

Cláudio Antonio Talge Carvalho

Avaliação e correlação da presença de
endotoxinas e MMP-3, -8 e -9 em canais
radiculares com necrose pulpar submetidos ao
tratamento endodôntico - estudo *in vivo*



2011

Cláudio Antonio Talge Carvalho

Avaliação e correlação da presença de endotoxinas e MMP-3, -8 e -9 em
canais radiculares com necrose pulpar submetidos ao tratamento
endodôntico - estudo *in vivo*

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de São José dos Campos,
UNESP – Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Livre-Docente do Departamento de Odontologia
Restauradora.

São José dos Campos

2011

C253a Carvalho, Cláudio Antonio Talge.

Avaliação e correlação da presença de endotoxinas e MMP-3, -8 e -9 em canais radiculares com necrose pulpar submetidos ao tratamento endodôntico - estudo *in vivo* / Cláudio Antonio Talge Carvalho . - São José dos Campos: [s.n.], 2011.

122 .f. : il.

Tese (Livre Docência) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2011.

1. Endotoxina. 2. Metaloproteínase da Matriz. 3.Necrose Pulpar. 4. Irrigantes do Canal Radicular. 5. Polimixina B. 6. Hidróxido de cálcio. 7. Hipoclorito de sódio. I. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. II. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho". III. UNESP – Univ Estadual Paulista. IV. Título

tD24

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 30 de Agosto de 2011 .

Assinatura :

E-mail: claudiotalge@fosjc.unesp.br

BANCA EXAMINADORA

Profa. Titular Marcia Carneiro Valera Garakis

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Professor Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos

UNESP – Universidade Estadual Paulista

Professor Titular Giulio Gavini

Faculdade de Odontologia de São Paulo

Universidade Estadual de São Paulo – USP

Profa. Titular Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Universidade de Campinas – UNICAMP

Professor Adjunto Caio Cezar Randi Ferraz

Faculdade de Odontologia de Piracicaba

Universidade de Campinas – UNICAMP

São José dos Campos, 1 de novembro de 2011

DEDICATÓRIA

A DEUS, meu sustentador e protetor. Tudo de bom que existe em minha vida vem de ti! Um DEUS tão maravilhoso que mesmo sendo o Rei dos Reis, se inclina para ouvir e atender aos nossos anseios e desejos e que mesmo diante de nossas imperfeições está sempre junto, abençoando a nossa vida. Eu nada seria sem Ele.

Quem teme ao DEUS eterno terá uma vida longa, feliz e tranqüila

Provérbios 19:23

DEDICATÓRIA

A minha amada família Luciane e Guilherme. Vocês são o motivo e o estímulo de tudo em minha vida, a razão da minha felicidade. Sou muito feliz por compartilhar com vocês os melhores momentos de minha vida, pois estar ao lado de vocês é o que me basta para ser feliz. Muito obrigado por tudo o que são para mim... minha vida!

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À Profa. Titular Marcia Carneiro Valera Garakis

Obrigado por tudo que tenho aprendido com a senhora, desde o meu primeiro resumo de artigo até este momento. Obrigado por todo apoio, e incentivo. A senhora sempre será a professora em quem me espelharei. Muito obrigado também por sua amizade, pois a senhora e sua família são muito especiais e importantes para mim e minha família

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À meus queridos pais Antonio e Graça

**Tenho muito a agradecer, pois vocês fazem parte de tudo o que sou
hoje. Muito obrigado por toda a dedicação e amor que sempre
tiveram por mim e por meus irmãos. Espero ser um bom pai para
meu filho assim como vocês são para mim.**

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista, por todas as oportunidades, desde os meus cursos de mestrado e doutorado até este momento. Tenho muito orgulho de ser docente desta casa, uma das melhores universidades do Brasil e, que sempre me acolheu tão bem.

A todos os docentes do nosso campus que tornam nosso convívio mais agradável. Em especial aos docentes do nosso Departamento de Odontologia Restauradora: Profa. Maria Amélia, Prof. José Roberto, Professor Clóvis Pagani, Professora Marcia Valera, Professor Sérgio Gonçalves, Professora Maria Filomena, Professora Ana Paula, Professor César, Professor Carlos Henrique, Professor Carlos Torres e Professora Alessandra Borges e os professores aposentados mas não menos queridos Alberto Siqueira, João Cândido, Regina Célia e Roselene Araújo.

Aos funcionários do nosso departamento: Rosangela, nossa secretaria sempre dedicada e organizada a ajudar, as técnicas Josiana e Fernanda, pela presteza, amizade e convívio harmonioso que temos diariamente e a Dona Marinete que é responsável pelo nosso cafezinho e pãozinho quente sempre contagiando-nos com sua alegria.

Às secretárias da DTA, Sandra Mara e Lilian Faria, por todo o auxílio, esclarecimento, presteza e atendimento sempre cordial que vocês prestam a todos nós.

A todos os meus ex-orientados da pós-graduação: Paula, Giovanna, Elaine, Marcos, Alessandra e Mariana e às minhas atuais orientadas: Ana Cláudia e Sarah. Todos vocês tiveram grande participação no meu amadurecimento não somente como pesquisador e orientador, mas também como pessoa.

Ao Prof. Titular Antonio Olavo Cardoso Jorge, pela oportunidade de poder compartilhar de seus conhecimentos e inteligência e também pela chance de podermos realizar trabalhos em conjunto e, ainda por poder utilizar as dependências dos laboratórios da microbiologia.

A Profa. Titular Maria Amélia Máximo de Araújo, por ser para mim um exemplo de dedicação a nossa escola. Tenho muito admiração e respeito pela senhora.

À FAPESP por todo suporte que tem me dado e principalmente pela concessão do auxílio pesquisa regular que possibilitou a realização desta pesquisa.

Ao Professor Ivan Balducci por sua amizade e pela realização da análise estatística deste trabalho.

Ao Carlos Guedes por toda participação e apoio que tem nos dado em todos os nossos processos junto a agencias de fomento.

Não tentes ser bem sucedido, tenta antes
ser um homem de valor.

Albert Einstein

SUMÁRIO

RESUMO	12
ABSTRACT	14
1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1 Endotoxinas em canais radiculares	19
2.2 Metaloproteinases da matriz – envolvimento nas alterações pulpare e periapicais	30
3 PROPOSIÇÃO	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1 Seleção dos pacientes	45
4.2 Coleta de dados clínicos	46
4.3 Preparo dos canais radiculares – Grupos experimentais	47
4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular	55
4.5 Quantificação de endotoxinas (LPS) pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de Limulus (LAL)	56
4.6 Detecção e quantificação de metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9) – teste imunoenzimático ELISA	58
5 RESULTADOS	62
5.1 Quantificação de endotoxinas	62
5.2 Detecção e quantificação de metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9)	68
5.2.1 MMP-3	68
5.2.2 MMP-8	73
5.2.3 MMP-9	77
5.3 Correlação entre Endotoxinas e MMPs	81
5.3.1 Correlação entre a quantidade de endotoxinas e MMPs presentes em cada coleta durante o tratamento endodôntico	81
5.3.2 Correlação entre os valores de percentual de redução entre a quantidade de Endotoxinas e de MMPs entre as coletas	83
6 DISCUSSÃO	85
6.1 Metodologia	85
6.2 Resultados	88
6.2.1 Endotoxinas	88

3. PROPOSIÇÃO

As propostas deste estudo foram:

A) avaliar *in vivo* os níveis de endotoxinas e metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9) em canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente, antes, durante e após a realização do preparo biomecânico utilizando associação de diferentes agentes irrigantes e medicação intracanal.

B) verificar as possíveis correlações existentes entre as quantidades de endotoxinas presentes nos canais radiculares e os níveis de MMP-3, -8 e -9 em todas as coletas realizadas durante o tratamento endodôntico.

6.2.2	MMP-3, MMP-8 e MMP-9.....	95
6.2.3	Correlação entre endotoxinas e MMPs em canais radiculares.....	101
7	CONCLUSÕES.....	104
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	105
ANEXO 1		122

Carvalho, C.A.T. Avaliação e correlação da presença de endotoxinas e MMP-3, -8 e -9 em canais radiculares com necrose pulpar submetidos ao tratamento endodôntico - estudo *in vivo* [Tese]. São José dos Campos, UNESP – Universidade estadual Paulista; 2011.

RESUMO

Sabendo do envolvimento de endotoxinas e diferentes metaloproteinasas da matriz (MMPs) no desenvolvimento de alterações periapicais, o objetivo desta pesquisa foi avaliar e correlacionar a presença de endotoxinas e MMP-3, MMP-8 e MMP-9 em canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical antes, durante e após a realização do preparo biomecânico (PBM) utilizando associação de diferentes agentes irrigantes e medicação intracanal. Foram selecionados 33 dentes unirradiculares com diagnóstico de necrose pulpar e que apresentavam lesão periapical visível radiograficamente. Imediatamente após a abertura coronária foi realizada a 1ª coleta do conteúdo do canal radicular. Em seguida, todos os canais tiveram os terços cervical e médio preparados utilizando 4 instrumentos oscilatórios (EndoEze) com NaOCl 2,5% como agente irrigante. Após, para preparo manual do terço apical, os dentes foram divididos em 3 grupos de acordo com o protocolo de irrigação: G1) NaOCl 2,5% (4 limas manuais); G2) NaOCl 2,5% (2 limas manuais) + água de cal [$\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,14%] (2 limas manuais) e G3) NaOCl 2,5% (2 limas manuais) + polimixina B (2 limas manuais). Após PBM foi realizada a 2ª coleta e após o uso do EDTA foi realizada a 3ª coleta. A 4ª coleta foi realizada 14 dias após a colocação da medicação intracanal [pasta de clorexidina gel 2% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$]. A quantificação de endotoxinas foi realizada através do teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL) e a quantificação de MMPs pelo teste imunoenzimático ELISA. Os resultados foram analisados estatisticamente [Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%) e Correlação Ordinal de Sperman]. Foi observada presença de endotoxinas em 100% dos casos e o grupo G3 foi o que apresentou maiores valores de redução de endotoxinas da 1ª para 2ª coleta (97%), sendo estatisticamente semelhante a G2 (84,2%) e diferente de G1 (49,4%) ($p < 0,05$). A MIC promoveu importante redução de endotoxinas, sem diferença entre os grupos. Para os valores de MMP-3, -8 e -9 não foram verificadas diferenças estatísticas significantes entre os grupos, entretanto, a maioria dos casos apresentou altos valores de

MMP-8 e MMP-9 na 1ª coleta, os quais foram significativamente reduzidos ao longo do tratamento endodôntico. Os valores de MMP-3 foram baixos em todas as coletas. Embora houve redução tanto de endotoxinas como de MMP-8 e MMP-9 durante o tratamento, não foram observadas correlações estatísticas importantes entre elas. Assim, pode-se concluir que a utilização associada de NaOCl 2.5% com polimixina B ou com água de cal foi mais efetiva em neutralizar endotoxinas durante preparo biomecânico e que a medicação intracanal promoveu importante neutralização de endotoxinas. E ainda, os níveis de MMP-8 e MMP-9 foram significativamente reduzidos ao longo do tratamento endodôntico, demonstrando importância destas MMPs no monitoramento clínico do tratamento e que não foi possível traçar uma correlação estatística direta entre presença de endotoxinas e MMPs.

Palavras-chave: Endotoxinas. Metaloproteinases da matriz. Necrose pulpar. Irrigantes do canal radicular. Polimixina B. Hidróxido de cálcio. Hipoclorito de sódio.

Carvalho CAT. Evaluation and correlation of endotoxins and MMP-3, -8 and -9 in root canals with necrotic pulp submitted to endodontic treatment – in vivo study [Thesis]. São José dos Campos, UNESP – Paulista State University; 2011.

ABSTRACT

It is known that endotoxin and various matrix metalloproteinases (MMPs) are involved in the development of periapical lesions. The purpose of this study was to evaluate and correlate the presence of endotoxins and MMP-3, MMP-8 and MMP-9 in root canals of teeth with necrotic pulp and periapical lesion before, during and after the biomechanical preparation (PBM) using a combination of different irrigation solutions and intracanal dressing. Thirty-three single-root teeth with a diagnosis of pulp necrosis and periapical lesion radiographically visible were selected. Immediately after the coronal opening was collected the first sample from the root canal content. Then, all canals were prepared (cervical and middle thirds) by oscillatory instruments (EndoEze) and irrigated by 2.5% NaOCl. After, a manual preparation was made for the apical third and the teeth were divided into three groups according to the irrigation protocol: G1) 2.5% NaOCl (4 manual files); G2) 2.5% NaOCl (2 manual files) + [Ca (OH)₂ 0.14%] (2 manual files) and G3) 2.5% NaOCl (2 manual files) + polymyxin B (2 manual files). After the PBM, the second sample was collected; then the third collect was performed after using EDTA final flush. The fourth sample was collected 14 days after placing the dressing [2% chlorhexidine gel + Ca(OH)₂]. Quantification of endotoxins was performed by a kinetic chromogenic lysate from amoebocytes of *Limulus* (LAL) and quantification of MMPs by ELISA assay. The results were analyzed statistically by Kruskal-Wallis and Dunn's test (5%) and ordinal Spearman correlation. Presence of endotoxin was observed in 100% of cases and G3 showed the greatest reduction of endotoxins from the 1st to the 2nd samples (97%), being statistically similar to G2 (84.2%) and different from G1 (49.4%) ($p < 0.05$). The intracanal dressing promoted a significant reduction of endotoxin, no difference among the groups. For MMP-3, -8 and -9 values no statistically significant differences were observed among the groups, however, the most of the cases showed high values of MMP-8 and MMP-9 in the 1st sample, which were significantly reduced during endodontic treatment. The values of MMP-3 were low in all samples. Although there was a reduction of both endotoxins as MMP-8 and MMP-9 during treatment, there were no significant statistical correlations between

them. Thus, it can be concluded that the association of NaOCl 2.5% and polymyxin B or [Ca (OH)₂ 0.14%] were more effective in neutralizing endotoxin during biomechanical preparation and intracanal dressing promoted an important neutralization of endotoxin. Furthermore, the MMP-8 and MMP-9 levels were significantly reduced during the endodontic treatment, demonstrating the importance of these MMPs in clinical monitoring of treatment and it was not possible to draw a direct statistical correlation between the presence of endotoxins and MMPs.

Keywords: Endotoxins. Matrix metalloproteinases. Pulp necrosis. Root canal irrigants. Polymyxin B. Calcium hydroxide. Sodium hypochlorite.

1 INTRODUÇÃO

As infecções de dentes com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente são causadas especialmente por bactérias anaeróbias Gram-negativas, pertencentes aos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Tannerella*, *Treponema* e *Dialister* (Gomes et al., 2006; Siqueira Jr et al., 2008; Rôças & Siqueira Jr, 2008; Narayanan & Vaishnavi, 2010; Montagner et al., 2010; Mohammadi, 2011). Dentre os principais fatores de virulência, as bactérias Gram-negativas possuem endotoxinas (complexos lipopolissacarícos, LPS) na membrana externa da parede celular, as quais são liberadas durante a duplicação ou morte destas bactérias. As endotoxinas podem promover diversos efeitos biológicos, que levam a amplificação das reações inflamatórias e imunológicas (Stashenko et al., 1998; Khabbaz et al., 2000), incluindo reabsorção dos tecidos mineralizados (Dahlén et al., 1981; Leonardo et al., 2004, Nair, 2004; Hong et al., 2004; Islam et al., 2007).

As endotoxinas atuam sobre diferentes tipos celulares (em especial, macrófagos e monócitos), induzindo a produção de mediadores químicos da resposta inflamatória, como fator de necrose tumoral (TNF), interleucinas (IL-1, IL-6, IL-8), prostaglandinas, interferons α , β , γ e óxido nítrico (Safavi & Nichols, 1993; Leonardo et al., 2004; Hong et al., 2004; Janeway et al., 2006), além de ativar sistema complemento e promover ativação policlonal de linfócitos B (Nair, 2004; Oliveira et al., 2005; Janeway et al., 2006). Como estes fatores são fundamentais no desenvolvimento de reabsorção óssea periapical (Wang & Stashenko, 1993), vários autores sugeriram que as endotoxinas são os principais fatores etiológicos envolvidos na patogênese da inflamação pulpar e periapical (Dwyer & Torabinejad, 1981; Barthel et al., 1997; Murakami et al., 2001; Hong et al., 2004; Islam et al., 2007; Oliveira et al., 2007;

Mohammadi, 2011), tornando-se importante sua eliminação ou inativação durante o tratamento endodôntico.

Outro possível envolvimento de LPS na reabsorção óssea está relacionado com o processo de indução da síntese de metaloproteinases da matriz (MMP). Em 2004, Hong et al. sugeriram que endotoxinas presentes em canais radiculares infectados estimulam macrófagos a liberar citocinas ($IL-1\alpha$ e $TNF-\alpha$), as quais são responsáveis pela indução da síntese de metaloproteinases da matriz (MMP-1), promovendo reabsorção óssea periapical.

As metaloproteinases da matriz (MMP) compreendem uma larga família de enzimas proteolíticas, como collagenases, gelatinases, estromelisinases, dentre outras, sendo pelo menos 24 membros caracterizados em humanos, roedores e anfíbios (Carneiro et al., 2009). As MMPs possuem um domínio catalítico cálcio ou zinco-dependente e são ativas contra componentes da matriz extracelular (Sorsa et al., 2004; Bodet et al., 2007). Em 2004, em uma revisão da literatura, Sorsa et al. relataram que a expressão e atividade de MMPs em tecidos adultos normalmente é muito baixa, mas aumenta significativamente em várias situações patológicas que podem levar a destruição tecidual indesejável, como doenças inflamatórias, crescimento tumoral e metástases. De acordo com estes autores, o papel das collagenases, especialmente MMP-8, em periodontites e periimplantites são exemplos bem claros de destruições teciduais indesejáveis relacionadas ao aumento da quantidade e atividade de MMPs no sítio da doença.

Diversos estudos têm demonstrado a importância de diferentes MMPs (MMP-1, MMP-2, MMP-8, MMP-9 e MMP-13) na destruição tecidual da polpa e tecidos periapicais (Shin et al., 2002; Chang et al., 2002; Lin et al., 2002; Wahlgren et al., 2002; Gusman et al., 2002; Carneiro et al., 2009; Itoh et al., 2009; Buzoglu et al., 2009; Matsui et al., 2011). Teronen et al. (1995) propuseram o envolvimento conjunto de MMP-1 e MMP-8 na destruição tecidual associada com expansão da

janela cística (Carneiro et al., 2005) e, de acordo com Leonardi et al. (2005), a MMP-13 pode participar da conversão de granuloma periapical epiteliado em cisto radicular (Carneiro et al., 2009). Em 2002, Wahlgren et al. verificaram que a quantidade de MMP-8 no exsudato periapical diminuiu em dentes com tratamento endodôntico bem sucedido, indicando que análises de MMPs podem ser úteis para indicar e monitorar a atividade inflamatória e o sucesso do tratamento em dentes com lesões periapicais.

Foi verificado no estudo de Shin et al. (2002), que avaliaram os níveis de MMP-1, -2 e -3 no tecido pulpar inflamado e nas lesões periapicais, que MMP foi expressa na polpa inflamada e na lesão periapical, especialmente nos casos sintomáticos, sugerindo que a presença de MMPs pode estar relacionada com sintomatologia do paciente. Sendo assim, como vários estudos também demonstraram relação entre altos níveis de LPS nos canais radiculares de dentes com sintomatologia clínica (Schein & Schilder, 1975 e 2006; Jacinto et al., 2005; Martinho & Gomes, 2008; Martinho et al., 2011), pode ser sugerida uma possível relação entre LPS, citocinas, MMPs e evolução das alterações pulpares e periapicais (Hong et al., 2004). Desta forma, torna-se de grande interesse estudar a relação das metaloproteinases da matriz, em dentes com necrose pulpar e lesões periapicais, com outros fatores liberados numa infecção endodôntica, como endotoxinas (LPS). E ainda, é também interessante monitorar se durante o tratamento endodôntico ocorre redução dos níveis de diferentes MMPs e LPS.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Endotoxinas em canais radiculares

De acordo com a evolução dos métodos de identificação microbiana, incluindo técnicas da biologia molecular e da microespectroscopia, a microbiota dos canais radiculares infectados vem sendo constantemente definida. No entanto, de uma forma geral, as infecções primárias dos canais são polimicrobianas com predomínio de bactérias anaeróbias (Sundqvist, 1994; Gomes et al., 2004; Zehnder, 2006), destacando-se as Gram-negativas, entre os gêneros predominantes, como *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Campylobacter*, *Tannerella*, *Treponema* e *Dialister* (Williams et al., 1997; Siqueira Jr et al., 2002; Baumgartner et al., 2003; Siqueira Jr, 2003; Gomes et al., 2004; Gomes et al., 2006; Siqueira Jr et al., 2008; Rôças & Siqueira Jr, 2008; Narayanan & Vaishnavi, 2010; Montagner et al., 2010; Mohammadi, 2011). Tem-se observado também na literatura uma importante relação entre a infecção dos canais radiculares causada especialmente por microrganismos Gram-negativos e sintomatologia clínica, como a presença de dor espontânea, edema, dor à palpação e exsudato purulento (Gomes et al., 1994, 2004; Hashioka et al., 1992; Jacinto et al., 2003; Gomes et al., 2007; Gomes et al., 2008; Siqueira Jr et al., 2008).

Sabe-se que as bactérias Gram-negativas, durante multiplicação ou morte, liberam endotoxinas (LPS) da parede celular, as quais apresentam importantes efeitos citotóxicos. Desde 1975, a literatura vem relatando a presença de endotoxinas em canais radiculares infectados e sua importância na indução e manutenção das alterações pulpares e periapicais (Dahlén et al., 1981; Dwyer & Torabinejad, 1981; Pitts et al., 1982; Mattison et al., 1987; Horiba et al., 1991; Jacinto et al.,

2005; Vianna et al., 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes et al., 2009; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011; Mohammadi, 2011).

Schein & Schilder (1975) foram os pioneiros em relatar a presença de grande quantidade de endotoxinas em canais radiculares. Os autores demonstraram que dentes com polpas necrosadas possuíam concentração mais elevada de endotoxina que dentes com polpas vitais e, ainda, dentes que apresentavam sinais e sintomas clínicos também possuíam mais endotoxinas que os dentes sem sintomatologia. Em 2006, este artigo foi republicado como um tributo ao Dr. Herbert Schilder e foi comentado por Hutter (2006) como um dos clássicos da literatura endodôntica em que, pela primeira vez, endotoxinas foram detectadas e quantificadas em canais radiculares. Segundo Hutter (2006), a publicação deste estudo em 1975 causou impacto numa época em que se acreditava que as doenças pulpares e periapicais resultavam especialmente de infecção por bactérias aeróbias. Schein & Schilder levantaram a hipótese que bactérias Gram-negativas apresentavam papel significativo na patogênese da doença endodôntica e que se estas bactérias, presentes no interior dos canais radiculares ou na região periapical, sucumbissem à instrumentação e medicação intracanal, as endotoxinas liberadas poderiam causar alterações periapicais.

Em seu estudo, Schein & Schilder (1975) demonstraram uma correlação positiva entre o aumento de endotoxinas e sintomatologia clínica. Outros autores, incluindo estudos recentes, também demonstraram relação entre sintomatologia clínica e aumento na quantidade de endotoxinas em canais radiculares (Horiba et al., 1991; Jacinto et al., 2005; Martinho & Gomes, 2008; Martinho et al., 2011). Khabbaz et al. (2001) demonstraram aumento nos níveis de endotoxinas nos tecidos pulpares de dentes com sintomatologia clínica e sugeriram uma possível associação dos níveis de endotoxina com aumento de dor pulpar. Em 2005, Jacinto et al. relataram que a grande quantidade de endotoxinas em canais radiculares de dentes com sintomatologia (dor

espontânea, dor à palpação e percussão e com exsudato purulento) indica que LPS é um fator biológico para o desenvolvimento de inflamação periapical aguda, de modo que o tratamento endodôntico deve visar o uso de substâncias antimicrobianas que também apresentem ação sobre os produtos liberados pelas bactérias, como endotoxinas. Martinho & Gomes (2008) também verificaram altos níveis de endotoxinas nos canais radiculares de dentes com sintomatologia clínica. Em 2011, Martinho et al. demonstraram que dentes com sintomatologia clínica estavam relacionados com altos níveis de endotoxinas e secreção de PGE₂ por macrófagos.

