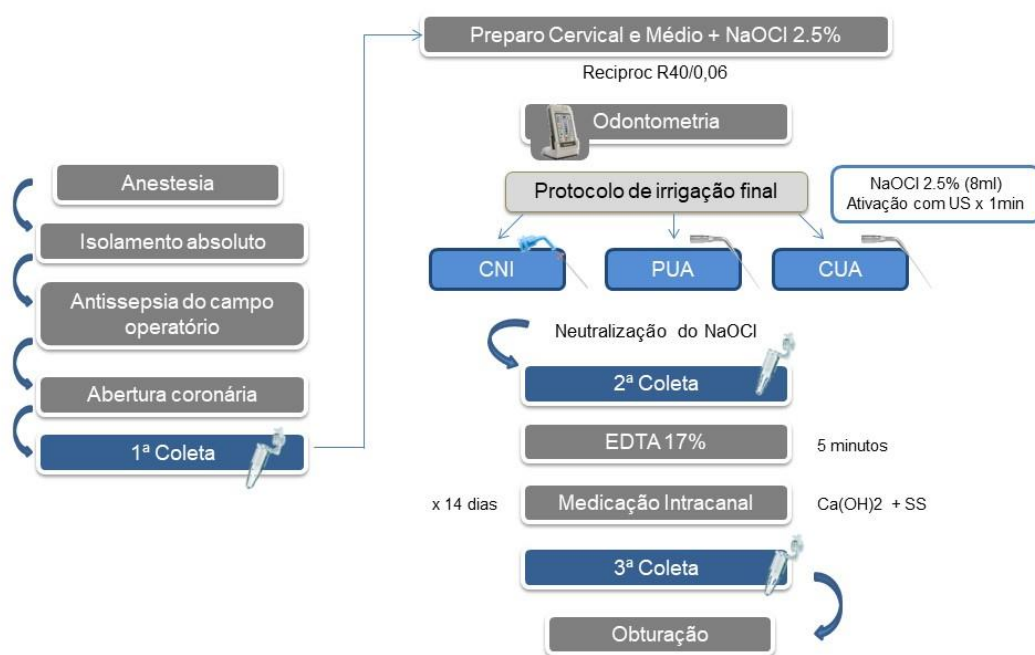
No **Grupo 2** (Ativação Ultrassônica Passiva/PUA) o canal foi irrigado com 4 ml de NaOCl 2.5% seguido de uma agitação ultrassônica de forma passiva por 30 segundos com ponta Irrisonic E1, na sequencia o canal foi irrigado novamente com 4 ml de hipoclorito de sodio 2.5% e agitado mais uma vez passivamente com ultrassom por 30 segundos, colocando o inserto ultrassônico 2 mm aquém do comprimento real do dente, o tempo total de ativação foi de 1 minuto e um volume de 8 mL de solução foi utilizado. Após isso o NaOCl foi neutralizado com 5mL de Tiosulfato de Sódio 5% e 10mL de solução salina fisiológica para realizar a **2ª Coleta** do conteúdo do canal radicular. Em seguida o canal foi preenchido com 1 mL de EDTA 17% permanecendo no canal ate completar 5 minutos agitado apenas com lima manual, o canal foi irrigado com 10 ml de solução salina fisiológica para a inativação do EDTA.

No **Grupo 3** (Ativação Ultrassônica Continua/CUA) o canal foi irrigado de forma ininterrupta, utilizando 8 ml de NaOCl 2.5% junto a uma ativação ultrassônica mantendo um fluxo continuo da solução ao interior do canal radicular por 60 segundos. A ponta do ultrassom Irrisonic E1 foi colocada 2 mm aquém do comprimento real do dente e a solução foi entregue com uma ponta NaviTip (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT) ao interior do canal concomitante à ativação. Depois de efetuado o protocolo de irrigação, o NaOCl foi neutralizado com 5mL de Tiosulfato de Sódio 5% e 10mL de solução salina fisiológica para

realizar a **2ª Coleta** do conteúdo do canal radicular. Em seguida o canal foi preenchido com 1 mL de EDTA 17% permanecendo no canal por 5 minutos, em seguida o canal foi irrigado com 10 ml de solução salina fisiológica para sua remoção.