As endotoxinas não causam prejuízo tecidual de forma direta, mas por estimular células competentes, em especial macrófagos (Mohammadi, 2011) a liberar mediadores químicos, assim, após a liberação, LPS é inicialmente ligado a uma proteína plasmática chamada LBP (*LPS-binding protein*) que interage com receptores celulares, como CD14 na superfície de macrófagos (Mohammadi, 2011). Conforme citado por Oliveira et al. (2007), endotoxinas são responsáveis por vários efeitos biológicos importantes, como quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN), liberação de collagenase pelos macrófagos, ativação do sistema complemento, indução de febre, hipotensão e choque, coagulação intravascular, ativação policlonal de linfócitos B e produção de anticorpos não-específicos (Harper et al., 1994; Nair, 2004; Oliveira et al., 2005), além da ativação de monócitos e macrófagos, em especial, com indução da síntese e liberação de prostaglandinas, leucotrienos, fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas (IL-1, IL-6, IL-8, TNF) (Morse, 1981; Matsushita et al., 1999; Hong et al., 2004; Janeway et al., 2006). Entre as citocinas, destacam-se IL-1 α , IL-1 β e TNF- α , que são ativadoras de osteoclastos, participando do processo de reabsorção óssea, que é extremamente importante no desenvolvimento da alteração periapical (Stashenko et al., 1991; Wang & Stashenko, 1993; Murakami et al., 2001; Nair, 2004; Hong et al., 2004; Islam et al., 2007).

Alguns estudos inocularam LPS nos canais radiculares de cães para demonstrar sua importância na indução de reabsorção óssea periapical (Nelson Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Silva et al., 2004). Assim, de acordo com os inúmeros autores que demonstraram os efeitos biológicos da endotoxina, ela tem sido considerada um dos principais fatores etiológicos relacionados com a indução e manutenção da inflamação periapical, incluindo reabsorção óssea (Dwyer & Torabinejad, 1981; Pitts et al., 1982; Mattison et al., 1987; Yamasaki et al., 1992; Murakami et al., 2001; Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Hong et al., 2004; Silva et al., 2004; Jacinto et al., 2005; Jiang et al., 2006; Islam et al., 2007; Oliveira et al., 2007; Martinho et al., 2011; Mohammadi, 2011).

O papel da endotoxina na reabsorção óssea envolve inúmeras vias de ativação, dentre elas, LPS e citocinas (IL-1 α e IL-1 β) podem estimular em diferentes tipos celulares (fibroblastos, osteoblastos e macrófagos) a produção de prostaglandina E₂ (PGE₂), que é um importante ativador de osteoclastos (Lindemann et al., 1988; Stashenko et al., 1991; Wang & Stashenko, 1993; Shoji et al., 2006; Martinho et al., 2011). Em 2006, Shoji et al. estudaram os efeitos do LPS no crescimento celular, na atividade da fosfatase alcalina, na produção de PGE₂ e na expressão gênica de ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) em células humanas e demonstraram que LPS diminuiu o crescimento celular e a atividade da fosfatase alcalina, enquanto aumentou a produção de PGE₂.

Em 2006, Jiang et al., visando compreender os mecanismos de reabsorção óssea nas lesões periapicais, estimularam precursores de osteoclastos (células RAW 264.7) com LPS. Os autores demonstraram que LPS induziu a osteoclastogênese quando precursores de osteoclastos foram preparados com ligante do receptor do fator nuclear kappa B (RANKL) por menos de 24 hs. Foi confirmado, pela análise de PCR *realtime*, que as células estimuladas por LPS expressaram alto nível de marcadores genéticos específicos para

osteoclastos, como TRAP, catepsina K e receptor para calcitonina. Islam et al. (2007) também demonstraram o efeito do LPS em induzir a formação de osteoclastos em macrófagos da linhagem RAW 264.7 e, ainda, que a utilização de anticorpos anti-TNF- α inibiu esta formação enquanto que anticorpos anti-M-CSF (fator estimulador de colônia de macrófagos) não inibiu a formação de osteoclastos. Desta forma, os autores concluíram que TNF- α tem um papel especial na formação de osteoclastos induzida por LPS em células da linhagem RAW 264.7. Contudo, os mecanismos celulares e moleculares precisos pelos quais LPS induz reabsorção óssea ainda permanecem controversos. Conforme relatado por Liu et al. (2009), inúmeros estudos demonstraram que LPS estimula osteoclastogênese, no entanto, estes autores verificaram que LPS desempenhou um efeito bifuncional. Por um lado, LPS inibiu a osteoclastogênese a partir de precursores de osteoclastos recém-isolados, e, por outro lado, promoveu osteoclastogênese em precursores de osteoclastos pré-tratados com RANKL *in vitro*, indicando que a linhagem mediada por RANKL é um pré-requisito para osteoclastogênese induzida por LPS.

Outra via que contribui para compreensão dos efeitos de endotoxinas na osteoclastogênese é através da ativação de linfócitos B. As endotoxinas são ativadores policlonais de linfócitos B e, de acordo com Nair (2004), a antigenicidade do LPS ocorre em várias formas que incluem a estimulação mitogênica de linfócitos B na produção de anticorpos não específicos. Oliveira et al. (2005 e 2007) verificaram *in vitro* que a presença de endotoxinas no canal radicular promoveu ativação policlonal de linfócitos B, estimulando produção significativa de anticorpos da classe IgM em cultura de linfócitos. Estes dados são importantes, pois pouca atenção tem sido dada para a participação de células B no processo de reabsorção óssea inflamatória. Kozuka et al. (2006) verificaram que células B apresentam importante papel na reabsorção óssea induzida por LPS, uma vez que estas células estimuladas por LPS

aumentam a osteoclastogênese e promovem reabsorção óssea inflamatória por meio de TNF- α .

Em 2010, Martinho et al., analisando a antigenicidade do conteúdo endodôntico de canais radiculares com infecção primária e lesão periapical, verificaram uma correlação entre o número de bactérias Gram-negativas e os níveis de IL-1 β /TNF- α liberados por macrófagos. Níveis aumentados de endotoxinas foram seguidos por liberação de TNF- α . Altos níveis de IL-1 β e endotoxinas foram relacionados com tamanhos maiores das áreas radiolúcidas. Contudo, os autores concluíram que a antigenicidade do conteúdo endodôntico não está apenas relacionada com a quantidade de endotoxina nos canais radiculares, mas também com o número de diferentes espécies de bactérias Gram-negativas envolvidas na infecção. Além disso, tamanhos maiores (≥ 2 mm) de áreas radiolúcidas estavam relacionadas com IL-1 β e endotoxinas.

De acordo com a literatura, pode-se verificar que a relação entre endotoxinas e o desenvolvimento de lesões periapicais, incluindo reabsorção óssea, ainda requer discussão. Em 2003, Lin et al. demonstraram que óxido nítrico derivado de macrófagos após ativação por LPS pode aumentar a perda óssea por meio da produção de metaloproteinase da matriz (MMP-1) induzida por citocinas em osteoblastos. Em 2004, Hong et al. sugeriram que LPS liberado de canais radiculares infectados estimula a síntese de IL-1 α e TNF- α por macrófagos e que estas citocinas pró-inflamatórias regulam a produção de metaloproteinase da matriz (MMP-1) por macrófagos para promover reabsorção óssea periapical. Estes estudos são muito importantes, pois sinalizam outro envolvimento de LPS no complexo mecanismo de reabsorção óssea inflamatória.

Outros estudos, em diferentes áreas, têm demonstrado o envolvimento de LPS e MMP. Em 2006, Melamed et al. verificaram que LPS e concanavalina A estimularam a secreção de MMP-9 em células B maduras. Bodet et al. (2007) avaliaram a produção de MMP e de seus

inibidores (TIMP) por fibroblastos gengivais ativados por LPS de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e demonstraram que LPS pode estimular a expressão de MMP-2, MMP-3 e TIMP-1, o que pode contribuir para destruição do tecido conjuntivo periodontal. Em 2009, Katono et al. relataram que LPS de bactérias periodontopatogênicas podem iniciar a perda óssea alveolar pela indução de citocinas derivadas do hospedeiro. Estes autores avaliaram os efeitos da nicotina e do LPS na expressão de MMP e de ativadores de plasminogênio, bem como de seus inibidores (incluindo TIMPs) em osteoblastos. Os resultados sugeriram que nicotina e LPS estimulam o processo de reabsorção óssea pelo aumento da produção de MMPs e de ativadores de plasminogênio e pela diminuição da produção de TIMPs.

Mais especificamente na endodontia, Shin et al. (2002) avaliaram os níveis de MMP-1, -2 e -3 no tecido pulpar inflamado e nas lesões periapicais e verificaram que as concentrações de MMP-1 foram significativamente maiores em todos os grupos em relação ao controle. Os autores sugeriram que as MMPs têm importante papel na inflamação pulpar e periapical e que a presença de MMP parece estar positivamente relacionada com sintomatologia do paciente. Da mesma forma, muitos estudos também demonstraram relação entre altos níveis de LPS nos canais radiculares de dentes com sintomatologia clínica (Schein & Schilder, 1975 e 2006; Jacinto et al., 2005; Martinho & Gomes, 2008; Martinho et al., 2011), de modo que pode ser sugerida uma possível relação entre LPS, citocinas, MMP e evolução das alterações pulpares e periapicais, com provável reabsorção óssea.

Como já mencionado anteriormente, endotoxinas estão presentes em altas concentrações nos canais radiculares de dentes com polpas necrosadas (Schein & Schilder, 1975; Dahlén & Bergenholtz, 1980; Horiba et al., 1991; Jacinto et al., 2005; Martinho & Gomes, 2008; Martinho et al., 2011). Vianna et al. (2007), Martinho & Gomes (2008), Gomes et al. (2009) e Martinho et al. (2011) demonstraram presença de

endotoxinas em 100% das amostras iniciais coletadas de canais radiculares com polpa necrosada. Desta forma, diante da importância de endotoxinas nas alterações pulpares e periapicais, o tratamento endodôntico deve ter como meta não apenas a eliminação dos microrganismos do sistema de canais radiculares, mas também a neutralização de suas endotoxinas e outros produtos tóxicos, com intuito de impedir também a possível liberação de metaloproteínases da matriz. Sabe-se que um dos principais objetivos do preparo biomecânico, utilizando diferentes agentes irrigantes, é promover a limpeza e a desinfecção do sistema de canais radiculares, entretanto, é possível que, mesmo após a remoção dos microrganismos, endotoxinas com capacidade de induzir ou manter alterações periapicais permaneçam no sistema de canais radiculares interferindo no sucesso do tratamento (Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002; Leonardo, 2005; Oliveira et al., 2007).

Tem-se verificado na literatura que o hipoclorito de sódio e clorexidina, como substâncias químicas auxiliares do preparo biomecânico, apresentam excelente ação antimicrobiana (Jeansonne & White 1994; Yelsilsoy et al., 1995; Menezes et al., 2004; Vianna et al., 2004; Mohammadi, 2008; Mohammadi & Abbott, 2009), entretanto, pouco ou nenhum efeito sobre LPS (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2007; Vianna et al., 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes et al., 2009; Maekawa et al., 2011).

Em 2007, Vianna et al. verificaram que a ação do preparo químico-mecânico com clorexidina gel 2% como substância química auxiliar foi o responsável pela maior remoção de endotoxinas, em média 44,4%, dos canais radiculares que apresentavam infecção primária e lesões periapicais. Segundo os autores, esta redução foi provavelmente resultado da remoção mecânica de *debris* dos canais radiculares durante a limpeza, auxiliada pela irrigação com solução fisiológica, do que ação da clorexidina gel 2% em inativar endotoxinas. Martinho & Gomes, em

2008, utilizaram o hipoclorito de sódio a 2,5% como solução irrigadora para o tratamento de dentes com necrose pulpar e verificaram que após o preparo químico-mecânico houve uma diminuição média de 99,78% (bactérias) e de 59,99% (endotoxinas). Os autores concluíram que o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% foi efetivo contra bactérias e menos efetivo sobre endotoxinas em canais radiculares infectados. Comparando a eficácia do hipoclorito de sódio 2,5% e clorexidina gel 2% na detoxificação de endotoxinas em canais radiculares com polpa necrosada, Gomes et al., em 2009 verificaram que o conteúdo de LPS foi reduzido para valor médio de 86 EU/mL (NaOCl 2,5%) e 85 EU/mL (clorexidina), entretanto, os autores concluíram que NaOCl 2,5% e clorexidina gel 2% não foram efetivos para eliminar endotoxinas em canais radiculares infectados. Em 2011, Maekawa et al., em estudo *in vitro*, também demonstraram que NaOCl 2,5% e clorexidina gel 2% não foram capazes de neutralizar endotoxinas em canais radiculares.

Na tentativa de neutralizar endotoxinas em canais radiculares, substâncias alternativas vêm sendo utilizadas. Em 2008, Cardoso et al. avaliaram a ação da água ozonizada sobre LPS em canais radiculares e verificaram sua efetividade sobre microrganismos (*Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*) mas não sobre endotoxinas. Valera et al. (2010) demonstraram *in vitro* que o extrato glicólico de própolis, como irrigante, foi efetivo sobre *E. coli*, entretanto, não foi capaz de eliminar endotoxinas em canais radiculares.

Por outro lado, Martinho et al. (2010) verificaram que a preparação química-mecânica utilizando NaOCl 2,5% + EDTA 17% e instrumentação rotatória foi efetiva na redução dos níveis de endotoxinas dos canais radiculares de dentes com infecção primária e periodontite apical. Em estudo *in vitro*, Oliveira et al. (2007) demonstraram que as soluções de hipoclorito de sódio 2,5%, 5,25% e clorexidina 2% não apresentaram capacidade de neutralizar endotoxinas em canais radiculares, no entanto, verificaram que a utilização de solução de

hidróxido de cálcio 0,14% (água de cal) e polimixina B, como agentes irrigantes, reduziram significativamente o nível de endotoxinas nos canais radiculares.

Com relação à capacidade do hidróxido de cálcio em detoxificar endotoxinas, Silva et al., em 2008, verificaram pelo seu estudo em cães, que a endotoxina quando submetida a ação do hidróxido de cálcio não foi capaz de induzir a formação de lesões periapicais após período de 30 dias de sua inoculação nos canais radiculares. Já a endotoxina sozinha induziu a formação de lesões periapicais visíveis radiograficamente com medidas médias de 8,44 mm². Estudos anteriores em cães também demonstraram importante papel do hidróxido de cálcio em neutralizar os efeitos da endotoxina na reabsorção óssea periapical (Silva et al., 2002; Nelson-Filho et al., 2002; Tanomaru et al., 2003).

Inúmeros estudos na literatura demonstraram que o hidróxido de cálcio possui capacidade de neutralizar LPS, pois promove hidrólise da porção lipídica da endotoxina, alterando sua capacidade de induzir efeitos citotóxicos (Safavi & Nichols, 1993 e 1994; Buck et al., 2001; Barthel et al., 1997; Wang et al., 2001, Jiang et al., 2003; Oliveira et al., 2005 e 2007). Em 2005, Oliveira et al. demonstraram *in vitro* que o hidróxido de cálcio e polimixina B, como medicamentos de demora por 7 dias, neutralizaram endotoxinas de *E. coli* em canais radiculares e alteraram as propriedades do LPS de estimular a produção de anticorpos por linfócitos B. Pode-se verificar na literatura que muitos autores comprovaram a capacidade do hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, de neutralizar endotoxinas em canais radiculares (Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Silva et al., 2008; Maekawa et al., 2011).

Entretanto, como a utilização associada de hidróxido de cálcio com clorexidina gel 2%, como medicação intracanal, vem ganhando grande espaço na terapia endodôntica, com intuito de somar as importantes propriedades de cada medicamento, torna-se interessante

verificar se os efeitos benéficos do hidróxido de cálcio de neutralizar endotoxinas são mantidos após esta associação. Em 2007, Vianna et al. demonstraram *in vivo* que as medicações intracanaís (hidróxido de cálcio, hidróxido de cálcio + clorexidina gel 2% e clorexidina gel 2% sozinha), quando utilizadas por 7 dias, reduziram a quantidade de endotoxinas dos canais radiculares em apenas 1,4% em relação à coleta após preparo químico-mecânico, sem diferença estatística entre os grupos. Maekawa et al. (2011) verificaram *in vitro* que a utilização de hidróxido de cálcio sozinho ou hidróxido de cálcio associado à clorexidina gel 2%, como medicação de demora por 14 dias, promoveu importante redução de endotoxinas dos canais radiculares, sem diferença estatística entre os grupos. Assim, os autores discutiram que esta associação reúne as propriedades antimicrobianas da clorexidina e o potencial de mineralização e de neutralização de endotoxinas do hidróxido de cálcio. Signoretti et al. (2011) avaliaram a influência da clorexidina gel 2% sobre a dissociação iônica do hidróxido de cálcio e sua habilidade de reduzir endotoxinas e, de acordo com seus resultados, os autores concluíram que a clorexidina gel não interferiu nas propriedades químicas do hidróxido de cálcio e, ainda, melhorou suas propriedades de reduzir o conteúdo de endotoxinas em canais radiculares *in vitro*. Contudo, estes estudos confirmam que a associação de clorexidina gel e hidróxido de cálcio, como medicação intracanal, traz muitos benefícios à terapia endodôntica, contribuindo para o sucesso do tratamento.

Assim, diante do exposto na literatura, pode-se verificar que as endotoxinas apresentam importante papel nas alterações pulpare e periapicais, especialmente na indução da liberação de mediadores químicos e citocinas envolvidos nos processos de reabsorção óssea. Sabendo-se que as metaloproteínases da matriz também estão envolvidas na destruição tecidual e reabsorção óssea pela degradação da matriz extracelular e que a sua síntese e liberação é induzida por diversos fatores como citocinas e mediadores químicos, torna-se interessante

ampliar os estudos sobre a possível relação entre LPS, citocinas, MMP e evolução das alterações pulpare e periapicais, uma vez que a melhor compreensão dos mecanismos envolvidos nestas alterações pode sinalizar para evolução da terapia endodôntica, bem como sucesso do tratamento.

2.2 Metaloproteinases da matriz – envolvimento nas alterações pulpare e periapicais

As metaloproteinases da matriz (MMPs) consistem em uma importante família de endopeptidases metal-dependentes que representam a maior classe de enzimas responsável pela degradação de diferentes componentes da matriz extracelular (MEC) e da membrana basal (Sorsa et al., 2004). As metaloproteinases são geneticamente distintas, mas estruturalmente relacionadas, e são classificadas em pelo menos seis subgrupos, de acordo com a especificidade ao substrato e estrutura química: a) collagenases (MMP-1, MMP-8, MMP-13), que atuam no colágeno fibrilar (tipo I, II e III); b) gelatinases (MMP-2, MMP-9), que degradam especialmente o colágeno tipo IV e a fibronectina; c) estromelisinases (MMP-3, MMP-7, MMP-10, MMP-11, MMP-12), que degradam diferentes componentes da MEC, como proteoglicanas, laminina, fibronectina e colágenos amorfos; d) matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), que degradam moléculas da superfície celular e outros componentes da MEC; e) enamelinase (MMP-20), que atua sobre enamelin; f) tipo membrana (MMP-14, MMP-15, MMP-16 e MMP-17) e outros (Wahlgren et al., 2001; Tjaderhane et al., 2001; Hannas et al., 2007; Sulkala et al., 2007; Paula-Silva, 2010).

Nos últimos anos, foram clonados 24 tipos de MMP, sendo 23 encontrados em humanos (Hannas et al., 2007; Corotti et al.,

2009). MMPs são geralmente expressas em baixos níveis, mas estes níveis aumentam rapidamente quando os tecidos sofrem remodelação, bem como na inflamação, cicatrização de feridas e câncer (Carneiro et al., 2009). As MMPs são sintetizadas como enzimas latentes que podem ser estocadas nos grânulos de células inflamatórias, mas são mais frequentemente secretadas e encontradas ancoradas à superfície celular ou no interior da MEC (Coussens et al., 2002) citado por Carneiro et al. (2009).

A atividade de MMP é controlada por alterações no delicado balanço entre a expressão e síntese de MMPs e seus principais inibidores, que são os inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz (TIMPs) (Sorsa et al., 2004). Dentre eles, tem-se TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4 (Sato et al., 2009), assim, a competência catalítica das MMPs é controlada através da ativação da forma zimógena da enzima (pró-ativa) e a inibição da sua atividade, especialmente pelos TIMPs (Uitto et al., 2003; Sorsa et al., 2004).

As MMPs podem ser produzidas e liberadas por diferentes tipos celulares, incluindo células inflamatórias e não-inflamatórias, sendo as principais: neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, osteoblastos, odontoblastos, células epiteliais, eosinófilos, células endoteliais, linfócitos, dentre outras (Palosaari et al., 2000; Shin et al., 2002; Wahlgren et al., 2002; Leonardi et al., 2005; Lu et al., 2010; Matsui et al., 2011). A liberação é, em geral, induzida por estímulos como fatores de crescimento (TGF- β – fator de crescimento transformante beta, PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas, FGF – fator de crescimento de fibroblasto, EGF – fator de crescimento epidérmico), citocinas (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10,), hormônios e estresse físico (Birkedal-Hansen, 1993; Reynolds et al., 1994; Reynolds & Meikle, 1997; Palosaari et al., 2000; Wahlgren et al., 2001; Hong et al., 2004; Buzoglu et al., 2009; Lu et al., 2010).

Em 2002, Shin et al. avaliaram os níveis de MMP-1, -2 e -3 e suas distribuições no tecido pulpar inflamado e nas lesões periapicais e verificaram que MMP foi expressa na polpa inflamada e na lesão periapical, especialmente nos casos sintomáticos. A concentração de MMP-1 foi significativamente maior nas pulpites agudas, pulpites crônicas e nas lesões periapicais em relação ao controle (tecido pulpar normal); MMP-3 foi significativamente maior nas pulpites agudas que nas crônicas, e a MMP-2 foi maior nas pulpites agudas em relação ao controle. As MMP-1 e -3 foram localizadas no infiltrado de neutrófilos, macrófagos e na matriz extracelular das pulpites agudas. De acordo com estes autores, MMP tem um importante papel na destruição do tecido pulpar e sua presença parece estar relacionada com sintomatologia do paciente. Segundo Sato et al. (2009), as alterações inflamatórias nas principais lesões patológicas dos tecidos orais podem progredir via destruição da MEC no ligamento periodontal e osso alveolar, especialmente pela ação de MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9. Buzoglu et al. (2009) relataram que a destruição do tecido periapical ocorre pela degradação de componentes da MEC, incluindo colágeno e proteoglicanas e que este mecanismo é regulado pelas MMPs, as quais são induzidas por citocinas como TNF- α e IL-1.

Na última década, muitos estudos têm demonstrado o papel fundamental das MMPs no desenvolvimento, remodelação e destruição dos tecidos orais (Wahlgren et al., 2001; Leonardi et al., 2005; Hannas et al., 2007; Tjaderhane et al., 2007; Carneiro et al., 2009; Paula-Silva et al., 2009). De acordo com Paula-Silva et al. (2009), MMP-1 tem sido considerada como uma enzima-chave no início da fase de reabsorção óssea da periodontite apical (Lin et al., 2002; Hong et al., 2004) e outras MMPs (MMP-2, -3, -8, -9 e -13) têm sido relacionadas com granulomas e cistos periapicais (Wahlgren et al., 2001; Shin et al., 2002; Leonardi et al., 2005; Paula-Silva et al., 2009; Carneiro et al., 2009). Em 1995, Teronen et al. sugeriram a presença de collagenases (MMP-1 e

MMP-8) e gelatinases (MMP-2 e MMP-9) em extratos de paredes císticas e em fluidos císticos e ainda que as gelatinases podem participar da expansão cística.

As collagenases (MMP-1, -8 e -13) apresentam papel crítico na quebra de colágeno fibrilar, que representa o principal constituinte do periodonto e osso alveolar e como o colágeno é clivado em fragmentos pequenos, estes desnaturam à temperatura corporal e são degradados por gelatinases e outras proteinases (Belmar et al., 2008). As gelatinases (MMP-2 e MMP-9) são conhecidas por clivar especificamente colágeno tipo IV, que é um dos principais componentes estruturais da membrana basal, além de desnaturar gelatinas, laminina, elastina, fibronectina (Buzoglu et al., 2009; Corroti et al., 2009). Inúmeros estudos têm demonstrado que MMP-2 e MMP-9 participam da patogênese da inflamação pulpar e periapical (Shin et al., 2002; Chang et al., 2002; Belmar et al., 2008; Corroti et al., 2009; Buzoglu et al., 2009; Itoh et al., 2009; Sato et al., 2009; Kawase et al., 2010). Belmar et al. (2008) verificaram que os níveis de MMP-9 e -2 são aumentados no fluido crevicular gengival de dentes com lesões periapicais. Em 2009, Buzoglu et al. investigaram a presença e os níveis de MMP-2 (gelatinase A) e MMP-9 (gelatinase B) em abscessos periapicais e verificaram níveis significativamente mais altos de MMP-9 em relação a MMP-2 nas amostras de abscessos apicais agudos primários e secundários e, ainda, que MMP-2 não foi detectada em abscessos apicais crônicos. Assim, os autores concluíram que gelatinases podem afetar a patogênese dos abscessos periapicais agudos e crônicos. Corroti et al. (2009), estudando a expressão de MMP-2 e MMP-9 durante o desenvolvimento de periodontite apical em ratos, sugeriram que estas MMPs apresentam papel crítico no desenvolvimento das lesões periapicais inflamatórias, provavelmente envolvendo a degradação da MEC durante a fase inicial de desenvolvimento da lesão.

Em 2009, Carneiro et al. determinaram a expressão de MMP-9 em lesões periapicais epitelializadas e não-epitelializadas. Após cirurgia periapical, as amostras foram analisadas por imunohistoquímica e PCR *real time* e os resultados demonstraram que neutrófilos, macrófagos e linfócitos expressaram MMP-9 em ambos tipos de lesões e que esta expressão foi significativamente maior em dentes com periodontite apical do que naqueles com ligamento periodontal saudável. Assim, os autores sugeriram a participação de várias células inflamatórias na expressão de MMP-9 nas lesões periapicais e que esta MMP pode ter envolvimento ativo na degradação da matriz extracelular nestas lesões. Itoh et al. (2009) relataram que a causa das lesões perirradiculares está relacionada com a destruição da matriz extracelular por MMP-1 (colagenase), MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), as quais são produzidas e secretadas por macrófagos e neutrófilos que migram para os sítios da inflamação. Como muitas MMPs são produzidas e secretadas pelas células na forma pró-ativa, elas precisam ser ativadas antes de iniciar a destruição celular. Assim, estes autores avaliaram os efeitos de extratos de *Prevotella nigrescens*, bactéria comumente encontrada em infecções dos canais radiculares, na ativação de pró-MMP-2 e pró-MMP-9. Os resultados sugeriram que *P. nigrescens* pode ser capaz de ativar pró-MMP-2 e pró-MMP-9 *in vivo* e que esta ativação pode estar relacionada com a destruição dos tecidos periapicais.

Sato et al. (2009) também verificaram que *Porphyromonas gingivalis* pode contribuir para a destruição de tecido conjuntivo durante o desenvolvimento da lesão periapical pela ativação de pró-MMP-2, assim como pela inativação de inibidores de MMPs (TIMP-1 e TIMP-2). Nesta mesma linha, Kawase et al. (2010) estudaram a atividade colagenolítica do extrato de *Tannerella forsythia* e sua capacidade de ativar pró-MMP-2 e pró-MMP-9 e verificaram que este extrato foi capaz de degradar colágeno tipo I e ativar pró-MMP-2 e -9, considerando assim que

estas atividades provavelmente estão envolvidas na destruição dos tecidos periapicais por *T. forsythia*.

Outras MMPs muito importantes nas alterações pulpares e periapicais são as collagenases (MMP-1, -8 e -13). Wahlgren et al. (2001) analisaram a habilidade de células plasmáticas, tipicamente presentes em locais de inflamação crônica, expressarem MMP-8 e MMP-13 e verificaram a expressão destas MMPs em granulomas periapicais, cistos odontogênicos e plasmocitomas malignos, demonstrando que estas collagenases podem participar da destruição da matriz orgânica óssea em sítios de inflamação crônica e crescimento neoplásico. Em 2002, Wahlgren et al. avaliaram a presença, níveis e formas moleculares da MMP-8 (colagenase 2) na inflamação pulpar e periapical e as mudanças nos níveis de MMP-8 nos exsudatos coletados de canais radiculares durante o tratamento endodôntico utilizando NaOCl 2,5% como irrigante e pasta de Ca(OH)_2 como medicação intracanal. Os autores verificaram a presença de MMP-8 no tecido pulpar e periapical inflamado, demonstrando assim seu importante papel na inflamação pulpar e periapical, principalmente na degradação da matriz extracelular. Observaram também que a quantidade de MMP-8 no exsudato periapical diminuiu durante o tratamento endodôntico. Com isso, de acordo com estes autores, análises de MMP-8 do exsudato periapical poderiam ser utilizadas para indicar e monitorar atividade inflamatória e o sucesso do tratamento em dentes com lesões periapicais.

Em 2010, devido a falta de avaliação do envolvimento de outras MMPs durante e após tratamento do canal radicular, Paula-Silva et al., nesta mesma linha de raciocínio, investigaram a expressão de várias MMPs (MMP-1, -2, -8 e -9) em periodontites apicais de cães, durante a fase de reparação após tratamento do canal radicular. Os resultados demonstraram que a persistência bacteriana após tratamento endodôntico em sessão única estava associada com desorganização das fibras colágenas e altos níveis de expressão das MMPs, analisados por

imunohistoquímica. Por outro lado, dentes submetidos ao tratamento dos canais radiculares com hidróxido de cálcio como medicação de demora apresentaram menor porcentagem de contaminação bacteriana, menor expressão de MMPs e MEC mais organizada, sugerindo que hidróxido de cálcio pode ser benéfico nos processos de reparação tecidual.

Em uma revisão da literatura sobre metaloproteinasas nas doenças orais, Sorsa et al. (2004) relataram que o papel das collagenases, especialmente MMP-8 em periodontites e periimplantites são exemplos bem claros de destruições teciduais indesejáveis relacionadas ao aumento da quantidade e atividade de MMPs no sítio da doença. Em 2008, Andonovska et al. estudaram a correlação entre a concentração de collagenases (MMP-1, -8 e -13) em lesões periapicais crônicas e suas dimensões calculadas pelo programa *Image Tool*. De acordo com os resultados, foram observadas diferentes concentrações e atividades de collagenases (MMP-1, -8 e -13) nos vários tipos de processos periapicais crônicos. Os valores mais altos das collagenases foram obtidos nas lesões crônicas difusas e baixos valores de concentrações de MMPs foram encontrados em lesões menos sérias, enquanto lesões crônicas periapicais de grandes dimensões tiveram altas concentrações de MMPs, proporcionais à progressão da lesão e destruição óssea. Assim, este estudo confirmou o papel das collagenases (MMP-1, -8 e -13) no processo inflamatório, o qual depende diretamente da concentração de MMPs no tecido patologicamente alterado.

Com relação à expressão de MMP-8 e MMP-13 durante o desenvolvimento de lesões periapicais, em 2011, Matsui et al. observaram, em lesões periapicais de ratos, que as MMP-8 e -13 estão relacionadas com o desenvolvimento das lesões e que a MMP-13 apresentou-se aumentada nos estágios iniciais do desenvolvimento da lesão (1 a 4 semanas) e que a MMP-8 esteve mais presente durante a progressão da destruição tecidual, incluindo reabsorção óssea. Shin et al. (2011) investigaram os níveis de MMP-8 e substância P (importante

neuropeptídeo) no fluido gengival crevicular durante tratamento endodôntico de dentes não-vitais sintomáticos. Níveis subjetivos de dor dos pacientes foram significativamente relacionados com os níveis de MMP-8 e substância P no fluido crevicular gengival, os quais foram diminuídos durante o tratamento endodôntico. Assim, os autores concluíram que a inflamação perirradicular de origem endodôntica pode elevar os níveis de substância P e MMP-8 no fluido crevicular gengival.

Leonardi et al. (2005) investigaram a presença ou não de MMP-13 em granulomas periapicais com ou sem epitélio e verificaram alta expressão de MMP-13 em lesões periapicais epiteliadas, especialmente em pequenas ilhas de epitélio, demonstrando que a expressão padrão de MMP-13 está envolvida na conversão de granuloma periapical epiteliado em cisto radicular. Os autores relataram também que esta propriedade está relacionada com a capacidade da MMP-13 influenciar não apenas a migração de células epiteliais, mas também a invasão do tecido granulomatoso. Por outro lado, Paula-Silva et al. (2009) investigaram diferenças na expressão de várias moléculas da matriz extracelular, especialmente da família das MMPs, em cistos e granulomas. Os resultados demonstraram que os granulomas exibiram maior atividade enzimática de MMP-9 e maior expressão de MMP-13 em relação aos cistos. Assim, os autores indicaram que a alta atividade enzimática de MMP-9 e MMP-13 em polimorfonucleares pode ser uma assinatura molecular de granulomas não relacionados a cistos periapicais. Com relação aos diferentes tipos de cistos, Ali et al. (2008) estudaram a presença e variabilidade da expressão de indutores das MMPs (EMMPRIN, uma glicoproteína conhecida por sua habilidade de induzir produção de MMP em fibroblastos) em vários tipos de cistos odontogênicos (queratocistos odontogênicos, cistos dentígeros e cistos periapicais). Os resultados demonstraram que a expressão de EMNPRIN foi detectada em todos os cistos, entretanto, foi significativamente maior na linhagem epitelial de queratocistos odontogênicos em relação aos

outros tipos de cistos, sugerindo que EMNPRIN pode estar envolvida com comportamento agressivo deste tipo de cisto.

Com relação à ativação de MMP, esta pode ser estimulada tanto diretamente por produtos microbianos como indiretamente por mediadores químicos e citocinas (Birkedal-Hansen et al., 1993; Reynolds et al., 1994; Reynolds & Meikle, 1997; Palosaari et al., 2000; Wahlgren et al., 2001; Hong et al., 2004; Lu et al., 2010). Os produtos mais suscetíveis de desempenhar um importante papel na ativação de MMP incluem LPS, proteases, lecitinas, tripsina, plasmina e catepsina G (Birkedal-Hansen, 1993; Lin et al., 2003; Hong et al., 2004; Grenier & Grinon, 2006; Yang et al., 2006; Bodet et al., 2007; Sato et al., 2009). Dentre os mediadores químicos e citocinas, a expressão de MMPs e TIMPs pelas células é regulada especialmente por IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, PGE₂ fatores de crescimento como TGF- β , EGF, FGF, dentre outros, como demonstrado anteriormente (Birkedal-Hansen, 1993; Reynolds et al., 1994; Lin et al., 2001; Reynolds & Meikle, 1997; Palosaari et al., 2000; Wahlgren et al., 2001; Tanabe & Grenier, 2008; Lu et al., 2010). Reynolds e Meikle (1997) relataram que a ativação de MMP pode ser mediada pela plasmina, bem como por produtos exógenos, como lipopolissacarídeos (LPS) liberados por bactérias Gram-negativas do biofilme dentário ou das infecções dos canais radiculares. Lin et al. (2003) demonstraram que óxido nítrico liberado de macrófagos após estimulação com LPS pode induzir perda óssea pelo aumento da produção de MMP-1 em osteoblastos.

Em 2004, Hong et al., para verificar o papel do LPS na indução de reabsorção óssea nas alterações periapicais, avaliaram *in vitro* os efeitos do LPS de *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas endodontalis* em macrófagos de camundongos quanto à liberação de IL-1 α , TNF- α e MMP-1. De acordo com os resultados, LPS estimulou a produção de citocinas e a expressão gênica de MMP-1, a qual foi reduzida significativamente com a utilização de anticorpos anti-IL-1 α e

anti-TNF- α . Os autores também verificaram que a utilização de polimixina B reduziu a extensão da reabsorção óssea periapical em ratos e, simultaneamente, reduziu a produção de MMP-1 pelos macrófagos. Contudo, os autores sugeriram que LPS liberado de canais radiculares infectados sinalizam a síntese de IL-1 α e TNF- α por macrófagos e que estas citocinas pró-inflamatórias podem regular a produção de MMP-1 por macrófagos e promover a reabsorção óssea periapical. Grenier & Grignon (2006) demonstraram que LPS de *F. nucleatum* induziu a secreção de IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, PGE₂ em monócitos humanos (U937) diferenciados em macrófagos pelo tratamento com forbol e que a produção de MMP-9 foi significativamente aumentada na presença de LPS na cultura celular.

Bodet et al. (2007), analisando a produção de MMP, TIMPs e ativadores de plasminogênio por fibroblastos estimulados com LPS de *A. actinomycetemcomitans*, verificaram que LPS induziu a produção de MMP-2, do ativador de plasminogênio e de MMP-3 (em menor quantidade). Com relação aos inibidores, LPS estimulou apenas a produção de TIMP-1, não apresentando efeito sobre TIMP-2. Em 2008, Tanabe & Grenier, nesta mesma linha de pesquisa, investigaram a resposta à tolerância de macrófagos humanos quando estimulados com baixas doses de LPS de *A. actinomycetemcomitans* com relação à produção de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, PGE₂ e MMP-9. Os autores demonstraram que a resposta à tolerância foi associada, especialmente, com aumento da secreção de IL-1 β e MMP-9, enquanto que a secreção de IL-6, IL-8 e PGE₂ não foram afetadas. Em 2009, Vilela avaliou a capacidade de diferentes concentrações de LPS de *Escherichia coli* induzir secreção de MMP-3 e MMP-8 por macrófagos e verificaram comportamentos diferentes, sendo que LPS em variadas concentrações induziu significativo aumento de MMP-3 e significativa redução da produção de MMP-8.

Já para comparar os efeitos do LPS tratado com hidróxido de cálcio sobre a produção de MMP-1 e TIMP-1 em osteoblastos, Yang et

al. (2006) verificaram que o tratamento com hidróxido de cálcio foi efetivo na supressão dos efeitos destrutivos da MMP. A expressão de MMP foi regulada para baixo enquanto TIMP foi regulada para cima quando estimulado com LPS de *Prevotella nigrescens* tratado com Ca(OH)_2 , indicando que esta medicação intracanal é efetiva na prevenção da degradação da MEC por reduzir a produção de MMP em células osteoblásticas. Os autores sugerem, ainda, que os efeitos do hidróxido de cálcio na expressão gênica de MMP-1 e TIMP-1 indica que esta medicação detoxifica LPS e que deve ser usada como medicação intracanal de escolha quando LPS estiver presente nos canais radiculares.

Como o papel das MMPs na degradação tecidual tem se tornado evidente em muitas doenças, tentativas de controlar suas atividades por meios farmacológicos têm ganhado muita atenção (Sorsa et al., 2004), como, por exemplo, o desenvolvimento de agentes farmacológicos para inibição de MMP no tratamento de doenças orais (Sorsa et al., 2004). Neste sentido, em 2007, Tjardherane et al. avaliaram os efeitos da tetraciclina quimicamente modificada (CMT-3) na inibição de MMP em lesões periapicais de ratos. Segundo estes autores, as MMPs têm sido largamente aceitas como enzimas que destroem tecidos em condições inflamatórias, entretanto, de forma surpreendente, seu estudo em ratos demonstrou que na inflamação periapical a inibição de MMPs com tetraciclina quimicamente modificada (CMT-3) aumentou a área de necrose pulpar e a taxa de crescimento das lesões periapicais, indicando que MMPs podem ter propriedades anti-infecciosas e anti-inflamatórias até então desconhecidas. De acordo com os autores, estes novos potenciais de efeitos podem abrir completamente uma nova visão sobre o papel funcional da MMP e que muitos estudos devem ser realizados a fim de verificar se estes efeitos anti-inflamatórios e anti-infecciosos são sítios ou tecidos específicos e se estão relacionados com uma única MMP ou com vários membros da família de MMP.

Com isso, pode-se verificar que o papel das MMPs e de seus inibidores é muito amplo e complexo. Além da participação das MMPs nas alterações pulpares e periapicais como demonstrado por diversos estudos acima citados, as MMPs também estão presentes na dentina mineralizada e nas lesões de cárie em dentina (Tjaderhane et al., 1998). De acordo com Hannas et al. (2007), desde que inibidores de MMP como clorexidina, doxiciclina e minociclina têm provado ser eficientes adjuntos na terapia periodontal e tetraciclina e zoledronato ter demonstrado capacidade de suprimir a progressão de cárie dental, o uso de inibidores de MMP na prevenção de cáries e no tratamento de pulpites e periodontites deve ser valorizado em pesquisas futuras, especialmente para elucidar o papel das MMPs na organização do complexo dentina-polpa, patologia pulpar, patogênese da cárie e também degradação da interface dentina-adesivo.

Em 2007, Sulkala et al., sabendo que metaloproteinases colagenolíticas não identificadas juntamente com MMP-2 (gelatinase) e MMP-20 (enamelisina) têm sido detectadas na dentina humana, buscaram caracterizar as possíveis enzimas colagenolíticas presentes na dentina. Para tanto, foi usado o método de *Western blotting* com anticorpos específicos contra MMP-1, -8, -13 e catepsina K. De acordo com os resultados, somente MMP-8 (colagenase 2) foi detectada na dentina. Nas amostras autoclavadas, MMP-8 não foi encontrada, entretanto, atividade de gelatinase foi encontrada em frações de proteína da dentina mineralizada. Os autores concluíram que MMP-8 representa a principal colagenase na dentina humana e que, ao contrário da MMP-8, gelatinases dentinárias podem ser detectadas após autoclavação da dentina, indicando sua alta resistência a procedimentos externos. Segundo os autores, a identificação de MMPs ligadas à dentina bem como o conhecimento de seus papéis nos processos fisiológicos e patológicos pode facilitar o desenvolvimento futuro de novos métodos para prevenção da cárie e da perda de restaurações adesivas.

Nesta mesma linha, sabendo que MMPs estão presentes na dentina coronária e que podem ter um papel na degradação da rede de colágeno em restaurações adesivas, Santos et al. (2009) verificaram se MMPs podem ser detectadas na dentina radicular. Os resultados demonstraram, por zimografia e *Western blotting*, que MMP-2 foi mais evidente na matriz da dentina radicular desmineralizada enquanto que MMP-9 foi mais evidente no compartimento mineralizado da dentina, apresentando níveis mais baixos. MMP-8 foi igualmente distribuída na dentina coronária e radicular. Os autores sugeriram que, como as MMPs estão presentes na dentina radicular, sua contribuição para a degradação da adesão dentina-resina deve ser evidenciada no desenvolvimento de estratégias restauradoras para o substrato radicular. E ainda, que uma possibilidade para controlar a atividade endógena de MMP seria a incorporação de inibidores sintéticos de MMPs durante os procedimentos da restauração adesiva, como, por exemplo, a clorexidina, que é um efetivo inibidor de MMP-2, -8 e -9 (Gendron et al., 1999; Santos et al., 2009).

Esta preocupação também se estende para o selamento dos canais radiculares quando da utilização de cimentos adesivos na obturação dos canais, de modo que Santos et al. (2009) discutiram que a utilização de clorexidina como irrigante endodôntico possivelmente pode inibir a ativação de MMPs, sugerindo que novos estudos devem ser realizados nesta área. Em 2002, Wahlgren et al. também tinha discutido que a clorexidina, que muitas vezes é utilizada como medicação intracanal, pode inibir MMPs (Gendron et al., 1999) e ainda especularam que Ca(OH)_2 , devido ao seu alto pH inicial, pode inativar MMPs, que são proteases neutras. Sabe-se também que EDTA (quelante de íons metálicos) apresenta capacidade de inibir diferentes MMPs. Johnson & Knox (1999) relataram que EDTA quelar íons zinco do sítio ativo de MMPs mas pode também inibir outras enzimas como as proteases dependentes de cálcio. Shimokawa et al. (2002) demonstraram que a atividade

gelatinolítica de MMP-2 e MMP-9 foi inibida por EDTA e EGTA. Wahlgren et al. (2002) sugerem que a inibição de MMPs nos canais radiculares e tecidos periapicais pode oferecer novas oportunidades para o tratamento endodôntico futuro.

Contudo, como verificado na literatura, na última década diversas pesquisas têm focado a compreensão dos mecanismos envolvidos nas alterações pulpares e, especialmente, periapicais, traçando diferentes vias de ativação celular, incluindo LPS, produção de citocinas, fatores de crescimento e metaloproteinases da matriz (Wahlgren et al., 2002; Hong et al., 2004; Yang et al., 2006; Paula-Silva et al., 2010). No entanto, esta relação entre produtos microbianos liberados numa infecção endodôntica, como LPS e ácido lipoteicóico, citocinas (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8), PGE₂, óxido nítrico e fatores de crescimento (como TGF- β) sintetizados e liberados por diferentes tipos celulares, bem como regulação entre MMPs e seus inibidores ainda necessita de mais estudos. Além disso, é bastante interessante a possibilidade de monitorar a atividade inflamatória e o sucesso do tratamento endodôntico pelos níveis de diferentes MMPs, como demonstrado por Wahlgren et al. (2002) e Paula-Silva et al. (2010), de modo que a melhor compreensão do envolvimento de MMPs nas alterações periapicais pode contribuir para a evolução da terapia endodôntica.

3. PROPOSIÇÃO

As propostas deste estudo foram:

A) avaliar *in vivo* os níveis de endotoxinas e metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9) em canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical visível radiograficamente, antes, durante e após a realização do preparo biomecânico utilizando associação de diferentes agentes irrigantes e medicação intracanal.

B) verificar as possíveis correlações existentes entre as quantidades de endotoxinas presentes nos canais radiculares e os níveis de MMP-3, -8 e -9 em todas as coletas realizadas durante o tratamento endodôntico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, protocolo nº 089/2007 – PH/CEP (Anexo 1).

4.1 Seleção dos pacientes

Participaram desta pesquisa 33 pacientes, maiores de 18 anos, da clínica de Endodontia da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. Para inclusão neste estudo, os pacientes apresentaram dentes unirradiculares com necrose pulpar e lesão periapical visível radiograficamente, os quais necessitavam de tratamento endodôntico.

O diagnóstico de necrose pulpar e lesão periapical foi realizado por exame clínico minucioso, que compreendeu testes de sensibilidade pulpar ao frio, testes de percussão, palpação apical e exame radiográfico. Foram excluídos do estudo pacientes que haviam recebido terapia antibiótica nos últimos três meses e dentes com presença de bolsa periodontal superior a 4 mm. Assim, os dentes incluídos na pesquisa apresentaram estrutura dentária remanescente suficiente para permitir adequado isolamento absoluto e boa saúde periodontal.

Os pacientes que efetivamente participaram deste estudo preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, instrumento pelo qual foram informados acerca de sua contribuição para o referido estudo. Os pacientes autorizaram a utilização dos dados obtidos, além de serem informados de outras implicações legais de ordem geral.