Para agitação com ultrassom foi utilizada a ponta Irrisonic E1 (Helse Dental Technology Santa Rosa de Viterbo, SP, Brasil). A ponta foi inserida no aparelho ALT (Equipamentos Médicos e Odontológicos, Campos Elíseos Ribeirão Preto, SP, Brasil) com potência mínima de 10000 hz; e colocada 2 mm aquém do comprimento real do dente, evitando, o contato com as paredes do canal radicular. A figura 5 ilustra a sequência dos procedimentos realizados.

Figura 5 – Sequência do tratamento e divisão dos grupos experimentais



Fonte: Elaborado pelo autor.

Medicação intracanal

Os canais foram secos com cones de papel estéreis e preenchidos com Medicação Intracanal (MIC) de Hidróxido de Cálcio (Biodinâmica, Ibirapurã, PR, Brasil) e Solução Salina Fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) por um período de 14 dias. A associação da medicação foi realizada na proporção 1:1 em volume e levada ao interior do canal radicular com auxílio de um lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments AS, Ballaigues, Switzerland) até o completo preenchimento do canal. Em seguida os dentes foram selados com uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) seguida da restauração provisória com cimento de ionômero de vidro (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

Após duas semanas o paciente foi novamente submetido à anestesia e a restauração provisória foi retirada de forma asséptica semelhante à primeira sessão previa à abertura coronária. A MIC foi retirada com ajuda de uma lima tipo Kerr 30 e 20 ml de solução salina estéril e em seguida a **3ª Coleta** do conteúdo do canal radicular foi realizada de forma semelhante à 2ª coleta.

Obturação

Depois da remoção da MIC, o canal foi preenchido com EDTA 17% durante 5 minutos, seguido de 10 ml de solução salina fisiológica, e em seguida o canal foi seco com pontas de papel. Os casos que se apresentaram sem dor, sem odor e sem a presença de exudato, foram obturados com cones de guta-percha Reciproc R40 (VDW, Munich, Germany) previamente desinfetados em NaOCl

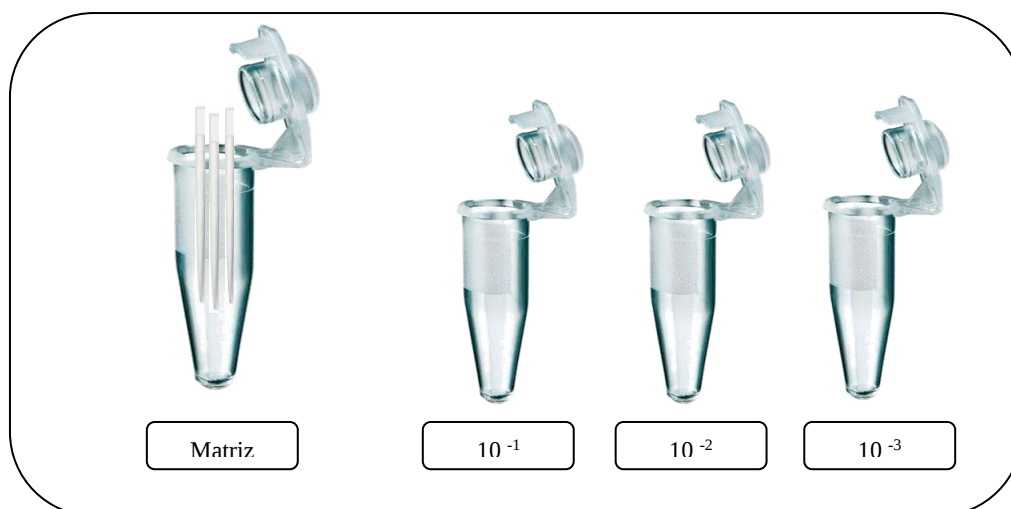
5.25% por 5 minutos e cimento obturador AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). Foram realizadas radiografias para comprovação do limite adequado da obturação, tal como seu preenchimento em lateralidade. A guta-percha foi cortada dois milímetros abaixo da coroa clínica e seguido do selamento do dente com uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e resina fotopolimerizável (*Filtek Z250 XT*, 3M ESPE).