Assim, foram selecionados para este estudo 33 dentes unirradiculares (incisivos superiores, caninos superiores e inferiores e premolares inferiores) que, após a realização dos testes de sensibilidade

pulpar e exame radiográfico, apresentaram diagnóstico de necrose pulpar com lesão periapical visível radiograficamente (Figura 1).



FIGURA 1 – Seleção dos dentes: A) Aspecto clínico do dente 11 com diagnóstico de necrose pulpar; B) Exame radiográfico para confirmar a presença de lesão periapical; C) Dente com ausência de comunicação da câmara pulpar com o meio bucal.

4.2 Coleta de dados clínicos

Formulários específicos (fichas clínicas) foram devidamente preenchidos, contendo idade, gênero e o histórico minucioso do paciente (anamnese). Com relação ao dente, foi verificada presença

de cárie, dor espontânea, dor à percussão, dor à palpação, história prévia de dor, saúde periodontal (sondagem), presença de fístula, edema e abscesso.

4.3 Preparo dos canais radiculares – Grupos experimentais

Os tratamentos endodônticos seguiram rigorosamente um protocolo técnico previamente estabelecido. Para tanto, foi realizado isolamento absoluto, utilizando grampo, lençol de borracha e cimento de fosfato de zinco (SS White – Rio de Janeiro – Brasil) na interface dente/lençol/grampo, a fim de impedir qualquer tipo de contaminação por saliva e impedir a passagem de substâncias utilizadas na irrigação do canal radicular para a cavidade bucal do paciente (Figura 2A). A anti-sepsia do campo operatório foi realizada com peróxido de hidrogênio (30%) (Byofórmula Farmácia de Manipulação – São José dos Campos , SP – Brasil) por 30 segundos, seguido de solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Byofórmula Farmácia de Manipulação – São José dos Campos , SP – Brasil) por mais 30 segundos. Após, foi realizada a neutralização da solução de hipoclorito de sódio com tiosulfato de sódio 5% estéril (Byofórmula Farmácia de Manipulação – São José dos Campos , SP – Brasil) (Vianna et al., 2007) (Figura 2B).

O acesso à cavidade pulpar e remoção de teto e demais interferências foi realizado com a utilização de brocas estéreis apirogênicas em alta rotação (esféricas diamantadas de haste longa, tronco-cônicas de guia inativa, endo-Z e batt) (KG Sorensen – Cotia, SP – Brasil) sob irrigação com solução fisiológica estéril apirogênica (Aster Produtos Médicos Ltda – São Paulo, SP – Brasil) (Figura 3A). Para obtenção da primeira amostra (1ª coleta) do conteúdo do canal radicular, os canais foram preenchidos com solução fisiológica estéril apirogênica, que permaneceu por 1 minuto, e foi aspirada com auxílio de seringa e

agulha tipo insulina (Injex Indústrias Cirúrgicas Ltda – Ourinhos, SP – Brasil). Este procedimento foi repetido até obtenção do volume final de 100 μ L (Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011). Esta primeira amostra foi coletada imediatamente após a abertura coronária e antes da utilização de qualquer solução com atividade antimicrobiana (Figura 3B).

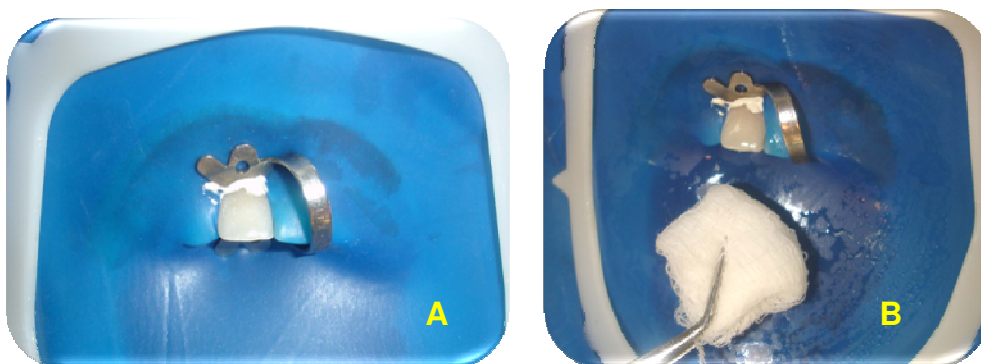


FIGURA 2 – A) Isolamento absoluto do dente a ser tratado; B) Desinfecção do campo operatório previamente à abertura coronária.

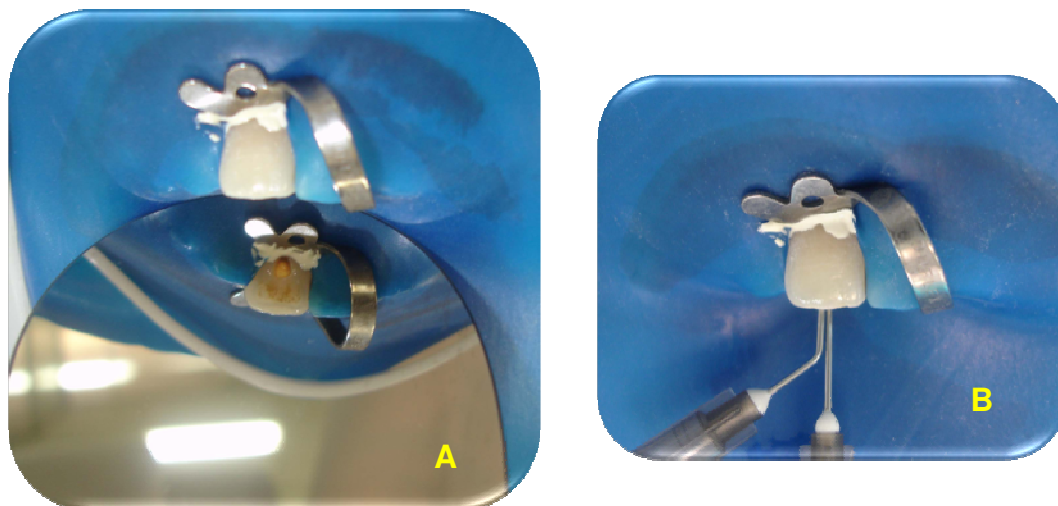


FIGURA 3 – A) Abertura coronária; B) Realização da primeira coleta logo após a abertura coronária.

Após a primeira coleta, os terços cervical e médio dos canais radiculares foram preparados utilizando a técnica coroa-ápice com uso de instrumentos oscilatórios (Endo-Eze – Ultradent Endodontics – USA). As limas do sistema Endo-Eze foram adaptadas ao contra-ângulo Endo-Eze, em um micro-motor Kavo (Kavo do Brasil Indústria e Comércio Ltda – Joinville, SC – Brasil) e o preparo foi realizado com movimentos de rotação alternada de 30 graus para cada lado. Sempre foi utilizado um instrumento manual (lima K 15) entre cada lima do sistema oscilatório (Figura 4).



FIGURA 4- Sistema Endo-Eze.

As limas e todos os demais instrumentais e materiais utilizados na pesquisa foram submetidos à radiação gama Co60 (20 Kgy por 6 horas), para esterilização e eliminação de endotoxinas pré-existentes (Csako et al., 1983; Oliveira et al., 2007; Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011), realizada na EMBRARAD (Empresa Brasileira de Radiação Ltda – Cotia, SP – Brasil).

Assim, tendo como referência a radiografia para diagnóstico, foi determinado o comprimento provisório de trabalho ou pré-odontométrico (CPO = comprimento aparente radiográfico subtraído em 3

mm). Com uma lima tipo Kerr nº 10 foi feita a exploração inicial para localizar a luz do canal e, em seguida, foi utilizado o instrumento 13/.060 do sistema Endo-Eze, com objetivo de remover interferências cervicais, usando os mesmos princípios do “*crown down pressureless technique*”, sempre tendo como medida limitadora o CPO. Em seguida, foi utilizado instrumento manual (lima K 15) para verificar a manutenção da luz do canal.

Na seqüência, foi utilizado o instrumento oscilatório 13/.045, sem pressão, progredindo em direção apical, sempre mantendo como medida limitadora o CPO. Este passo foi seguido da lima manual K 15, instrumento oscilatório 13/.035, lima manual K 15 e instrumento oscilatório 10/.025, até atingir o CPO (Figura 5).

Durante todo o preparo dos terços cervical e médio do canal radicular, foram utilizados 5 mL da solução de hipoclorito de sódio 2,5% (Byofórmula Farmácia de Manipulação – São José dos Campos , SP – Brasil) como solução irrigadora, renovada a cada troca de instrumento. Ao atingir o CPO, foi colocado um instrumento manual para realização da odontometria.

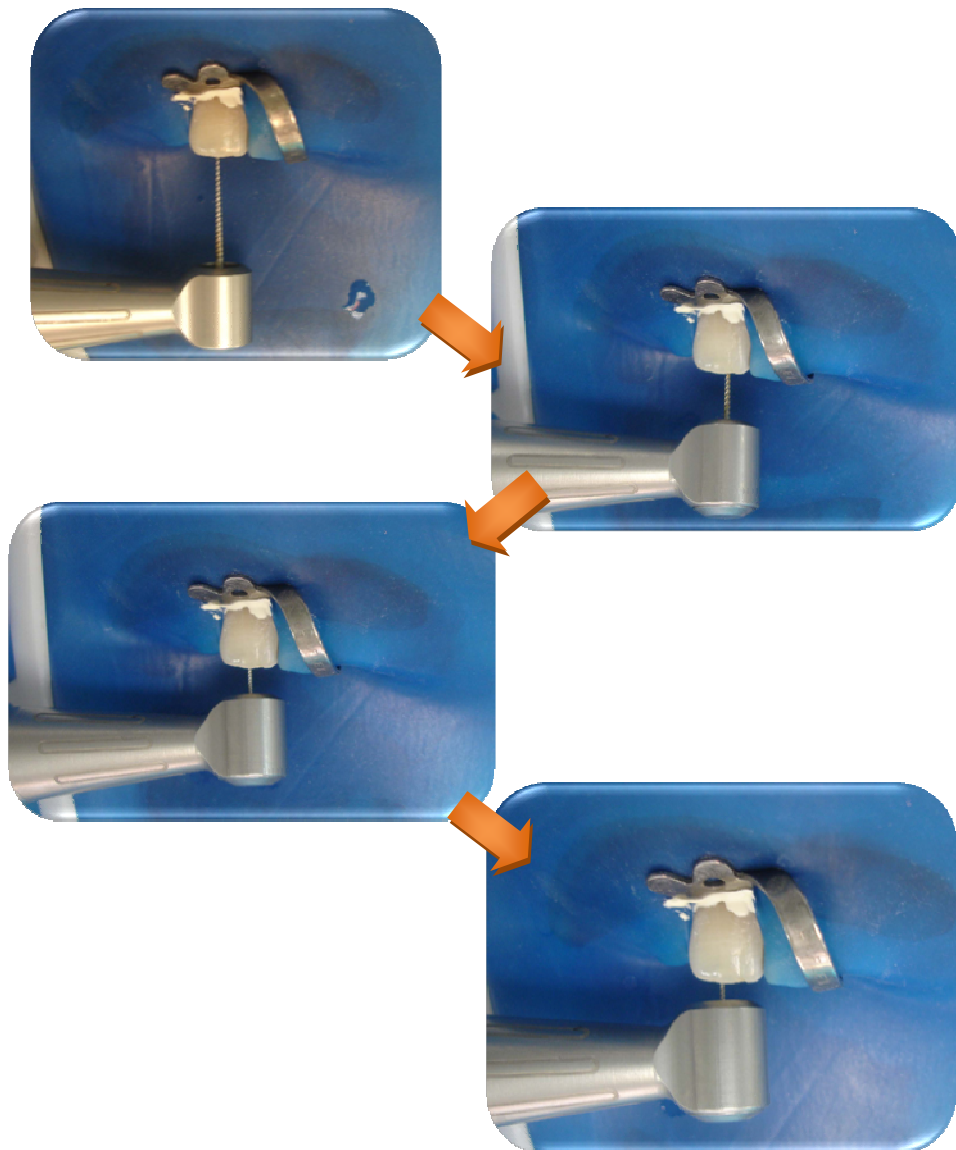


FIGURA 5 – Seqüência de preparo dos terços cervical e médio do canal com instrumentos do sistema Endo-Eze (13/.060, 13/.045, 13/.035, 10/.025).

Após a obtenção do comprimento do dente, foi realizado o preparo apical (0,5 a 1 mm aquém do ápice radiográfico) com a utilização de 4 limas manuais tipo Kerr (Figura 6). Assim, de acordo com a associação de substâncias químicas auxiliares utilizadas durante o preparo apical, os dentes foram divididos em 3 grupos experimentais (n=11): G1) NaOCl 2,5% (controle); G2) NaOCl 2,5%, seguido de água de

cal $[\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,14%]; G3) NaOCl 2,5%, seguido de polimixina B (Quadro 1) (Figura 7).

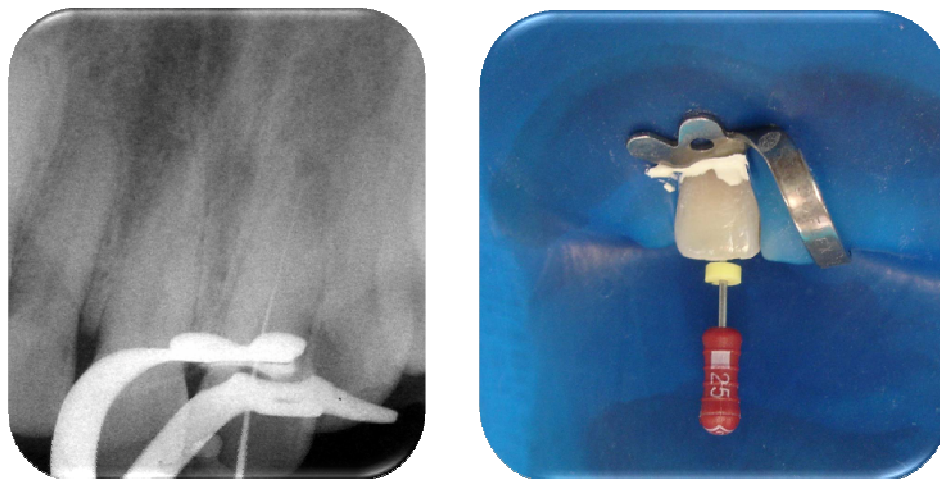


FIGURA 6 – Odontometria e Preparo do batente apical com instrumentos manuais.

Quadro 1 – Divisão dos grupos experimentais.

Grupos	IRRIGAÇÃO	MEDICAÇÃO
G1 (controle, n=11)	NaOCl 2,5%	clorexidina gel 2% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$
G2 (n=11)	NaOCl 2,5% seguido de água de cal $[\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,14%]	clorexidina gel 2% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$
G3 (n=11)	NaOCl 2,5% seguido de polimixina B	clorexidina gel 2% + $\text{Ca}(\text{OH})_2$



FIGURA 7 – Irrigação/Aspiração com a solução irrigadora.

Desta forma, no grupo G1 (controle), para as quatro limas usadas na confecção do batente apical, foi utilizada solução de hipoclorito de sódio 2,5%, sendo 5 mL a cada troca de lima.

No grupo G2, para as duas primeiras limas usadas na confecção do batente apical, foi utilizada solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Em seguida, para as duas últimas limas, foram utilizados 5 mL de água de cal [Ca(OH)_2 0,14%], a cada troca de instrumento, como agente irrigante, com a finalidade de promover uma possível neutralização de endotoxinas após a morte das bactérias Gram-negativas. Após a última lima, os canais foram novamente preenchidos com água de cal [Ca(OH)_2 0,14%], que foi agitada por 3 minutos (lima K 25), antes da irrigação final com solução fisiológica apirogênica.

No grupo G3, para as duas primeiras limas usadas na confecção do batente apical, foi utilizada solução de hipoclorito de sódio 2,5%. Em seguida, para as duas últimas limas, foi utilizada polimixina B (10.000 UI/mL – Ophthalmos; São Paulo - SP) + solução fisiológica apirogênica como agente irrigante, também com a finalidade de promover uma possível neutralização de endotoxinas após a morte das bactérias Gram-negativas. Após a última lima, os canais foram novamente preenchidos com polimixina B, que foi agitada por 3 minutos (lima K 25), antes da irrigação final com solução fisiológica apirogênica. Para a colocação da solução de polimixina B no interior do canal radicular, foi utilizada uma seringa tipo insulina. A cada renovação do instrumento, o canal era irrigado com 5 mL de solução fisiológica apirogênica para auxiliar na renovação da solução.

Após o término do preparo biomecânico, em todos os canais radiculares foi realizada uma irrigação final com 5 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica e, em seguida, foi realizada a segunda

coleta do conteúdo do canal radicular, conforme descrito para a coleta inicial.

Todos os canais radiculares foram inundados com ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17%, o qual foi agitado com uma lima tipo Kerr por 3 minutos e foi removido com 5 mL de solução fisiológica estéril e apirogênica. Após a aplicação do EDTA para remoção da *smear layer*, foi realizada a terceira coleta do canal radicular. Em seguida, os canais foram secos, com uso de cones de papel absorvente (estéril e apirogênico) de tamanho compatível ao canal radicular, e preenchidos com medicação intracanal.

Foi manipulada uma pasta de clorexidina gel a 2% (Byofórmula Farmácia de Manipulação – São José dos Campos, SP – Brasil) associada ao hidróxido de cálcio P.A. (Biodinâmica – Ibiporã, PR, Brasil), em proporções iguais em volume, na consistência de pasta dental. A medicação foi levada aos canais radiculares com a utilização de espiral Lentulo apirogênico, em baixa rotação, sendo a mesma para todos os grupos (Quadro 1). A restauração provisória foi realizada com cimento de ionômero de vidro (CIV).

Após 14 dias de permanência da medicação (MIC), foi realizado isolamento e anti-sepsia do campo operatório, remoção da restauração provisória (CIV), irrigação e aspiração dos canais radiculares com 10 mL de solução fisiológica apirogênica para remoção da medicação intracanal com auxílio de uma lima tipo Kerr (instrumento memória). Em seguida, foi realizada a quarta e última coleta do conteúdo dos canais.

Para finalização do tratamento endodôntico, todos os canais radiculares foram obturados com cones de guta-percha e cimento AH Plus, pela técnica da condensação lateral ativa. A obturação foi realizada somente quando constatada ausência de sintomatologia, bem como de exsudato, sangramento e odor.

Após o término do tratamento endodôntico, os dentes foram devidamente restaurados e encontram-se atualmente em proservação dos casos por um período mínimo de 2 anos para avaliar o sucesso do tratamento.

4.4 Coletas do conteúdo do canal radicular

Foram realizadas 4 coletas dos canais radiculares: 1ª) imediatamente após abertura coronária; 2ª) após preparo biomecânico; 3ª) após aplicação do EDTA; 4ª) após remoção da medicação intracanal (Quadro 2).

Quadro 2 – Coletas dos canais radiculares.

Coletas	Momento da realização das coletas
1ª (C1)	Imediatamente após abertura coronária
2ª (C2)	Após preparo biomecânico
3ª (C3)	Após aplicação do EDTA
4ª (C4)	Após remoção da medicação intracanal (MIC)

Todas as coletas do conteúdo do canal radicular foram realizadas da seguinte forma: os canais foram inundados com solução fisiológica estéril e apirogênica, a qual foi agitada por 1 minuto com uma lima estéril e apirogênica e, em seguida, foi aspirada com auxílio de seringa e agulha tipo insulina. Este procedimento foi repetido até completar o volume final da amostra de 100 µL. As amostras coletadas foram transferidas para microtubos de polipropileno (Axygen, California - USA) contendo 900 µL de água estéril e apirogênica (Lonza Group Ltd, Switzerland). Todas as amostras foram utilizadas para quantificação de endotoxinas e metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9).

4.5 Quantificação de endotoxinas (LPS) pelo teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL)

Para todas as coletas dos canais radiculares foi realizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (análise quantitativa) (Lonza Group Ltd, Switzerland) para verificar a presença de endotoxinas (Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011).

Nos dias das coletas, foram realizadas diluições da endotoxina padrão de *E. coli* (Figura 8) em diferentes concentrações que representaram os padrões de comparação das amostras (curva-padrão). Para cada amostra, foi realizado um controle positivo (amostra do conteúdo do canal radicular adicionada de uma quantidade conhecida de endotoxina), para verificar a presença ou não de interferentes.

Em uma microplaca apirogênica de 96 poços, foram adicionados 100 µL de água apirogênica (branco da reação), os padrões de endotoxina, as amostras coletadas dos canais radiculares e os controles positivos (Figura 9). Os testes foram realizados em quadruplicata. A placa foi incubada no leitor cinético KQCL (Cambrex Bio Ciência Brasil, SP) (Figura 10) a $37\pm1^{\circ}\text{C}$ por 10 min, o qual estava acoplado a um microcomputador com *software* Wink KQCL específico para gerenciamento, execução e emissão de relatórios. À seguir, foram adicionados em cada poço da placa 100 µL do reagente cinético cromogênico do LAL, com uma micropipeta de 8 canais e ponteiros apirogênicos. Após o início do ensaio cinético, o *software* da leitora de microplacas monitorou, de forma contínua durante todo o ensaio, a absorbância a 405 nm em cada poço da microplaca. O leitor determinou o tempo necessário para aumentar a absorbância de cada poço a 0,200 unidades de absorbância, que foi denominado tempo de reação. O *software* Wink KQCL automaticamente calculou 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.

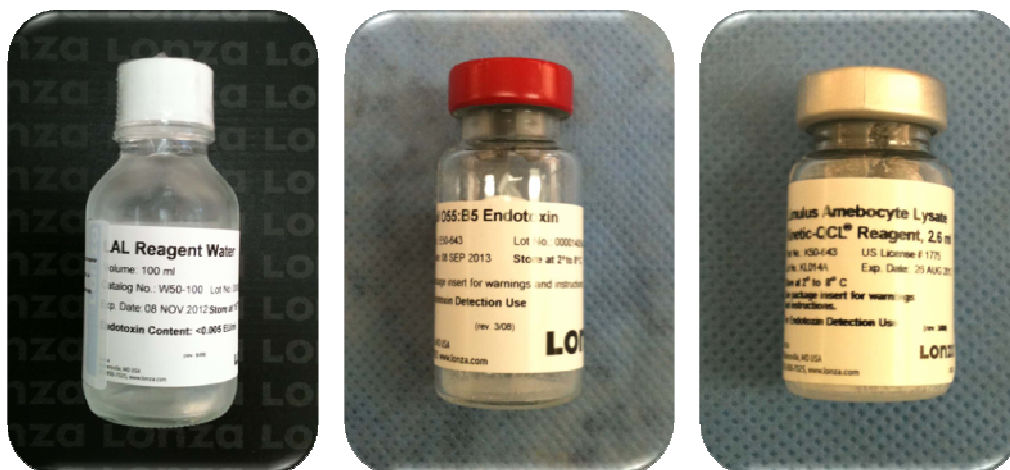


FIGURA 8 – Kit para detecção de endotoxinas (método cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus*).



FIGURA 9 – Distribuição das amostras, controles positivos, curva-padrão de endotoxina e branco da reação, de acordo com *software* Wink KQCL.

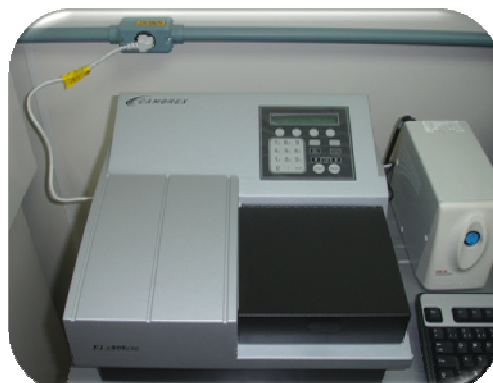


FIGURA 10 – Leitor cinético de microplacas.

Os valores do percentual de redução das quantidades de endotoxinas entre as coletas foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%).

4.6 Detecção e quantificação de metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9) – teste imunoenzimático ELISA

A quantificação de metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9) em todas as amostras coletadas dos canais radiculares foi realizada por ensaios imunoenzimáticos (ELISA) utilizando Kits específicos para cada metaloproteinase (R&D Systems) – (Figura 11).



FIGURA 11 – Kits (R&D Systems) para detecção de MMP-3, MMP-8 e MMP-9.

Assim, microplacas de 96 poços (MaxiSorp, Nunc, Thermo Fisher Scientific, Dinamarca) foram previamente sensibilizadas com anticorpos de captura anti-MMP-3, anti-MMP-8 ou anti-MMP-9 (100 μ L/poço). As placas foram mantidas *overnight* em temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem (PBS com 0,05% de Tween 20) e bloqueadas com 300 μ L de tampão de bloqueio (PBS com 1% de soro albumina bovina, BSA) por 1 hora à temperatura ambiente. Após, foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e receberam 100 μ L das amostras coletadas dos canais radiculares e 100 μ L dos padrões da MMP (MMP-3, MMP-8 ou MMP-9) com concentrações conhecidas (curva-padrão) (Figura 12). Os testes foram realizados em duplicata e as placas foram mantidas 2 horas à temperatura ambiente. Após, as placas foram novamente lavadas 3 vezes com tampão de lavagem e foram acrescentados 100 μ L de anticorpos de detecção anti-MMP-3, anti-MMP-8 ou anti-MMP-9 marcados com biotina (Figura 13). As placas foram mantidas por 2 horas em temperatura ambiente. Após lavagem, foi acrescentada estreptavidina associada à peroxidase (100 μ L/poço) e as placas foram mantidas por 20 min cobertas com papel alumínio para evitar luz direta. Após lavagem, a reação foi revelada com 100 μ L de solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio. As placas foram tampadas com papel alumínio para evitar a luz direta e mantidas em temperatura ambiente por 20 min. Em seguida, foram adicionados em cada poço da placa 50 μ L de solução *stop* (ácido sulfúrico 2 N) (Figura 14). As densidades ópticas (DO) foram lidas no leitor de microplacas com comprimento de onda de 450 nm.

Após obtenção das densidades ópticas, os níveis de MMP-3, MMP-8 e MMP-9 (pg/mL) presentes nos canais radiculares foram determinados utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

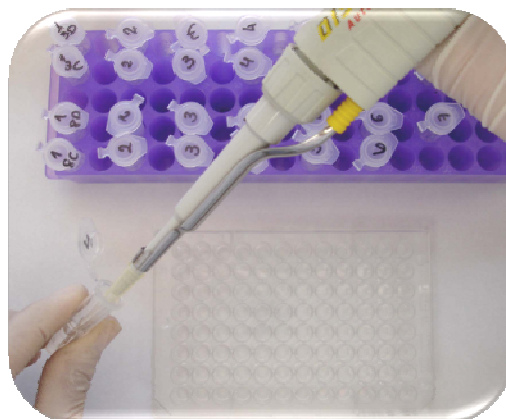


Figura 12 – Distribuição da curva-padrão e das amostras na microplaca de ELISA.

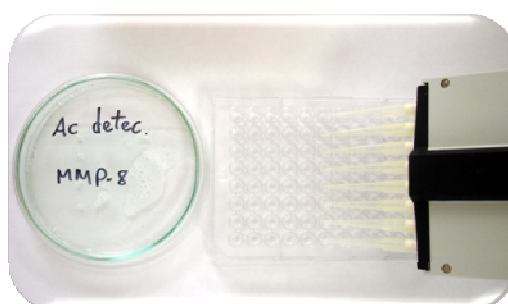


Figura 13 – Distribuição do anticorpo de detecção anti-MMP-8.



Figura 14: A) Reação revelada após adição do substrato cromogênico; B) Adição do ácido sulfúrico; C) Reação finalizada.

Os valores para o percentual de redução entre as coletas foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%).

No intuito de verificar possíveis correlações entre os valores de endotoxinas e MMPs aferidos em todas as coletas para os três grupos avaliados, foi também realizado o teste de Correlação Ordinal de Sperman (Graph Pad Prism – version 5.0, 2007).

5. RESULTADOS

5.1 Quantificação de endotoxinas

Os valores médios de endotoxinas (EU/mL) obtidos em cada dente nas quatro coletas (C1 - após a abertura coronária; C2 - após o preparo biomecânico; C3 - após o uso do EDTA e C4 – após o uso da medicação intracanal) dos 3 grupos avaliados estão dispostos nas tabelas 1 a 3, juntamente com os percentuais médios de redução entre as coletas.

Para o cálculo do percentual de redução da quantidade de endotoxina entre as coletas, foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Red12: } [('C1' - 'C2') / 'C1'] * 100$$

$$\text{Red23: } [('C2' - 'C3') / 'C2'] * 100$$

$$\text{Red24: } [('C2' - 'C4') / 'C2'] * 100$$

Alteração Percentual: se for positivo é Redução

Alteração Percentual: se for negativo é Aumento

Onde **Red12** foi a redução encontrada na quantidade endotoxinas da 1^a para 2^a coleta (entre a coleta inicial e após o preparo biomecânico). **Red 23** foi a redução entre 2^a e 3^a coletas (entre a coleta após preparo biomecânico e a coleta após o uso do EDTA) e **Red 24** foi a redução encontrada entre a 2^a e 4^a coletas (entre a coleta após o preparo biomecânico e a coleta após o uso da medicação intracanal).

Tabela 1 – Valores médios de endotoxinas (EU/mL) das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G1* e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	Red12	Red23	Red24
1	211,0	13,30	7,14	62,0	93,69	46,31	-366,16
2	3020,0	2700,0	428,0	69,80	10,59	84,14	97,41
3	2080,0	2100,0	37,70	21,0	-0,96	98,20	99,00
4	24,3	47,60	47,30	7,30	-95,88	0,63	84,66
5	218,0	32,60	20,30	14,90	85,04	37,73	54,29
6	93,4	891,0	205,0	88,50	-853,96	76,99	90,06
7	31,6	16,0	31,80	13,30	49,36	-98,75	16,87
8	34,8	26,20	4,72	8,44	24,71	81,98	67,78
9	50000,0	6680,0	1070,0	618,0	86,64	83,98	90,74
10	440,0	217,0	183,0	6,49	50,68	15,66	97,00
11	472,0	174,0	45,40	142,0	63,13	73,90	18,39
Média	5148	1173	189,1	95,6			
±	±	±	±	±			
desvio-padrão	14908	2051	319,0	178,6			

*G1: Irrigação com NaOCl 2,5% e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%.

Tabela 2 – Valores médios de endotoxinas (EU/mL) das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G2 e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	Red12	Red23	Red24
1	4360,0	342,0	612,0	152,0	92,15	-78,94	55,55
2	1010,0	160,0	289,0	131,0	84,15	-80,62	18,12
3	8830,0	337,0	229,0	50,10	96,18	32,04	85,13
4	766,0	471,0	479,0	20,50	38,51	-1,69	95,64
5	1430,0	7,45	4,38	25,90	99,47	41,20	-247,65
6	46,5	22,0	55,30	9,88	52,68	-151,36	55,09
7	188,0	26,20	37,10	24,50	86,06	-41,60	6,48
8	18,8	12,80	14,0	5,57	31,91	-9,37	56,48
9	10,5	30,10	22,30	18,10	-186,6	25,91	39,86
10	336,0	84,50	108,0	35,50	74,85	-27,81	57,98
11	68,1	8,14	17,20	13,10	88,04	-111,30	-60,93
Média	1551	136,5	169,8	44,2			
±	±	±	±	±			
desvio-padrão	2726	168,1	209,8	49,9			

*G2: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de água de cal [Ca(OH)₂ 0,14%] e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%.

Tabela 3 – Valores médios de endotoxinas (EU/mL) das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G3* e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	COLETA 1	COLETA 2	COLETA 3	COLETA 4	Red12	Red23	Red24
1	36,1	31,40	28,40	12,20	13,01	9,55	61,14
2	4480,0	27,20	38,20	10,60	99,39	-40,44	61,02
3	511,0	15,50	7,71	52,50	96,96	50,25	-238,71
4	802,0	32,50	16,50	41,90	95,94	49,23	-28,92
5	2710,0	63,20	8,69	19,90	97,66	86,25	68,51
6	73,6	42,10	43,50	3,95	42,79	-3,32	90,61
7	1370,0	5,82	20,70	9,0	99,57	-255,67	-54,63
8	7,9	5,82	19,50	7,37	26,60	-235,05	-26,63
9	1110,0	9,31	77,40	5,96	99,16	-731,36	35,98
10	898,0	290,0	140,0	89,30	67,70	51,72	69,20
11	791,0	7,65	15,20	4,85	99,03	-98,69	36,60
Média	1163	48,2	37,8	23,41			
±	±	±	±	±			
desvio-padrão	1342	82,2	39,3	27,06			

*G3: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de Polimixina B e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%.

Foi realizada inicialmente a estatística descritiva dos valores de endotoxinas (EU/mL) em cada uma das quatro coletas para os três grupos experimentais (Tabela 4).

Tabela 4 – Estatística descritiva dos valores de endotoxinas (EU/mL) apresentados em cada coleta para os três grupos experimentais (mediana, valores máximos e valores mínimos).

Variável (coletas)	Grupos	Mínimo	Mediana	Máximo
C1	G1	24	218	50000
C1	G2	11	336	8830
C1	G3	8	802	4480
C2	G1	13	174	6680
C2	G2	7,5	30,1	471,0
C2	G3	5,8	27,2	290,0
C3	G1	4,7	45,4	1070,0
C3	G2	4,4	55,3	612,0
C3	G3	7,7	20,7	140,0
C4	G1	6,5	21,0	617,0
C4	G2	5,6	24,5	152,0
C4	G3	3,95	10,60	89,30

As Figuras 15 a 18 demonstram a quantidade de endotoxinas (EU/mL) (mediana e faixa interquartil) obtida em cada grupo experimental nas coletas 1 a 4, respectivamente.

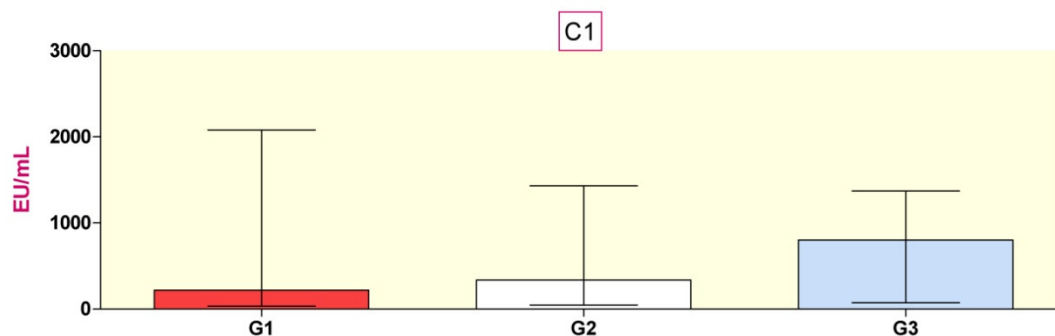


Figura 15 – Quantidade de endotoxinas (EU/mL) (mediana e faixa interquartil) obtida em cada grupo experimental na 1ª coleta (inicial).

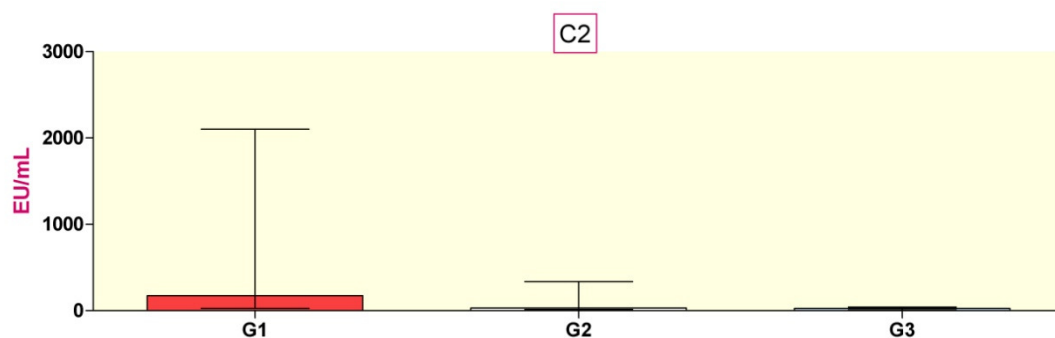


Figura 16 – Quantidade de endotoxinas (EU/mL) (mediana e faixa interquartil) obtida em cada grupo experimental na 2ª coleta (após PBM).

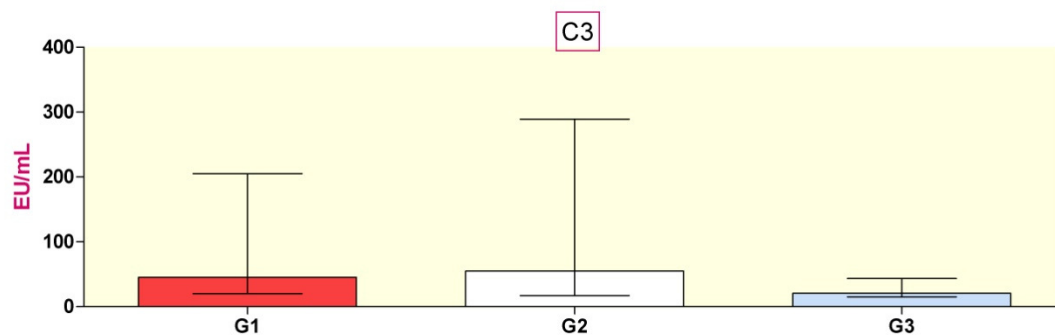


Figura 17 – Quantidade de endotoxinas (EU/mL) (mediana e faixa interquartil) obtida em cada grupo experimental na 3ª coleta (após uso de EDTA).

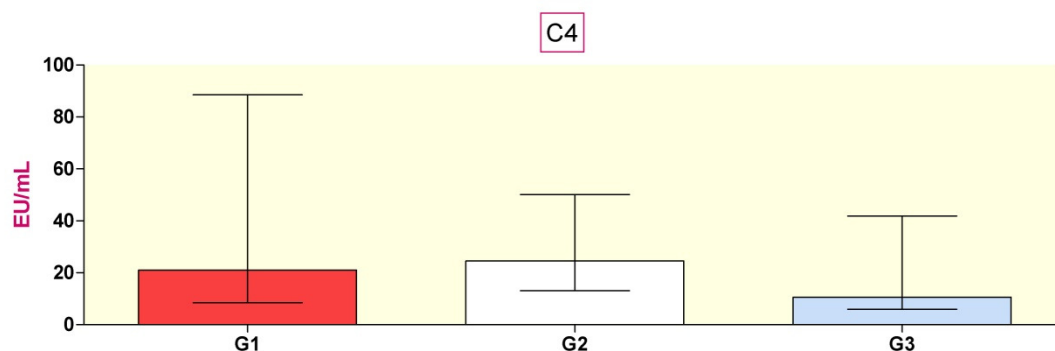


Figura 18 – Quantidade de endotoxinas (EU/mL) (mediana e faixa interquartil) obtida em cada grupo experimental na 4^a coleta (após MIC).

A Figura 19 demonstra as alterações dos percentuais de redução de endotoxinas entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

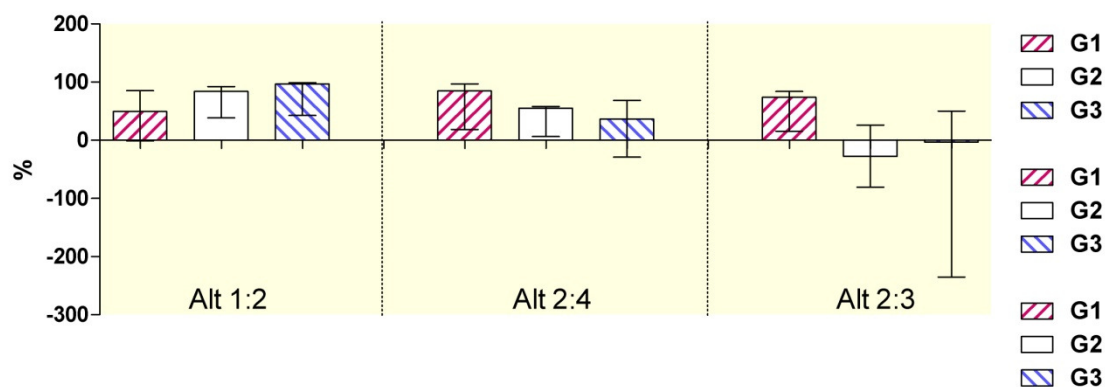


Figura 19 – Representação gráfica das alterações dos percentuais de redução de endotoxinas entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

Os valores do percentual de redução foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%). Na comparação da redução da 1^a para a 2^a coleta (Red12 – entre a coleta inicial e após preparo biomecânico PBM) entre os grupos, verificou-se que o grupo G3 (NaOCl 2,5% seguido de polimixina B) juntamente com o

grupo G2 {NaOCl 2,5% seguido de água de cal [Ca(OH)₂ 0,14%]} apresentaram os maiores índices de redução de endotoxinas durante o preparo biomecânico (Tabela 5), sendo semelhantes entre si ($p>0,05$). O grupo G1 (NaOCl 2,5%) apresentou o menor percentual de redução, sendo estatisticamente diferente de G3 ($p<0,05$), no entanto, foi semelhante a G2 ($p>0,05$) (Tabela 6).

Tabela 5 – Percentuais (mediana) obtidos na Red12 (entre 1ª e 2ª coleta) de endotoxinas entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis (p -valor = 0,0294 < 0,05) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos	
G3	22,182	97,0%	A	
G2	17,545	84,2%	A	B
G1	11,273	49,4%		B

Na comparação do percentual de redução entre a 2ª e 3ª coletas (Red 23 – entre a coleta após PBM e o uso de EDTA), observou-se que os grupos G1 e G3 apresentaram os maiores valores de redução, sendo semelhantes entre si ($p>0,05$) (Tabela 6). O grupo G2 apresentou o menor valor de redução sendo estatisticamente diferente de G1 ($p<0,05$) e semelhante a G3 ($p>0,05$).

Tabela 6 – Percentuais (mediana) obtidos na Red23 (entre 2ª e 3ª coleta) de endotoxinas entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis (p -valor = 0,0142 < 0,05) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos	
G1	23,818	73,9%	A	
G3	14,727	-3,3%	A	B
G2	12,455	-27,8%		B

Com relação à comparação entre a 2ª e 4ª coletas (Red 24 – entre a coleta após PBM e após MIC), verificou-se que não houve

diferença estatisticamente significativa entre os três grupos ($p > 0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 – Percentuais (mediana) obtidos na Red24 (entre 2ª e 4ª coleta) de endotoxinas entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,1862 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G1	21,364	84,7%	A
G2	14,909	55,1%	A
G3	14,727	36,6%	A

5.2 Detecção e quantificação de metaloproteinases da matriz (MMP-3, MMP-8 e MMP-9)

5.2.1 MMP-3

Os valores médios (pg/mL) de MMP-3 obtidos em cada dente nas quatro coletas (C1 - após a abertura coronária; C2 - após o preparo biomecânico; C3 - após o uso do EDTA e C4 – após o uso da medicação intracanal) dos 3 grupos avaliados estão dispostos nas tabelas 8 a 10, juntamente com os percentuais de redução entre as coletas.

Tabela 8 - Valores médios (pg/mL) de MMP-3 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G1** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	4,92	0,00	4,44	4,06	100,00	*	*
2	0,00	0,00	8,06	5,30	*	*	*
3	0,00	5,56	4,17	2,82	*	25,00	49,28
4	5,94	5,80	5,56	5,54	2,35	4,13	4,48
5	6,84	1,59	4,56	0,58	76,75	-186,79	63,52
6	0,00	0,00	3,82	3,06	*	*	*
7	2,10	6,45	5,30	4,06	-207,14	17,82	37,05
8	6,33	4,66	4,44	4,32	26,38	4,72	7,29
9	0,00	6,96	4,44	1,20	*	36,20	82,75
10	0,00	6,84	3,90	3,44	*	42,98	49,70
11	5,94	6,58	2,06	0,33	-10,77	68,69	94,98
Média ± desvio- padrão	2,91 ± 3,04	4,04 ± 2,99	4,61 ± 1,45	3,15 ± 1,78			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G1: Irrigação com NaOCl 2,5% e MIC com Ca(OH)_2 +CLX 2%

Tabela 9 - Valores médios (pg/mL) de MMP-3 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G2** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	4,14	2,74	4,94	4,44	33,81	-80,29	-62,04
2	1,34	0,00	3,44	2,20	100,00	*	*
3	0,00	0,00	3,44	2,20	*	*	*
4	3,38	4,40	1,94	2,70	-30,17	55,90	38,63
5	1,84	4,79	1,63	3,18	-160,32	65,97	33,61
6	3,34	2,78	4,18	4,56	16,76	-50,35	-64,02
7	2,44	3,15	5,06	3,68	-29,09	-60,63	-16,82
8	0,00	0,00	2,32	4,06	*	*	*
9	6,28	5,42	4,08	6,08	13,69	24,72	-12,17
10	26,66	6,60	4,88	5,82	75,24	26,06	11,81
11	1,12	10,42	10,34	2,50	-830,35	0,76	76,00
Média ± desvio- padrão	4,59 ± 7,55	3,66 ± 3,18	4,20 ± 2,36	3,76 ± 1,36			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G2: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de água de cal $[\text{Ca(OH)}_2]$ 0,14% e MIC com Ca(OH)_2 +CLX 2%

Tabela 10 - Valores médios (pg/mL) de MMP-3 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G3** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	8,16	8,28	8,08	4,36	-1,47	2,41	47,34
2	0,17	6,39	2,62	6,74	-3658,82	58,99	-5,47
3	5,90	7,44	5,42	3,52	-26,10	27,15	52,68
4	6,50	5,78	14,44	10,60	11,08	-149,82	-83,39
5	7,56	5,54	5,68	2,10	26,72	-2,52	62,09
6	0,00	5,54	1,44	3,82	*	74,00	31,04
7	151,50	6,14	14,98	2,62	95,95	-143,97	57,32
8	8,40	0,00	1,84	3,56	100,00	*	*
9	4,10	1,36	7,54	5,42	66,83	-454,41	-298,52
10	4,82	2,68	3,96	5,94	44,40	-47,76	-121,64
11	5,80	3,30	0,00	0,00	43,10	100,00	100,00
Média ± desvio- padrão	18,4 ± 44,2	4,76 ± 2,59	6,00 ± 4,99	4,42 ± 2,77			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G3: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de Polimixina B e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%

Foi realizada inicialmente a estatística descritiva (coeficiente de variação, valores máximos, valores mínimos e mediana) dos valores de MMP-3 (pg/mL) em cada uma das quatro coletas para os três grupos experimentais (Tabela 11).

Tabela 11 – Estatística descritiva dos valores de MMP-3 (pg/mL) apresentados em cada coleta para os três grupos experimentais (coeficiente de variação, valores máximos, valores mínimos e mediana).