Análise de Cultura Microbiana

Para todas as coletas, a atividade antimicrobiana foi avaliada pela contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) de micro-organismos remanescentes no canal radicular. O microtubo (1,5mL) contendo os 3 cones de papel (amostra matriz) armazenados em 1 mL de meio de transporte pré-reduzido VMGA III foi agitado por 60 segundos em *vórtex* até a dessorção do conteúdo para facilitar a dispersão dos micro-organismos. Em seguida, foram realizadas diluições seriadas transferindo 100 µL da amostra matriz para microtubos com a diluição 10^{-1} e assim consecutivamente até a diluição 10^{-3} em tubos microtubos (1,5 mL) contendo 900 µL de Caldo Infuso Cérebro Coração (BHI) (*Brain Heart Infusion Broth* - HiMedia Laboratories Pvt. Ltda, Mumbai, Índia) (Figura6). Para a detecção de micro-organismos aeróbios, foram semeados 50 µL da amostra matriz (sem diluição) e 50 µL da diluição 10^{-3} em placas de Petri (Interlab distribuidora de produtos científicos, São Paulo, SP, Brasil) contendo *BHI* (*Brain Heart Infusion* – HiMedia – Mumbai, India) acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Essas placas foram armazenadas em estufa bacteriológica por 2 dias, para permitir a detecção de micro-organismos aeróbios. Para a detecção de micro-organismos anaeróbios e facultativos foram semeados 50 µL da amostra matriz (sem diluição) e 50 µL da diluição 10^{-3} em