Variável (coletas)	Grupos	Coeficiente de variação	Mínimo	Mediana	Máximo
C1	G1	104,34	0,00	2,100	6,84
C1	G2	164,34	0,00	2,44	26,66
C1	G3	239,72	0,00	5,9	151,5
C2	G1	74,00	0,00	5,56	6,96
C2	G2	86,89	0,00	3,15	10,42
C2	G3	54,31	0,00	5,54	8,28
C3	G1	31,55	2,06	4,44	8,06
C3	G2	56,22	1,63	4,08	10,34
C3	G3	83,12	0,00	5,42	14,98
C4	G1	56,62	0,33	3,44	5,54
C4	G2	36,35	2,20	3,68	6,08
C4	G3	62,69	0,00	3,82	10,60

A Figura 20 demonstra as alterações dos percentuais de redução de MMP-3 entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

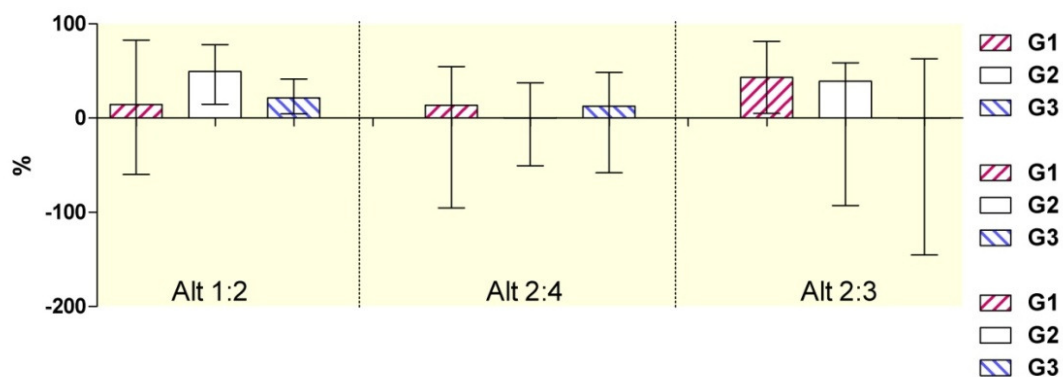


Figura 20 – Representação gráfica das alterações dos percentuais de redução de MMP-3 entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

Os valores para o percentual de redução foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%), onde foi confirmada ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas coletas 1 e 2 (Red12), 2 e 3 (Red23) e entre 2 e 4 (Red24) para todos os grupos experimentais estudados ($p > 0,05$) (Tabelas 12 a 14).

Tabela 12 - Percentuais (mediana) obtidos na Red12 (entre 1ª e 2ª coleta) de MMP-3 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,6747 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G3	14,30	35,0%	A
G1	13,33	14,4%	A
G2	11,33	13,7%	A

Tabela 13 - Percentuais (mediana) obtidos na Red23 (entre 2ª e 3ª coleta) de MMP-3 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,7980 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G1	15,0	21,4%	A
G2	13,0	12,7%	A
G3	12,7	-0,1%	A

Tabela 14 - Percentuais (mediana) obtidos na Red24 (entre 2ª e 4ª coleta) de MMP-3 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,1856 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G1	17,37	49,5%	A
G3	12,80	39,2%	A
G2	10,50	-0,2%	A

5.2.2 MMP-8

Os valores médios (pg/mL) de MMP-8 obtidos em cada dente nas quatro coletas (C1 - após a abertura coronária; C2 - após o preparo biomecânico; C3 - após o uso do EDTA e C4 – após o uso da medicação intracanal) dos 3 grupos avaliados estão dispostos nas tabelas 15 a 17, juntamente com os percentuais de redução entre as coletas.

Tabela 15 - Valores médios (pg/mL) de MMP-8 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G1** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	0,00	1,40	0,00	0,00	*	100	100
2	2103,40	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
3	4430,16	1,14	0,00	0,00	99,97	100	100
4	35,92	3,48	0,00	0,00	90,31	100	100
5	13,42	8,72	0,00	0,00	35,02	100	100
6	1868,74	0,35	0,00	0,00	99,98	100	100
7	70,52	0,61	0,00	0,00	99,13	100	100
8	7,68	1,14	0,00	0,00	85,15	100	100
9	3162,32	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
10	2123,92	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
11	68,36	0,09	0,00	0,00	99,86	100	100
Média ± desvio- padrão	1262 ± 1567	1539 ± 2591	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G1: Irrigação com NaOCl 2,5% e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%

Tabela 16 - Valores médios (pg/mL) de MMP-8 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G2** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	3415,60	22,84	0,00	6,20	99,33	100	72,85
2	20,50	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
3	0,00	0,00	0,00	0,00	*	*	*
4	4,80	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
5	52,14	0,61	0,00	0,00	98,83	100	100,00
6	746,54	153,11	0,00	5,78	79,49	100	96,22
7	0,00	0,35	0,00	0,00	*	100	100,00
8	100,90	0,61	0,00	0,00	99,39	100	100,00
9	0,00	0,00	0,00	1,74	*	*	*
10	5159,38	0,00	13,02	7,54	100,00	*	*
11	4297,96	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
Média ± desvio- padrão	1254 ± 2001	16,1 ± 45,9	1,18 ± 3,93	1,933 ± 3,01			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G2: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de água de cal $[\text{Ca}(\text{OH})_2$ 0,14%] e MIC com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +CLX 2%

Tabela 17 - Valores médios (pg/mL) de MMP-8 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G3** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	2559,10	0,00	11,41	10,80	100,00	*	*
2	1071,24	0,00	1,35	1,19	100,00	*	*
3	0,00	0,00	7,80	3,60	*	*	*
4	1,44	0,00	3,77	0,55	100,00	*	*
5	0,00	0,00	1,19	6,35	*	*	*
6	3528,24	0,00	0,13	8,82	100,00	*	*
7	4014,22	33,62	88,44	27,54	99,16	-163,05	18,08
8	0,00	6,94	0,00	0,00	*	100,00	100,00
9	899,50	66,59	0,00	0,00	92,59	100,00	100,00
10	4020,08	364,00	191,28	79,48	90,94	47,45	78,16
11	0,00	1,62	0,00	0,00	*	100,00	100,00
Média ± desvio- padrão	1463 ± 1723	43,0 ± 108,5	27,8 ± 60,1	12,58 ± 23,63			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G3: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de Polimixina B e MIC com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ +CLX 2%

Foi realizada inicialmente a estatística descritiva (coeficiente de variação, valores máximos, valores mínimos e mediana) dos valores de MMP-8 (pg/mL) em cada uma das quatro coletas para os três grupos experimentais (Tabela 18).

Tabela 18 – Estatística descritiva dos valores de MMP-8 (pg/mL) apresentados em cada coleta para os três grupos experimentais (coeficiente de variação, valores máximos, valores mínimos e mediana).

Variável (coletas)	Grupos	Coeficiente de variação	Mínimo	Mediana	Máximo
C1	G1	124,11	0,0	71	4430
C1	G2	159,49	0,0	52	5159
C1	G3	117,76	0,0	900	4020
C2	G1	168,37	0,0	0,61	8,720
C2	G2	284,64	0,0	0,0	153,1
C2	G3	252,52	0,0	0,0	364,0
C3	G1	*	0,0	0,0	0,0
C3	G2	331,66	0,0	0,0	13,02
C3	G3	216,55	0,0	1,4	191,3
C4	G1	*	0,0	0,,0	0,0
C4	G2	155,77	0,0	0,0	7,54
C4	G3	187,93	0,0	3,6	79,48

A Figura 21 demonstra as alterações dos percentuais de redução de MMP-8 entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

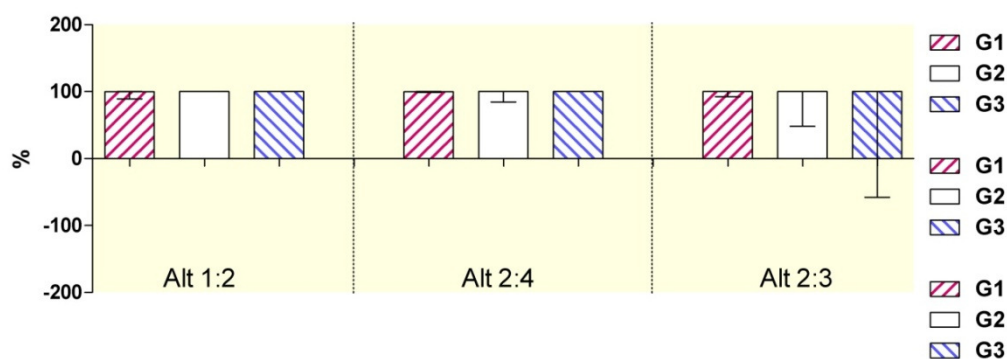


Figura 21 – Representação gráfica representativa das alterações dos percentuais de redução de MMP-8 entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

Os valores para o percentual de redução foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%), onde foi confirmada ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas coletas 1 e 2 (Red12), 2 e 3 (Red23) e entre 2 e 4 (Red24) para todos os grupos experimentais estudados ($p > 0,05$) (Tabelas 19 a 21).

Tabela 19 - Percentuais (mediana) obtidos na Red12 (entre 1ª e 2ª coleta) de MMP-8 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,6778 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G3	14,286	100%	A
G2	13,750	99,70%	A
G1	11,500	99,92%	A

Tabela 20 - Percentuais (mediana) obtidos na Red23 (entre 2ª e 3ª coleta) de MMP-8 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,0637 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G1	10,500	100%	A
G2	10,500	100%	A
G3	6,900	100%	A

Tabela 21 - Percentuais (mediana) obtidos na Red24 (entre 2ª e 4ª coleta) de MMP-8 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,1469 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G1	11,500	100%	A
G3	8,100	100%	A
G2	7,700	100%	A

5.2.3 MMP-9

Os valores médios (pg/mL) de MMP-9 obtidos em cada dente nas quatro coletas (C1 - após a abertura coronária; C2 - após o preparo biomecânico; C3 - após o uso do EDTA e C4 – após o uso da medicação intracanal) dos 3 grupos avaliados estão dispostos nas tabelas 22 a 24, juntamente com os percentuais de redução entre as coletas.

Tabela 22 - Valores médios (pg/mL) de MMP-9 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G1** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	0,00	0,00	0,00	0,00	*	*	*
2	321,12	0,00	14,64	0,00	100,00	*	*
3	230,40	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
4	0,00	1,96	0,00	0,00	*	100	100,00
5	280,92	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
6	1372,62	0,00	0,00	17,42	100,00	*	*
7	14,76	0,00	0,00	15,04	100,00	*	*
8	18,42	8,80	0,00	0,00	52,22	100	100,00
9	227,16	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
10	57,96	4,72	0,00	0,00	91,85	100	100,00
11	0,22	0,24	0,00	16,30	-9,091	100	-6691,6
Média ±	229	1,42	1,33	4,43			
Desvio- padrão	±	±	±	±			
	399	2,84	4,41	7,61			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G1: Irrigação com NaOCl 2,5% e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%

Tabela 23 - Valores médios (pg/mL) de MMP-9 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G2** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	0,00	10,50	0,00	3,90	*	100	62,85
2	0,00	0,00	0,00	0,00	*	*	*
3	44,92	46,24	0,00	0,00	-2,93	100	100,00
4	0,00	0,00	0,00	0,00	*	*	*
5	132,74	186,80	0,00	0,00	-40,72	100	100,00
6	13,60	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
7	0,00	0,00	0,00	0,00	*	*	*
8	392,94	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
9	18,44	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
10	1885,68	0,00	0,00	0,00	100,00	*	*
11	2377,22	0,00	3,24	0,00	100,00	*	*
Média ±	442	22,1	0,29	0,35			
Desvio-padrão	±	±	±	±			
	850	56,3	0,97	1,17			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G2: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de água de cal [Ca(OH)₂ 0,14%] e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%

Tabela 24 - Valores médios (pg/mL) de MMP-9 das 4 coletas dos canais radiculares do grupo G3** e os percentuais de redução entre as coletas (Red12, Red23 e Red24).

Dentes	C1	C2	C3	C4	Red12	Red23	Red24
1	3013,00	16,76	21,70	12,48	99,44	-29,47	25,54
2	3106,02	0,00	5,16	0,00	100,00	*	*
3	0,00	2,38	8,82	6,88	*	-270,58	-189,08
4	0,00	9,20	0,00	16,10	*	100,00	-75,00
5	109,68	0,88	0,00	56,08	99,19	100,00	-6272,73
6	3447,06	0,88	0,00	2,16	99,97	100,00	-145,45
7	2780,05	576,80	548,40	247,20	79,25	4,924	57,14
8	0,00	10,54	0,00	0,00	*	100,00	100,00
9	1461,72	901,40	0,00	0,00	38,33	100,00	100,00
10	4000,00	30,64	220,40	25,24	99,23	-619,32	17,62
11	0,00	0,00	0,00	0,00	*	*	*
Média ±	1629	140,9	73,1	33,3			
Desvio-padrão	±	±	±	±			
	1652	304,7	170,6	72,9			

* Não houve alteração no percentual de redução

**G3: Irrigação com NaOCl 2,5% seguido de Polimixina B e MIC com Ca(OH)₂+CLX 2%

Foi realizada inicialmente a estatística descritiva (mediana, valor mínimo, valor máximo e coeficiente de variação) dos valores de MMP-9 (pg/mL) em cada uma das quatro coletas para os três grupos experimentais (Tabela 25).

Tabela 25 – Estatística descritiva dos valores de MMP-9 (pg/mL) apresentados em cada coleta para os três grupos experimentais (coeficiente de variação, valores máximos, valores mínimos e mediana).

Variável (coletas)	Grupos	Coeficiente de variação	Mínimo	Mediana	Máximo
C1	G1	174,12	0,00	58	1373
C1	G2	192,23	0,00	18	2377
C1	G3	101,44	0,00	1462	4000
C2	G1	199,34	0,00	0,00	8,80
C2	G2	254,51	0,00	0,00	186,8
C2	G3	216,31	0,00	9,2	901,4
C3	G1	331,66	0,00	0,00	14,64
C3	G2	331,66	0,00	0,00	3,24
C3	G3	233,27	0,00	0,00	548,4
C4	G1	171,69	0,00	0,00	17,42
C4	G2	331,66	0,00	0,00	3,90
C4	G3	219,07	0,00	6,9	247,2

A Figura 22 demonstra as alterações dos percentuais de redução de MMP-9 entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

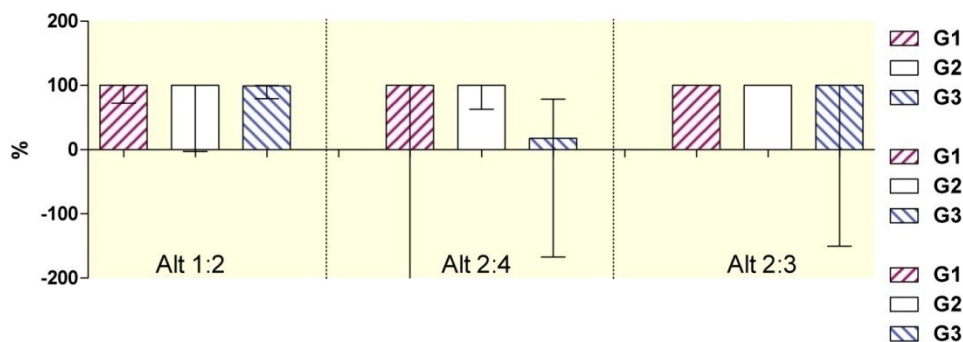


Figura 22 – Representação gráfica das alterações nos percentuais de redução de MMP-9 entre as coletas para os diferentes grupos avaliados.

Os valores para o percentual de redução foram submetidos ao teste estatístico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (5%), onde foi confirmada ausência de diferença estatisticamente significativa entre os grupos nas coletas 1 e 2 (Red12), 2 e 3 (Red23) e entre 2 e 4 (Red24) para todos os grupos experimentais estudados ($p > 0,05$) (Tabelas 26 a 28).

Tabela 26 - Percentuais (mediana) obtidos na Red12 (entre 1ª e 2ª coleta) de MMP-9 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,4103 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G1	13,22	100,00%	A
G2	13,07	100,00%	A
G3	9,35	99,23%	A

Tabela 27 - Percentuais (mediana) obtidos na Red23 (entre 2ª e 3ª coleta) de MMP-9 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,1503 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G1	10,50	100,0%	A
G2	10,50	100,0%	A
G3	6,94	100,0%	A

Tabela 28 - Percentuais (mediana) obtidos na Red24 (entre 2ª e 4ª coleta) de MMP-9 entre os grupos experimentais após o teste de Dunn (5%) e Kruskal-Wallis ($p\text{-valor} = 0,2057 > 0,05$) e formação de grupos homogêneos.

Grupos	Posto médio	Mediana	Grupos Homogêneos
G2	11,66	100,0%	A
G1	10,00	100,0%	A
G3	6,77	18,0%	A

5.3 Correlação entre Endotoxinas e MMPs

5.3.1 Correlação entre a quantidade de endotoxinas e MMPs presentes em cada coleta durante o tratamento endodôntico

No intuito de verificar possíveis correlações entre os valores de endotoxinas e MMPs aferidos em todas as coletas para os três grupos avaliados, foi também realizado o teste de Correlação Ordinal de Spearman (Graph Pad Prism – version 5.0, 2007). Entretanto, só foi verificada correlação para os achados no Grupo 1 e nas coletas 1 e 2, sendo esta correlação positiva exclusivamente para MMP-8 na coleta 1 e negativa para MMP-8 na coleta 2, como podem ser verificadas nas tabelas 29 e 30 a seguir.

Tabela 29 – Correlação entre a quantidade de endotoxina e MMP-8, verificadas para o Grupo G1 e coleta 1.

Parâmetro	C1_MMP3	C1_MMP8	C1_MMP9
n	11	11	11
(r) Spearman	-0,5114	0,6273	0,4465
Intervalo de Confiança (95%)	-0,8560 a 0,1479	0,02329 a 0,8958	-0,2292 a 0,8318
P-valor	0,1079	0,0388	0,1686
Significância (5%)	Não	Sim	Não

Tabela 30 – Correlação entre a quantidade de endotoxina e MMP-8, verificadas para o Grupo G1 e coleta 2.

Parâmetro	C2_MMP3	C2_MMP8	C2_MMP9
n	11	11	11
(r) Spearman	0,2110	-0,6529	-0,2106
Intervalo de Confiança (95%)	-0,4616 a 0,7296	-0,9041 a -0,06665	-0,7294 a 0,4620
P-valor	0,5334	0,0294	0,5343
Significância (5%)	Não	Sim	Não

Foi verificada correlação positiva entre endotoxinas e MMP-8 para a Coleta 1 (Grupo G1), sendo que esta relação foi direta (r – Spearman = 0,6273), ou seja, os valores diminuíram proporcionalmente (Tabela 30). Entretanto, a correlação encontrada para a Coleta 2 (Grupo G1) apresentou uma relação inversa (r -spearman = - 0,6529), onde o aumento do valor de um estava relacionado a diminuição do valor do outro (Tabela 30).

5.3.2 Correlação entre os valores de percentual de redução entre a quantidade de Endotoxinas e de MMPs entre as coletas

No intuito de verificar possíveis correlações entre a os valores de redução da quantidade de endotoxinas e MMPs aferidos em todas as coletas para os três grupos avaliados, foi também realizado o teste de Correlação Ordinal de Sperman (Graph Pad Prism – version 5.0, 2007). Entretanto, só foram verificadas correlações para os achados no Grupo G2, sendo negativa nas reduções da 1ª para a 2ª coletas (MMP-9) e positiva da 2ª para a 3ª coletas (MMP-3), como demonstrado nas Tabelas 31 e 32.

Tabela 31 – Correlação negativa entre o percentual de redução (1ª para 2ª coletas) de valores de endotoxinas e MMP-9, verificadas para o Grupo G2.

Parâmetro	Red12-M3	Red12-M8	Red12-M9
N	9	8	7
(r) Spearman	-0,2333	-0,1903	-0,8018
P-valor	0,5517	0,6646	0,0341
Significância (5%)	Não	Não	Sim

Tabela 32 – Correlação positiva entre o percentual de redução (2ª para 3ª coletas) de valores de endotoxinas e MMP-3, verificadas para o Grupo G2

Parâmetro	Red23-M3	Red23-M8	Red23-M9
N	8		
(r) Spearman	0,7381		
P-valor	0,0458		
Significância (5%)	Sim		

Foi verificada correlação negativa entre o percentual de redução da 1ª para a 2ª coletas, entre endotoxinas e MMP-9 (Grupo G2), sendo que esta relação foi inversa ($r\text{-spearman} = -0,08018$), onde o aumento do valor de um estava relacionado a diminuição do valor do outro (Tabela 31). A correlação entre o percentual de redução da 2ª para a 3ª coleta foi positiva entre endotoxinas e MMP-3 (Grupo G2), apresentando uma relação direta ($r\text{-spearman} = 0,7381$), onde o aumento do percentual foi proporcional (Tabela 32).

Para os demais casos não foram encontradas correlações estatísticas entre os valores encontrados de endotoxinas e MMPs.

6 DISCUSSÃO

6.1 Metodologia

No presente estudo foram avaliados os efeitos do uso associado de hipoclorito de sódio 2,5% com água de cal (hidróxido de cálcio 0,14%) ou polimixina B, como agentes irrigantes, durante o preparo biomecânico dos canais radiculares com polpa necrosada e lesões periapicais, pois em trabalhos anteriores *in vitro* e *in vivo* de nosso grupo de estudo (Oliveira et al., 2007; Oliveira et al., 2009), a água de cal e a polimixina B promoveram importante ação na neutralização de endotoxinas quando utilizados como irrigantes. Em 2009, Oliveira et al. verificaram *in vivo* que a utilização associada de clorexidina gel 2% e água de cal, bem como o uso da clorexidina gel 2% e polimixina B promoveram significativa redução de endotoxinas, quando utilizados durante o preparo biomecânico. Assim, sabendo que a clorexidina e o hipoclorito de sódio são largamente empregados na endodontia devido às propriedades como amplo espectro de ação antimicrobiana, substantividade (clorexidina), capacidade de dissolver tecidos (hipoclorito de sódio), dentre outras (Jeansonne & White, 1994; Ferraz et al., 2001; Sena et al., 2006; Mohammadi, 2008), mas que ambos apresentam pouca ação sobre LPS (Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2007; Vianna et al., 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes et al., 2009), no presente estudo foi selecionado o hipoclorito de sódio 2,5% para o início do preparo biomecânico e água de cal ou polimixina B para o preparo com os dois últimos instrumentos, a fim de tentar aumentar a neutralização de endotoxinas durante o preparo dos canais radiculares.

Neste estudo foi selecionado o hipoclorito de sódio, pois é o protocolo padrão da disciplina de Endodontia de nossa faculdade e por ser muito utilizado como irrigante, devido a sua baixa tensão superficial, capacidade de dissolver matéria orgânica e ações desodorizante,

alvejante, lubrificante e antimicrobiana (Jeansonne & White, 1994; Menezes et al. 2004, Mohammadi, 2008).

Para quantificação de endotoxinas presentes nos canais radiculares foi utilizado o teste cinético cromogênico do lisado de amebócitos de *Limulus* (LAL), que é muito usado em diversos estudos (Oliveira et al., 2009; Valera et al., 2010; Martinho et al., 2011; Maekawa et al., 2011). O *Limulus* é constituído por um lisado dos amebócitos circulantes de caranguejo ferradura (*Limulus polyphemus*) que, quando exposto a quantidade pequena de endotoxinas, aumenta sua opacidade bem como sua viscosidade, tornando-se um gel duro (Levin & Bang, 1968; Oliveira et al., 2005 e 2007). Em estudos anteriores (Oliveira et al., 2005 e 2007; Cardoso et al., 2008), a detecção de endotoxinas nos canais radiculares foi realizada apenas pelo método de geleificação do lisado de *Limulus*, que é um método semi-quantitativo e menos preciso. Pelo método cinético cromogênico do LAL, a endotoxina presente na amostra catalisa a ativação de uma pré-enzima em enzima. A enzima ativada catalisa a clivagem do substrato sintético Ac-Ile-Glu-Ala-Arg-pNa em peptídeo (Ac-Ile-Glu-Ala-Arg) e p-nitroanilina (pNa), de coloração amarela (Brito, 2010). A pNa transformada durante a reação é medida fotometricamente a 405 nm, continuamente, durante o período de incubação (37°C). A concentração de endotoxina da amostra é calculada a partir de seu tempo de reação por comparação ao tempo da curva-padrão de endotoxina, sendo um importante método quantitativo. Em 2011, Martinho et al. verificaram que, dentre os métodos quantitativos (cinético cromogênico, cinético turbidimétrico e *endpoint* cromogênico), os melhores para análises de endotoxinas das infecções endodônticas primárias foram o cinético cromogênico e o cinético turbidimétrico, por serem mais precisos e permitirem melhor reprodutibilidade em comparação com o método *endpoint*.

O método cinético cromogênico utilizado na presente pesquisa é muito sensível e apresenta capacidade para detectar a partir de 0,005

unidades de endotoxinas, com grande precisão na determinação do conteúdo de endotoxina em canais radiculares. No entanto, apesar deste método ser muito confiável no monitoramento de endotoxina, de acordo com o fabricante (Lonza) muitas substâncias ou alterações bruscas no pH podem causar alterações no teste e interferir nos resultados (Brito, 2010). Para verificar possíveis interferentes da reação nas amostras coletadas dos canais radiculares, de acordo com a recomendação do fabricante, todos os testes foram realizados em quadruplicata para cada amostra, sendo que uma duplicata foi contaminada com uma concentração conhecida de endotoxina padrão de *E. coli* e usada como controle positivo da amostra (PPC). O resultado deste controle positivo indicava se a amostra possuía ou não interferentes e, no presente estudo, todas as amostras apresentaram valores de PPC dentro do intervalo estabelecido pelo fabricante, indicando ausência de interferentes da reação nas amostras analisadas.

Com relação às metaloproteinases da matriz (MMPs), de acordo com a literatura, pode-se observar que inúmeros autores têm verificado a participação de diferentes MMPs (MMP-1, -2, -3, -8, -9, -13) nas alterações inflamatórias da polpa e tecidos periapicais, incluindo reabsorção óssea (Wahlgren et al., 2001 e 2002; Shin et al., 2002; Leonardi et al., 2005; Belmar et al., 2008; Corroti et al., 2009; Buzoglu et al., 2009; Itoh et al., 2009; Sato et al., 2009; Paula-Silva et al., 2009; Carneiro et al., 2009; Kawase et al., 2010). Como existem pelo menos 23 tipos de MMPs divididas em diversos subgrupos, na presente pesquisa foi selecionada uma MMP dos três principais subgrupos, sendo uma do grupo da collagenase (MMP-8), que atua no colágeno fibrilar, uma do grupo da gelatinase (MMP-9), que degrada especialmente o colágeno tipo IV (principal componente estrutural da membrana basal) e a fibronectina e uma do grupo da estromelisina (MMP-3), que degrada diferentes componentes da MEC, como proteoglicanas, laminina, fibronectina e colágenos amorfos. Assim, com a seleção destas diferentes MMPs

provavelmente seria possível traçar uma melhor relação entre o envolvimento de diferentes subgrupos de MMPs com as alterações periapicais em dentes com necrose pulpar, bem como monitorar sua redução durante o tratamento endodôntico.

6.2 Dos Resultados

6.2.1 Endotoxinas

Com relação aos resultados da quantificação de endotoxinas, foi verificada presença de endotoxinas em todos os canais radiculares com polpa necrosada, concordando com vários estudos da literatura (Schein & Schilder, 1975; Dhalén & Bergenholtz, 1980; Jacinto et al., 2005; Vianna et al., 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes et al., 2009; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011). A concentração de endotoxina obtida na coleta inicial variou de 7,93 EU/mL até 50.000 EU/mL, sendo os valores médios: G1) 5148 EU/mL; G2) 1551 EU/mL e G3) 1163 EU/mL. Estes resultados concordam parcialmente com os estudos de Vianna et al. (2007) e Martinho & Gomes (2008), pois nestes estudos a concentração de endotoxina variou entre 10 e 200 EU/mL com média de 151,61 EU/mL (Vianna et al., 2007) e 17 a 696 EU/mL com média de 228 EU/mL (Martinho & Gomes, 2008). No atual estudo, em vários pacientes foram observados valores semelhantes a estes, mas, por outro lado, também foram observados em alguns pacientes valores bem mais altos, concordando em parte com o estudo de Jacinto et al. (2005), que verificaram concentração de endotoxina de 2.390 a 22.100 EU/mL em canais radiculares com polpa necrosada. Assim, esta variação dos resultados pode ser atribuída à sensibilidade do teste que detecta variação mínima de endotoxinas, a forma de coletar o conteúdo dos canais radiculares, ao tempo da coleta, à diversidade de anatomia dos canais radiculares, entre outras.

Os testes de quantificação de endotoxinas das amostras coletadas dos canais radiculares foram realizados no mesmo dia das coletas clínicas. Assim, como cada frasco do reagente LAL é suficiente para 24 testes (6 amostras em quadruplicata), em cada dia de coleta clínica era realizada uma curva-padrão de endotoxinas e o teste das amostras. No presente estudo, as amostras dos canais radiculares foram coletadas da seguinte forma: os canais foram inundados com solução fisiológica estéril e apirogênica, a qual foi agitada por 1 minuto com uma lima estéril e apirogênica e, em seguida, foi aspirada com auxílio de seringa e agulha, sendo este procedimento repetido até completar o volume final da amostra de 100 μL . Esta amostra foi transferida para microtubo contendo 900 μL de água apirogênica, representando a diluição 10^{-1} . Esta técnica de coletar as amostras dos canais radiculares foi estabelecida com base em estudos anteriores *in vitro* (Oliveira et al., 2009; Brito, 2010; Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011), os quais demonstraram que a remoção do conteúdo dos canais radiculares com seringa e agulha até o volume de 100 μL permitiu maior precisão na quantificação de endotoxinas. Estudos que avaliaram também o conteúdo microbiológico das amostras utilizaram cones de papel para coleta do conteúdo do canal radicular (Vianna et al., 2007; Martinho & Gomes, 2008; Gomes et al., 2009; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011). No entanto, com relação a endotoxinas, não se sabe se a utilização do cone de papel pode interferir nos resultados, se a endotoxina se adere e se desprende facilmente do cone, de modo que o cone de papel pode ser uma barreira a mais para quantificação de endotoxinas. E ainda, não se sabe ao certo o volume coletado pelo cone. Com isso, seria interessante estudar se as variadas formas de coletar o conteúdo dos canais radiculares pode interferir nos resultados relacionados a quantidade de endotoxinas.

Após o preparo biomecânico, pode-se verificar significativa redução de endotoxinas em relação à coleta inicial independentemente do

agente irrigante utilizado. Estes resultados concordam com os estudos de Vianna et al., (2007), Martinho & Gomes (2008) e Gomes et al. (2009), que relataram que o preparo químico-mecânico promove redução de endotoxinas nos canais radiculares. Com isso, grande parte da redução da quantidade de endotoxinas provavelmente ocorreu devido à instrumentação, irrigação e aspiração do conteúdo do canal, independente da substância auxiliar utilizada.

Na presente pesquisa, quando foi utilizado apenas NaOCl 2,5% como agente irrigante houve uma redução de endotoxinas de 49,4% entre a 1ª e 2ª coleta, concordando com os estudos de Martinho & Gomes (2008) e Gomes et al. (2009) que verificaram, respectivamente, redução de 59,99% e 57,98%, quando os canais radiculares foram instrumentados com NaOCl 2,5%. Já no estudo de Vianna et al. (2007), com a utilização de clorexidina gel 2% a redução de endotoxinas foi de 44,4%.

Por outro lado, no atual estudo quando a instrumentação dos canais radiculares com NaOCl 2,5% foi associada com polimixina B ou água de cal [Ca(OH)_2 0,14%], a redução de endotoxinas foi bem maior, sendo de 97% para o grupo G3 (NaOCl + polimixina B) e 84,2% para o grupo G2 (NaOCl + água de cal), demonstrando claramente que a utilização de polimixina B ou água de cal nos dois últimos instrumentos do preparo biomecânico somou ao agente irrigante uma maior capacidade de neutralização de endotoxinas. Sabendo que as endotoxinas apresentam importante participação nas alterações periapicais, incluindo reabsorção óssea (Dwyer & Torabinejad, 1981; Yamasaki et al., 1992; Murakami et al., 2001; Hong et al., 2004; Hu et al., 2004; Silva et al., 2004; Jiang et al., 2006; Islam et al., 2007; Mohammadi, 2011), a utilização de polimixina B ou água de cal no final da instrumentação dos canais é válida e pode trazer benefícios à terapia endodôntica, neutralizando maior quantidade de endotoxinas após a morte das bactérias Gram-negativas.

As propriedades tanto do hidróxido de cálcio como da polimixina B em detoxificar endotoxinas já estão bem estabelecidas. Com

relação ao hidróxido de cálcio, o clássico estudo de Safavi & Nichols (1993) demonstrou que quando LPS é tratado com hidróxido de cálcio ocorre hidrólise da porção lipídica da endotoxina, liberando grande quantidade de ácidos graxos livres, o que provoca alterações nas propriedades biológicas do LPS. A partir deste estudo, diversos autores (Safavi & Nichols, 1994; Buck et al., 2001; Barthel et al., 1997; Wang et al., 2001, Jiang et al., 2003; Oliveira et al., 2005, 2007, 2009; Silva et al., 2008; Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011) têm demonstrado os efeitos benéficos da neutralização de endotoxinas pelo hidróxido de cálcio. No entanto, os estudos geralmente demonstram a ação do hidróxido de cálcio como medicação de demora e não como agente irrigante (Nelson-Filho et al., 2002; Silva et al., 2002; Tanomaru et al., 2003; Oliveira et al., 2005; Silva et al., 2008; Mohammadi, 2011; Maekawa et al., 2011). Em estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa, Oliveira et al. (2007) demonstraram *in vitro* importante neutralização de endotoxinas quando a água de cal foi utilizada durante todo o preparo dos canais radiculares. Este estudo serviu de base para a utilização clínica da água de cal em associação à clorexidina gel 2% na pesquisa *in vivo* de Oliveira et al. (2009), de modo que esta associação promoveu redução superior a 99% de endotoxinas. Assim, de acordo com os resultados da presente pesquisa e de estudos anteriores, a utilização de água de cal no final da instrumentação dos canais radiculares soma aos irrigantes mais comumente utilizados (hipoclorito de sódio e clorexidina) a capacidade de neutralizar endotoxinas.

Com relação à polimixina B, diversos estudos na literatura têm demonstrado sua eficácia no tratamento de choque endotóxico, tanto em animais como na área médica (Rifkind & Palmer, 1966; Rifkind, 1967; Parviainen et al., 2001; Giacometti et al., 2002; Barton et al., 2004; Bhor et al., 2005). Por ser um antibiótico polipeptídico catiônico, de acordo com Rifkind & Palmer (1966), Rifkind (1967) e Morrison & Jacobs (1976), que postularam seu mecanismo de ação, a polimixina B liga-se de forma

covalente à carga eletronegativa do lipídio A da molécula de endotoxina e altera sua conformação tridimensional, o que, provavelmente, bloqueia seus efeitos tóxicos. Em 2004, Hong et al. demonstraram que a administração sistêmica de polimixina B reduziu em 76% a 80% a extensão da reabsorção óssea associada à lesão periapical em ratos. Guo et al. (2007) relataram que a polimixina B neutralizou LPS ao inibir a expressão e liberação de citocinas em cultura de macrófagos. Mohammadi (2011) relata em sua revisão da literatura o importante papel da polimixina B como potente inibidor de endotoxinas. Em estudos anteriores de nosso grupo de pesquisa, Oliveira et al., 2005 e 2007, demonstraram *in vitro* que quando a polimixina B foi usada como medicação intracanal ou irrigante do canal radicular, ela inibiu a capacidade de LPS de induzir ativação policlonal de linfócitos B. Em 2009, Oliveira et al. utilizaram *in vivo* clorexidina gel 2% associado com polimixina B na instrumentação de canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical e verificaram redução de mais de 96% na quantidade de endotoxinas entre a 1ª e 2ª coleta. Desta forma, de acordo com os resultados do atual estudo e de estudos anteriores, a utilização de polimixina B, assim como a água de cal, no final da instrumentação dos canais radiculares também acrescenta aos irrigantes a capacidade de neutralizar endotoxinas, sendo que estes resultados podem contribuir para melhorar a terapia endodôntica.

Em um recente estudo de Martinho et al. (2010), utilizando NaOCl 2,5% + EDTA 17% e instrumentação rotatória com limas de níquel-titânio no preparo químico-mecânico dos canais radiculares, os autores verificaram redução de 98,06% na quantidade de endotoxinas entre a 1ª e 2ª coleta, demonstrando que esta técnica proporcionou maior eliminação de endotoxinas dos canais. Os autores discutiram que, em estudos prévios (Martinho & Gomes et al., 2008; Gomes et al., 2009), utilizando a instrumentação convencional com NaOCl 2,5%, a redução de endotoxinas foi de aproximadamente 59% e que nenhum estudo clínico tinha avaliado

a eficiência de instrumentos rotatórios NiTi na eliminação de endotoxinas de canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical. E ainda, que esta diferença de porcentagem de redução pode ser atribuída ao desempenho mecânico dos instrumentos (limas tipo Kerr X Mtwo Rotary NiTi files), pois quando os canais radiculares foram irrigados com solução inerte e instrumentação rotatória com limas NiTi a redução de endotoxinas foi de 96,27%. Baseado neste estudo, pode-se verificar que a evolução das técnicas de preparo, além dos agentes químicos, é muito importante para melhorar a desinfecção dos canais radiculares e promover mais sucesso no tratamento. Na atual pesquisa, foi utilizada a instrumentação oscilatória com 4 limas do sistema EndoEze para o preparo dos terços cervical e médio e 4 limas manuais tipo Kerr para o preparo do terço apical. Assim, sabendo da crescente utilização pelos endodontistas tanto do sistema oscilatório quanto do rotatório, as pesquisas utilizando novos métodos mecânicos de instrumentação dos canais devem ser ampliadas em associação com as substâncias químicas, como demonstrado na presente pesquisa, pois como o preparo é químico-mecânico, a evolução das técnicas certamente trará mais benefícios ao tratamento endodôntico.

Já com relação à medicação intracanal, a utilização da pasta de clorexidina gel 2% e hidróxido de cálcio promoveu significativa redução de endotoxinas entre a 2ª e 4ª coleta, que variou de 36,6% para o grupo G3, 55,1% para o grupo G2 e 84,7% para o grupo G1, não havendo diferença significativa entre os grupos. Estas alterações nos percentuais de redução dos grupos são coerentes com os resultados da coleta após instrumentação, ou seja, no grupo G1 em que foi utilizado NaOCl 2,5% sozinho na instrumentação, os valores de redução entre a 1ª e 2ª coleta foi de apenas 49%, de modo que a média de endotoxinas na 2ª coleta foi de 1173 EU/mL, assim, a ação da MIC promoveu uma porcentagem maior de redução (84,7%), com valor médio de endotoxinas de 95,6 EU/mL na 4ª coleta. Estes resultados discordam do estudo de Vianna et al. (2007), que demonstraram que a utilização *in vivo* de medicação intracanal (pasta

de hidróxido de cálcio; clorexidina gel ou pasta de clorexidina gel + hidróxido de cálcio) por 7 dias promoveu apenas uma redução média de 1,4% nos níveis de endotoxinas dos canais radiculares. No presente estudo, a medicação intracanal permaneceu nos canais radiculares por 14 dias, o que pode ter promovido uma maior ação da medicação em profundidade nos túbulos dentinários. Os resultados apresentados na atual pesquisa demonstraram que a utilização da MIC promoveu redução de endotoxinas de 36,6% a 84,7%, e, numericamente, 11 canais radiculares apresentaram valores menores de 10 EU/mL após MIC. Estes resultados concordam com estudo de Valera et al. (2010) e Maekawa et al (2011), que verificaram que a utilização da pasta de clorexidina gel 2% com hidróxido de cálcio por 14 dias promoveu significativa neutralização de endotoxinas nos canais radiculares. Com isso, a associação do hidróxido de cálcio com clorexidina gel não alterou as propriedades do hidróxido de cálcio de neutralizar endotoxinas, concordando também com estudo de Signoretti et al. (2011) que, ao avaliar a influência da clorexidina gel 2% na dissociação iônica do hidróxido de cálcio e sua habilidade de reduzir endotoxinas, concluíram que a clorexidina gel não interferiu nas propriedades químicas do hidróxido de cálcio e até melhorou *in vitro* suas propriedades de reduzir o conteúdo de endotoxinas em canais radiculares. Desta forma, esta associação somou a clorexidina a capacidade de neutralizar endotoxinas, confirmando ainda mais sua importante utilização como medicação de demora.

Contudo, assim como a microbiota dos canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical vem sendo constantemente definida, de acordo com a evolução dos métodos de identificação microbiana, as pesquisas visando substâncias químicas e técnicas mecânicas que possibilitem maior remoção de microrganismos e neutralização de produtos tóxicos durante a instrumentação dos canais radiculares devem ser constantemente ampliadas. Neste sentido, a presente pesquisa apresentou importantes resultados com a utilização associada de água de

cal ou polimixina B com NaOCl 2,5% na instrumentação oscilatória e manual dos canais radiculares.

6.2.2 MMP-3, MMP-8 e MMP-9

Com relação aos resultados da quantificação de MMPs, foi verificada que a MMP-3 (estromelisina) apresentou baixos valores em todas as coletas, independente do grupo avaliado. Na coleta inicial, os valores médios dos grupos variaram de 2,91 a 18,4 pg/mL e, na coleta final, os valores médios variaram de 3,15 a 4,42 pg/mL. Com isso, pode-se observar que para monitoramento da resposta do tratamento endodôntico, os resultados da MMP-3 não foram tão significativos, uma vez que não houve relação importante entre coleta inicial e final. Na literatura, são poucos os estudos que avaliam a expressão e atividade de MMP-3 nos tecidos pulpare e periapicais, tornando difícil a discussão destes resultados. A MMP-3 é uma estromelisina, a qual degrada diferentes componentes da MEC, como proteoglicanas, laminina, fibronectina e colágenos amorfos. No estudo de Gusman et al. (2002), os níveis de MMP-2 e MMP-3 foram significativamente mais baixos em polpas sintomáticas que em polpas saudáveis e os níveis de MMP-9 foram mais altos em polpas inflamadas e sintomáticas. Por outro lado, Shin et al. (2002) verificaram que MMP-3 foi significativamente maior nas pulpites agudas que nas crônicas. Em casos de lesões periapicais, não foi observado estudo que avaliasse os níveis de MMP-3 e como no presente estudo nenhum paciente relatou sintomatologia no momento do tratamento não foi possível traçar uma correlação entre dentes sintomáticos e MMP-3.

Resultados diferentes também foram observados quando linhagens celulares foram estimuladas com LPS de diferentes microrganismos. Em 2007, Bodet et al. verificaram que LPS de *A.*

actinomyces comitans induziu em fibroblastos a produção de MMP-2, do ativador de plasminogênio e, em menor quantidade, de MMP-3. Já em 2009, Vilela verificou em macrófagos humanos que LPS de *E. coli* em variadas concentrações induziu significativo aumento de MMP-3 e significativa redução da produção de MMP-8. Com isso, é possível observar que a expressão e atividade de MMP-3 nas alterações pulpares e periapicais carece de muitos estudos, pois as poucas pesquisas apresentadas na literatura apresentam resultados divergentes.

As diferenças encontradas nestes poucos estudos que avaliaram MMP-3 pode ser devido ao complexo mecanismo envolvido na produção e liberação de diferentes MMPs, sendo que a expressão de MMP pode ser influenciada por inúmeros fatores, podendo ocorrer por uma via dependente ou independente de PGE₂ (via COX-2) (Wahl & Corcoran, 1993; Zhang et al., 1998). Dentre os fatores que interferem na produção de MMP, tem-se fatores de crescimento, hormônios, balanço entre os inibidores teciduais (TIMPs), citocinas e mediadores químicos (Birkedal-Hansen, 1993; Reynolds et al., 1994; Reynolds & Meikle, 1997; Palosaari et al., 1998; Wahlgren et al., 2001; Hong et al., 2004; Sorsa et al., 2004; Buzoglu et al., 2009; Lu et al., 2010), contudo, estes fatores podem interferir positiva ou negativamente na produção de MMP. Por exemplo, em 1997, Takahashi et al. verificaram em fibroblastos produção aumentada de MMP-1 quando utilizado inibidores da cicloxigenase (COX), porém, houve supressão de MMP-1 quando foi utilizado PGE₂ exógena. Já Lin et al. (2002) verificaram redução da expressão de MMP-1 com a utilização de inibidores de COX-2, demonstrando divergência na relação entre MMP/PGE₂ via COX-2. O envolvimento de citocinas e fatores de crescimento também demonstraram diferentes influências na expressão de MMPs. Em 1994, Reynolds et al. relataram, por exemplo, que IL-6, TNF- α , TNF- β e TGF- β induziram a produção de MMP-2 (gelatinase A) de uma maneira dose e tempo dependente, enquanto IL-1 α , IL-1 β e IFN- γ não induziram sua produção. Chang et al. (2002)

revelaram que TGF- β 1 inibiu produção de MMP-2, mas não afetou a produção de MMP-9, já Palosaari et al. (2003) relataram que TGF- β 1 teve significativo efeito positivo na regulação de MMP-9. Em 2006, Grenier & Grignon discutiram em seu estudo que citocinas como IL-1 β e TNF- α induziram aumento de MMP-9 em monócitos por uma via independente de PGE₂. Em um estudo prévio, ainda não publicado, de nosso grupo de pesquisa (Vilela et al.), pôde-se verificar que o uso de anticorpos anti-IL-1 α e anti-IL-1 β , em cultura de macrófagos estimulada por LPS, induziu menor produção de MMP-8 e MMP-9 e aumento da produção de MMP-3. Já o uso de anticorpo anti-TNF- α e de inibidor de COX-2 promoveu aumento da produção de MMP-3, MMP-8 e MMP-9. Por outro lado, Hojo et al. (2000) verificaram que utilização de anticorpos anti-IL-1 α , anti-IL-1 β e anti-TNF- α inibiu a produção de MMP-1. Com isso, pode-se verificar que cada MMP pode ser influenciada de maneira diferente por uma mesma citocina.

No presente estudo, ao contrário da MMP-3, as coletas iniciais de dentes com necrose pulpar e periodontite apical apresentaram níveis altos de MMP-8 (colagenase) e MMP-9 (gelatinase), na maioria dos casos, demonstrando relação destas MMP com o processo inflamatório periapical. Os valores médios de MMP-8 dos grupos na coleta inicial variaram de 1254 a 1463 pg/mL e de MMP-9 variaram de 229 a 1629 pg/mL. Estes resultados concordam, em parte, com o estudo de Gusman et al. (2002), que, embora tenha avaliado inflamação pulpar, verificaram níveis baixos de MMP-3 em polpas sintomáticas e níveis altos de MMP-9 em polpas inflamadas sintomáticas.

Os resultados da atual pesquisa concordam com outros trabalhos da literatura, como de Wahlgren et al. (2002), que demonstraram *in vivo* a presença de MMP-8 no tecido pulpar e periapical inflamado, indicando que a MMP-8 atua nas inflamações pulpar e periapical, participando da degradação da matriz extracelular tecidual.