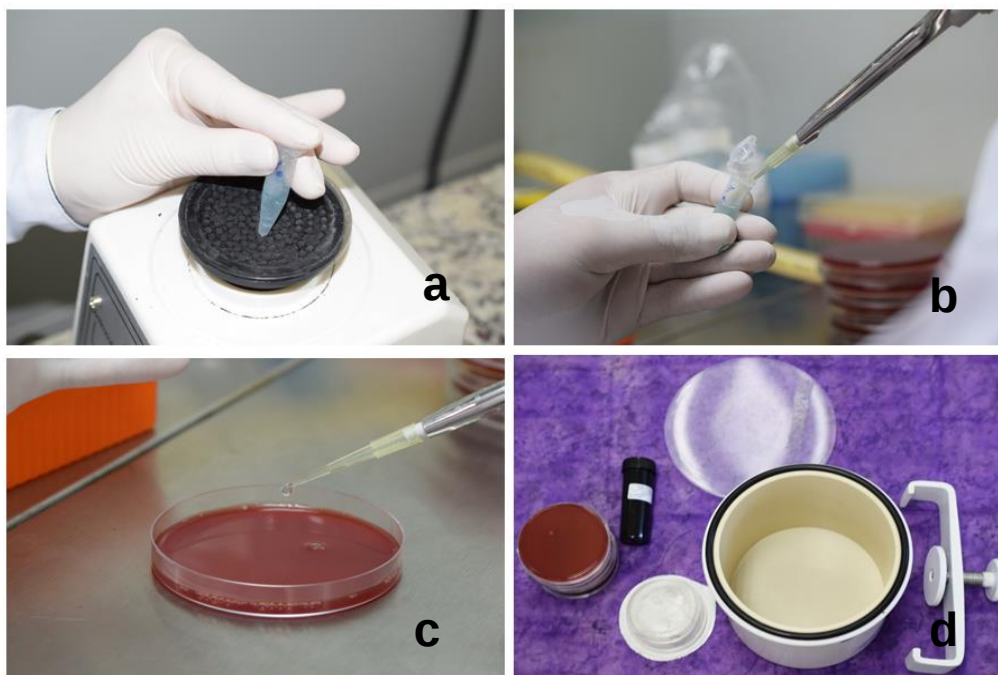
placas de Petri (Interlab distribuidora de produtos científicos, São Paulo, SP, Brasil) contendo *Fastidious Anaerobe Agar* (FAA – Neogen Corporation, Michigan, USA), acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado suplementados por hemina (5 mg/L) e vitamina K1 (1 mg/L). As placas foram incubadas em jarra de anaeróbiose à 37°C por 14 dias (Figura 7). O número de unidades formadoras de colônias (UFCs) foi determinado a partir da contagem do número de colônias nas placas analisadas. Para a obtenção do número de UFCs presentes na amostra por mL (amostra inicial) foi necessário multiplicar por 20 ou 20.000 o número de UFCs observadas na contagem das placas, dependendo da diluição utilizada. A escolha da placa para contagem de UFCs esteve relacionada à possibilidade de contar de forma individual o número de UFCs presentes. Quando não possibilitado a contagem na amostra inicial, foi utilizada a diluição 10^{-3} . Ou seja, quando a diluição 10^{-3} foi escolhida, o valor correspondente a essa diluição é 1000 vezes menor que o inicial (1 mL). A alíquota plaqueada foi de 50 μ L, ou seja, 20 vezes menor que 1 mL. Portanto o fator de multiplicação do número de UFCs obtido foi 20.000.

Figura 6 – Diluições seriadas a partir da amostra matriz



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 7 – Análise da presença de micro-organismos e contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL)



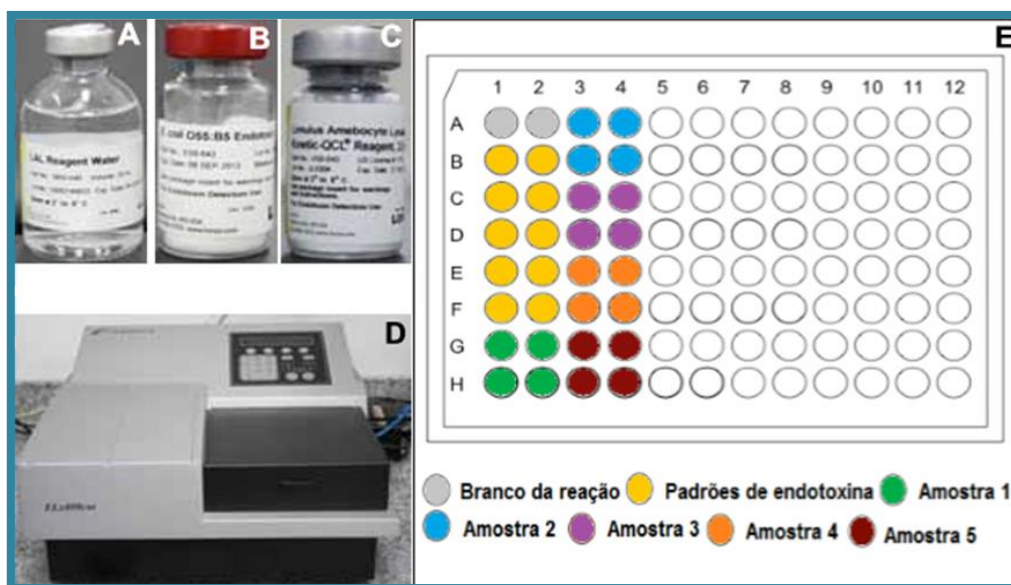
Legenda: a) Agitação de eppendorf contendo VMGA e cones de papel absorvente com coletas do conteúdo do canal radicular; b e c) plaqueamento das amostras das coletas do conteúdo do canal radicular; d) Jarra de anaeróbiose onde foram incubadas as placas por 14 dias a 37°C em estufa
Fonte: Elaborado pelo autor.

Quantificação de Endotoxinas

Para verificar a neutralização de endotoxinas, as amostras coletadas dos canais radiculares foram submetidas à análise quantitativa pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (cinético QCL - LAL) (Lonza, Walkersville, MD, EUA). Inicialmente foi realizada uma curva-padrão. O controle padrão de endotoxina de *Escherichia coli* foi reconstituído com um volume especificado, no certificado de qualidade, da água apirogênica. Esta suspensão contém 50 EU/mL. Foram realizadas diluições a partir deste padrão de endotoxina em diferentes concentrações (50; 5; 0,5; 0,05; 0,005 EU/mL). Para

cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina). Em uma placa apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas do canal radicular e os controles positivos (Figura 8). A placa foi incubada no leitor cinético QCL a 37 ± 1 °C por 10 minutos, o qual esteve acoplado a um microcomputador com *software WinkQCL™* específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. Após, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta multicanal e ponteiras apirogênicas. Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorava, de forma contínua, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O *software WinkQCL™* automaticamente foi calcular uma correlação linear log/log do tempo de reação de cada padrão com a concentração de endotoxina correspondente. Os parâmetros da curva-padrão foram impressos no relatório.

Figura 8 – Quantificação de endotoxinas



Legenda: a) água apirogênica; b) endotoxina padrão de *E. coli*; c) reagente cinético cromogênico do LAL; d) leitor cinético QCL; e) esquema de montagem da placa de 96 poços

Fonte: Elaborado pelo autor.

Quantificação de Metaloproteinase da matriz 8 (MMP-8/Colagenase)

Microplacas de 96 poços (Nunc) serão sensibilizadas com anticorpo de captura anti-MMP-8 (R&D Systems, NE), mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas serão lavadas com PBS contendo Tween 20 (PBS-T) e bloqueadas com soro albumina bovina (BSA, 0,1%) por 1 hora. Após, as placas serão lavadas com PBS-T e receberão os sobrenadantes da cultura de células (100 µL por poço) e os padrões da MMP-8 com concentrações conhecidas (curva-padrão). Os testes serão realizados em duplicata. Após duas horas, as placas serão lavadas (PBS-T) e serão acrescentados anticorpos de detecção anti-MMP-8 marcados com biotina. Após 2 horas, a reação será revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. A reação será bloqueada após 20 minutos com ácido sulfúrico 2N. As densidades ópticas (DO) serão lidas no leitor de microplacas (Biotek) com comprimento de onda de 450 nm. Após obtenção das DO serão determinados os níveis de Metaloproteinase da matriz 8 das amostras de sobrenadantes celulares com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa

UNESP - INSTITUTO DE
CIÊNCIA E TECNOLOGIA -
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS

**COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Irrigação Ultrassônica Passiva x Contínua na infecção endodôntica primária: ação na microbiota presente, endotoxinas e perfil inflamatório.

Pesquisador: Marcia Carneiro Valera

Versão: 2

CAAE: 83576418.0.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 013753/2018

Patrocinador Principal: FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO

Informamos que o projeto Irrigação Ultrassônica Passiva x Contínua na infecção endodôntica primária: ação na microbiota presente, endotoxinas e perfil inflamatório. que tem como pesquisador responsável Marcia Carneiro Valera, foi recebido para análise ética no CEP UNESP - Instituto de Ciência e Tecnologia - Campus de São José dos Campos em 24/02/2018 às 18:48.

Endereço: Av.Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br

ANEXO B — Fluxograma do Atendimento Clínico