Sabendo-se que a MMP-8 é uma collagenase que apresenta papel crítico na quebra de colágeno fibrilar (importante constituinte do periodonto) e que os fragmentos pequenos de colágeno, bem como gelatinas, laminina, elastina, fibronectina e colágeno tipo IV (componente estrutural da membrana basal) são degradados especialmente por gelatinases como MMP-9 (Wahlgren et al., 2001; Hannas et al., 2007; Sulkala et al., 2007; Paula-Silva, 2010), a presença destas MMPs nos casos de necrose pulpar e lesão periapical exerce um papel crítico na patogênese das lesões periapicais, provavelmente envolvendo a degradação da MEC durante o desenvolvimento da lesão, como demonstrado por Corroti et al. (2009).

Outros autores também verificaram níveis aumentados de MMP-8 e MMP-9 nas alterações periapicais. Belmar et al. (2008) verificaram que os níveis de MMP-9 e -2 são aumentados no fluido crevicular gengival de dentes com lesões periapicais. Carneiro et al. (2009) sugeriram a participação de várias células inflamatórias (neutrófilos, macrófagos e linfócitos) na expressão de MMP-9 nas lesões periapicais e que MMP-9 pode ter envolvimento ativo na degradação da matriz extracelular nestas lesões. Itoh et al. (2009) relataram que a causa das lesões perirradiculares está relacionada com a destruição da matriz extracelular por MMP-1 (colagenase), MMP-2 e MMP-9 (gelatinases), as quais são produzidas e secretadas por macrófagos e neutrófilos que migram para os sítios da inflamação. Matsui et al. (2011) verificaram, em lesões periapicais de ratos, que a MMP-8 esteve mais presente durante a progressão da destruição tecidual periapical, incluindo reabsorção óssea. Shin et al. (2011) demonstraram que a inflamação perirradicular de origem endodôntica elevou os níveis de MMP-8 e substância P no fluido crevicular gengival. Assim, de acordo com o envolvimento destas MMPs no desenvolvimento das lesões periapicais, seu monitoramento pode

trazer informações importantes sobre o prognóstico do tratamento endodôntico.

No atual estudo, os níveis de MMP-8 e MMP-9 foram altos na coleta inicial e foram significativamente reduzidos ao longo do tratamento, independente dos agentes irrigantes utilizados, sendo o percentual de redução da MMP-8 da 1ª para 2ª coleta de 100% para grupo G3 (NaOCl + polimixina B), 99,7% para G2 (NaOCl + água de cal) e 99,92% para G1 (NaOCl) e de MMP-9 foi de 100% para os grupos G1 e G2 e de 99,23% para G3. Pôde-se observar em vários casos níveis zero de detecção de MMP-8 e MMP-9 após instrumentação dos canais radiculares. Após o uso de EDTA (3ª coleta) e da medicação intracanal (clorexidina + hidróxido de cálcio – 4ª coleta), houve ausência de MMP-8 em 21 casos e de MMP-9 em 22 casos, sendo o percentual mediano de redução de 100% em todos os grupos. Com isso, os resultados da presente pesquisa demonstraram possível relação entre a presença de MMP-8 e MMP-9 e evolução do tratamento endodôntico, de modo que análises destas MMPs do canal radicular ou do exsudato periapical, como citado por Wahlgren et al. (2002), poderiam ser utilizadas para indicar e monitorar atividade inflamatória e o sucesso do tratamento em dentes com necrose pulpar e lesões periapicais. Em seu estudo, Wahlgren et al. (2002) avaliaram alterações nos níveis de MMP-8 nos exsudatos de canais radiculares durante o tratamento endodôntico utilizando NaOCl 2,5% como irrigante, EDTA e pasta de Ca(OH)_2 como medicação intracanal por 14 dias, sendo realizadas 2 trocas da MIC. Os autores verificaram que os níveis de MMP-8 foram marcadamente diminuídos durante o tratamento endodôntico.

Os resultados do atual estudo também concordaram com estudo de Paula-Silva et al. (2010), que, nesta mesma linha de pesquisa, porém em cães, avaliaram o envolvimento de MMP-1, -2, -8 e -9 durante e após o tratamento de canais radiculares de dentes com periodontites apicais. Os autores verificaram altas porcentagens de expressão de MMP-

1, -2, -8 e -9 em dentes que não receberam tratamento endodôntico, no entanto, o tratamento dos canais radiculares com hidróxido de cálcio como MIC por 14 dias promoveu menor porcentagem de contaminação bacteriana, menor expressão de MMPs e MEC mais organizada, em comparação com dentes tratados em sessão única. Estes autores discutiram que ocorre redução da síntese de MMP em ambiente rico em cálcio, de modo que o hidróxido de cálcio pode atuar como inibidor da atividade de MMP *in vivo*. Em 2002, Wahlgren et al. já haviam especulado que Ca(OH)_2 devido ao seu alto pH inicial poderia inativar MMPs, que são proteases neutras.

Os resultados da presente pesquisa também concordaram parcialmente com Shin et al. (2011), que, embora avaliaram o fluido crevicular gengival durante tratamento endodôntico de dentes não-vitais sintomáticos, verificaram que os níveis de MMP-8 e substância P foram diminuídos durante o tratamento endodôntico utilizando NaOCl 3% como agente irrigante.

No presente estudo, foi utilizada como medicação de demora a pasta de clorexidina gel 2% + hidróxido de cálcio, a qual mostrou-se efetiva em proporcionar baixos valores de MMP-8 e MMP-9, como comentado acima. Os efeitos da clorexidina como inibidor da atividade de MMP-2, -8 e -9 já foram claramente demonstrados no estudo de Gendron et al. (1999), onde os autores sugeriram que a inibição direta das atividades das MMPs pela clorexidina pode representar um efeito valioso deste agente antimicrobiano e explicar, pelo menos em parte, os efeitos benéficos da clorexidina no tratamento de periodontites. Mais especificamente na Endodontia, além dos efeitos benéficos da clorexidina e do hidróxido de cálcio em inibir a atividade de MMP no desenvolvimento das lesões periapicais, a inibição de MMP na matriz de dentina também pode contribuir para o melhor selamento das obturações com cimentos resinosos.

Outro ponto a ser salientado, é a atividade do EDTA (quelante de íons metálicos) como inibidor de MMPs, uma vez que estas enzimas requerem íons metálicos, especialmente cálcio e zinco, para sua atividade catalítica (Johnson & Knox, 1999; Shimokawa et al., 2002). No presente estudo, muitos casos apresentam valores zero de MMP-8 e MMP-9 após a 3ª coleta. Contudo, o tratamento endodôntico utiliza em momentos diferentes, diversas substâncias químicas (clorexidina, hidróxido de cálcio e EDTA) com atividade inibitória sobre MMPs, o que certamente contribui para o sucesso do tratamento.

6.2.3 Correlação entre endotoxinas e MMPs em canais radiculares

Apesar de Hong et al (2004) ter sugerido relação entre LPS, citocinas (IL-1 α e TNF- α) e produção de MMP-1 e outros estudos ter demonstrado o envolvimento de LPS e MMP (Melamed et al., 2006; Yang et al., 2006; Bodet et al., 2007; Katono et al., 2009; Vilela, 2009), no presente estudo, não foi possível traçar, de forma estatística, uma relação direta entre a presença de LPS nos canais radiculares e MMPs. Apenas para MMP-8 no grupo G1 foi possível traçar uma correlação positiva na 1ª coleta entre LPS e MMP-8, entretanto, no mesmo grupo na 2ª coleta, houve uma correlação negativa. Outra correlação positiva foi com relação a MMP-3 no grupo G2 e o percentual de redução de endotoxinas da 2ª para 3ª coleta. Já com relação a MMP-9, a única correlação apresentada foi negativa entre a porcentual de redução de endotoxinas da 1ª para 2ª coleta no grupo G2.

Estes estudos que mostraram relação direta de LPS e MMPs foram realizados em culturas celulares, com ativação de apenas um tipo celular pelo LPS. Em 2006, Melamed et al. verificaram que LPS estimularam a secreção de MMP-9 em células B. Yang et al. (2006) demonstraram que o tratamento de LPS de *P. nigrescens* com Ca(OH)₂

inibiu a produção de MMP e aumentou o TIMP em cultura de osteoblastos. Bodet et al. (2007) demonstraram que LPS de *A. actinomycetemcomitans* pode estimular a expressão de MMP-2, MMP-3 e TIMP-1 em fibroblastos gengivais. Katono et al. (2009) verificaram que LPS promoveu aumento da produção de MMPs e de ativadores de plasminogênio e diminuição da produção de TIMPs em osteoblastos. Vilela (2009) verificou que LPS de *E. coli* induziu aumento de MMP-3 e diminuição de MMP-8 em macrófagos humanos.

Durante o desenvolvimento da lesão periapical, muitas células diferentes (macrófagos, linfócitos, fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, células epiteliais, entre outras) participam do processo inflamatório, e sabendo que a expressão e liberação de MMPs é um processo bastante complexo, como discutido anteriormente, é possível que estas células secretem diferentes citocinas e TIMPs, que ora regulam para cima a produção de MMPs e ora regulam para baixo, impossibilitando traçar uma relação estatística direta apenas entre LPS e produção de MMPs. E ainda, outros produtos microbianos liberados na infecção endodôntica, como ácido lipoteicóico, por exemplo, também podem estimular a produção de MMPs. No presente estudo, pode-se observar redução de endotoxinas e de MMP-8 e MMP-9 ao longo do tratamento endodôntico, entretanto, como estas reduções não seguiram uma mesma proporção, não foi possível, estatisticamente, traçar uma relação direta entre elas.

Como em 2002, Shin et al. (2002), ao avaliar os níveis de MMP-1, -2 e -3 no tecido pulpar inflamado e nas lesões periapicais, sugeriram que a presença de MMP parece estar positivamente relacionada com sintomatologia do paciente e como diversos estudos também demonstraram relação positiva entre altos níveis de LPS nos canais radiculares e sintomatologia clínica (Schein & Schilder, 1975 e 2006; Jacinto et al., 2005; Martinho & Gomes, 2008; Martinho et al., 2011), acreditávamos que seria possível traçar também uma relação entre LPS,

MMP e sintomatologia, entretanto, todos os 33 pacientes no presente estudo apresentaram-se assintomáticos, impossibilitando tal correlação.

Contudo, de acordo com a literatura e estudos anteriores sabe-se que tanto as endotoxinas como MMPs apresentam importante papel no desenvolvimento das alterações periapicais, incluindo reabsorção óssea, e que este mecanismo envolve diversas citocinas, fatores de crescimento, mediadores químicos da resposta inflamatória, inibidores teciduais de MMPs (TIMPs), entre outros. Assim, a utilização de substâncias com atividade tanto sobre LPS como MMPs, associado com boas técnicas de preparo e selamento dos canais radiculares, certamente aumentará os índices de sucesso do tratamento endodôntico.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pôde-se concluir que:

a) todos os canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical apresentaram endotoxinas na coleta inicial e o preparo biomecânico promoveu significativa redução de endotoxinas nos canais radiculares, sendo que a utilização associada de NaOCl 2,5% com polimixina B ou com água de cal (hidróxido de cálcio 0,14%) foi mais efetiva em neutralizar endotoxinas;

b) a medicação intracanal (clorexidina gel + hidróxido de cálcio) promoveu importante neutralização de endotoxinas nos canais radiculares;

c) os canais radiculares com polpa necrosada e lesão periapical apresentaram, na maioria dos casos, altos níveis de MMP-8 e MMP-9 na coleta inicial, sendo significativamente reduzidos ao longo do tratamento endodôntico, demonstrando importância destas MMPs no monitoramento clínico do tratamento;

d) a MMP-3 apresentou baixos valores em todas as coletas, não demonstrando importância para monitoramento das amostras clínicas;

e) embora os valores de endotoxinas e MMP-8 e -9 tenham sido reduzidos ao longo do tratamento endodôntico, não foi possível traçar uma correlação estatística direta entre eles.

8 REFERÊNCIAS*

Ali MAA. Expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer in odontogenic cysts. *Oral Med oral Pathol Oral Med Oral Radiol Endod.* 2008; 106: 258-63.

Andonovska B, Dimova C, Panova S. Matrix metalloproteinases (MMP-1, -8, -13) in Chronic periapical lesions. *Vojnosanit Pregl.* 2008 Dec; 65(12): 882-6.

Barthel CR, et al. TNF- α release in monocytes after exposure to calcium hydroxide treated *Escherichia coli* LPS. *Int Endod J.* 1997 May;30(3):155-9.

Barton MH, Parvianen A, Norton N. Polymyxin B protects horses against induced endotoxaemia in vivo. *Equine Vet J.* July 2004; 36(5): 397-401. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed>. (Resumo).

Baumgartner JC, Saeng-Usa K, Xia T. Identification of spirochetes (Treponemes) in endodontic infections. *J Endod.* 2003; 29: 794-7.

Belmar MJ, Pabst C, Martinez B, Hernandez M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008; 105: 801-6.

Bhor VM, Thomas CJ, Surolia N, Surolia A. Polymyxin B: an ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol Biosyst.* 2005; 1(3): 213-22.

Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [homepage na internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. J Periodontol. 1993 May; 64(5): 474-84.

Bodet C, Andrian E, Tanabe S, Grenier D. *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide regulates matrix metalloproteinase, tissue inhibitors of matrix metalloproteinase, and plasminogen activator production by human gingival fibroblasts: a potential role in connective tissue destruction. J Cell Physiol. 2007;212(1):189-94.

Brito EG. Efeitos in vitro de extratos naturais sobre *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e endotoxinas em canais radiculares [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP – Univ Estadual Paulista; 2010.

Buck RA, Cai J, Eleazer PD, Staat RH, Hurst HE. Detoxification of endotoxin by endodontic irrigants and calcium hydroxide. J Endod. 2001 May; 27(5): 325-7.

Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kücükylidirim S, Er N. The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute chronic periapical abscesses. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 108: e121-e126.

Cardoso MG, de Oliveira LD, Koga-Ito CY, Jorge AO. Effectiveness of ozonated water on *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis* and endotoxins in root canals. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2008; 105(3): e85-91.

Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, Figueira R et al. Expression analysis of matrix metalloproteinases-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2009; 107(1):127-32.

Chang YC, Lai CC, Yang SF, Chan Y, Hsieh YS. Stimulation of matrix metalloproteinases by black-pigmented bacteroides in human pulp and periodontal ligament cell cultures. J Endod. 2002 Feb; 28(2): 90-3.

Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinases production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. J Periodontol Res. 2002;37:196-203.

Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KBS, Mendes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. Archs Oral Biol. 2009; 54: 764-77.

Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. Science. 2002 Mar 29; 295(5564): 2387-92.

Csako G, Elin RJ, Hochstein HD, Tsai CM. Physical and biological properties of U.S. standard endotoxin EC after exposure to ionizing radiation. Infect Immun. 1983 Jul;41(1):190-6.

Dahlén G, Bergenholtz G. Endotoxic activity in teeth with necrotic pulps. J Dent Res. 1980;59(6):1033-40.

Dahlén G, Magnusson BC, Moller A. Histological and histochemical study of the influence of lipopolysaccharide extracted from *Fusobacterium nucleatum* on the periapical tissues in the monkey *Macaca fascicularis*. Archs Oral Biol. 1981;26(7):591-8.

Dwyer GT, Torabinejad M. Radiographic and histologic evaluation of the effect of endotoxin on the periapical tissues of the cat. J Endod. 1981 Jan;7(1):31-35.

Ferraz CCR, Gomes BP, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. In vitro assessment of the antimicrobial action and the mechanical ability of chlorhexidine gel as an endodontic irrigant. J Endod 2001;27(7):452-5.

Gendron R, Grenier D, Sorsa T, Mayrand D. Inhibition of the activities of matrix metalloproteinases 2, 8, and 9 by chlorhexidine. Clin Diagn Lab Immunol. 1999 May; 6(3): 437-9.

Giacometti A, Cirioni O, Ghiselli R, Mocchegiani F, Paggi AM, Orlando F, Kamysz W, Kasprzykowski F, Mackiewicz Z, Scalise G, Saba V. Therapeutic efficacy of intraperitoneal polymyxin B and polymyxin-like peptides alone or combined with levofloxacin in rat models of septic shock. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49(1): 193-6.

Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Associations of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J.* 1994; 27: 291-8.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental in root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.

Gomes BPF, Vianna ME, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. et al. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of calcium hydroxide combined with chlorhexidine gel used as intracanal medicament. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Radiol and Endod* 2006;102(4):544-50.

Gomes BPFA, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reduction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod.* 2007; 33(9): 1049-52.

Gomes BPFA, Pinheiro ET, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. et al. Microbial analysis of canals of root-filled teeth with periapical lesions using polymerase chain reaction. *J Endod.* 2008; 34(5): 537-40.

Gomes BPF, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent* 2009; 37(1):76-81.

Grenier D, Grignon L. Response of human macrophage-like cells to stimulation by *Fusobacterium nucleatum* ssp *nucleatum* lipopolysaccharide. *Oral Microbiol Immunol* 2006; 21:190-6.

Grenier D, Tanabe S-I. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor – α , interleukin - 1β and matrix metalloproteinase 9 secretion. J Periodont Res. 2008; 43: 372-7.

Guo YB, Chen LP, Cao HW, Wang N, Zheng J, Xiao GX. Polymyxin B antagonizing biological activity of lipopolysaccharide. Chin J Traumatol. 2007; 10(3): 180-3.

Gusman H, Santana RB, Zehnder M. Matrix metalloproteinase levels and gelatinolytic activity in clinically healthy and inflamed human dental pulps. Eur J Oral Sci. 2002; 110:353–357.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. Acta Odontologica Scandinavica. 2007; 65: 1-13.

Harper N, Connor K, Steinberg M, Safe S. An enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) specific for antibodies to TNP-LPS detects alterations in serum immunoglobulins and isotype switching in C57BL/6 and DBA/2 mice exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. Toxicology. 1994 Sept; 92(1-3): 155-67.

Hashioka K, Yamasaki M, Nakane A, Horiba N, Nakamura H. The relationship between clinical symptoms and anaerobic bacteria from infected root canals. J Endod. 1992 Nov; 18(11): 558-61.

Hojo Y, Ikeda U, Takahashi M, Sakata Y, Takizawa T, Okada K, et al. Matrix metalloproteinase-1 expression by interaction between monocytes and vascular endothelial cells. J Mol Cell Cardiol. 2000;32:1459-68.

Hong C, Lin S, Kok S, Cheng S, Lee M, Wang T et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. J Oral Pathol Med. 2004;33:162-9.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, Ito M, Matsumoto T, Nakamura H. Correlations between endotoxin and clinical symptoms or radiolucent areas in infected root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1991 Apr; 71(4): 492-95.

Hutter JW. Commentary: endotoxin content in endodontically involved teeth (A tribute to Dr. Herbert Schilder). *J Endod.* 2006 April; 32(4): 291-2.

Islam S, Hassan F, Tumurkhuu G, Dagvadorj J, Koide N, Naiki Y, Mori I, Yoshida T, Yokochi T. Bacterial lipopolysaccharide induces osteoclast formation in RAW 264.7 macrophage cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007 Aug;360(2):346-51

Itoh T, Nakamura H, H+Kishi J, Hayakawa T. The activation of matrix metalloproteinases by a whole-cell extract from *Prevotella nigrescens*. *J Endod* 2009; 35(1):55-9.

Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol.* 2003; 18(5): 285-92.

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

Janeway CA. *Imunologia: o sistema imunológico na saúde e na doença.* Trad. D. C. Machado et al. 5.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2006.

Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod.* 1994 Jun; 20(6): 276-78.

Jiang J, Zuo J, Chen SH, Holliday LS. Calcium hydroxide reduces lipopolysaccharide-stimulated osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Nov; 95(3): 348-54.

Jiang J, Li H, Fahid FS, Filbert E, Safavi KE, Spangberg LS, Zhu Q. Quantitative analysis of osteoclast-specific gene markers stimulated by lipopolysaccharide. *J Endod*. 2006; 32(8): 742-6.

Johnson S, Knox A. Autocrine production of matrix metalloproteinase-2 is required for human airway smooth muscle proliferation. *Am J Physiol*. 1999 Dec; 277: 1109-17.

Katono T, Kawato T, Tanabe N, Tanaka H, Suzuki N, Kitami S, Morita T, Motohashi M, Maeno M. Effects of nicotine and lipopolysaccharide on the expression of matrix metalloproteinases, plasminogen activators, and their inhibitors in human osteoblasts. *Arch Oral Biol*. 2009 Feb; 54(2): 146-55.

Kawase N, Kishi J-I, Nakamura H, Hayakawa T. Collagenolytic activity in sonic extracts of *Tannerella forsythia*. *Archs Oral Biol*. 2010; 55: 545-9.

Khabbaz MG, Anastasiadis PL, Sykaras SN. Determination of endotoxins in caries: association with pulpal pain. *Int Endod J*. 2000;33(2):132-7.

Kozuka Y, Ozaki Y, Ukai T, Kaneko T, Hara Y. B cells play an important role in lipopolysaccharide-induced bone resorption. *Calcif Tissue Int*. 2006; 78: 125-32.

Leonardi R, Caltabiano R, Loreto C. Collagenase-3 (MMP-13) is expressed in periapical lesions: an immunohistochemical study. *Int Endod J*. 2005; 38: 297-301.

Leonardo MR, Silva RAB, Assed S, Nelson-Filho P. Importance of bacterial endotoxin (LPS) in endodontics. *J Appl Oral Sci* 2004; 12(2): 93-8.

Leonardo MR. Endodontia: tratamento de canais radiculares: principios técnicos e biológicos. São Paulo: Artes Médicas; 2005.

Levin J, BANG FB. Clottable protein in Limulus: its localization and kinetics of its coagulation by endotoxin. *Thromb Diath Haemorrh.* 1968; 31(1): 186-97.

Lin SK, Kok SH, Kuo MYP, Wang TJ, Wang JT, Yeh FTC, et al. sequential expressions of MMP-1, TIMP-1, IL-6 and COX-2 genes in induced periapical lesions in rats. *Eur J Oral Sci.* 2002;110:246-53.

Lin S-K, Kok S-H, Kuo MY-P, Lee M-S, Wang C-C, Lan W-H, Hsiao M, Goldring SR, Hong C-Y. Nitric oxide promotes infectious bone resorption by enhancing cytokine-stimulated interstitial collagenase synthesis in osteoblasts. *J Bone and Miner Res.* 2003; 18(1): 39-46.

Lindermann RA, Economou JS, Rothermel H. Production of interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor by human peripheral monocytes activated by periodontal bacteria and extracted lipopolysaccharides. *J Dent Res.* 1988 Aug; 67(8): 1131-5.

Liu J, Wang S, Zhang P, Said-Al-Naief N, Michalek SM, Feng X. Molecular mechanism of the bifunctional role of lipopolysaccharide in osteoclastogenesis. *J Biol Chem.* 2009 May 1; 284(18): 12512-23.

Lu Y, Hong TG, Jin M, Yang JH, Suh S-J, Piao DG, Ko H-K, Seo C-S, Chang Y-C, Kim C-H, Son J-K, Chang HW. Saucerneol G, a new lignin, from *Saururus chinensis* inhibits matrix metalloproteinase-9 induction via a nuclear factor KB and mitogen activated protein kinases in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 2010; 33(12): 1944-8.

Maekawa LE, Valera MC, Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. In vitro evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2011 Apr; 19(2): 106-12.

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;34:268-72.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. 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 Sep; 36(9):1467-74.

Martinho FC, Chiesa WMM, Marinho ACS, Zaia A, Ferraz CCR, Almeida JFA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxins from primarily infected root canals. *J Endod*. 2010 Nov; 36(11): 1766-9.

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):163-7.

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE(2) production. *J Endod*. 2011 May; 37(5): 602-7.

Matsushita K, Tajima T, Tomita K, Takada H, Nagaoka S, Torii M. Inflammatory cytokine production and specific antibody responses to lipopolysaccharide from endodontopathic black-pigmented bacteria in patients with multilesional periapical periodontitis. *J Endod*. 1999 Dec; 25(12): 795-9.

Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulske-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod*. 1987; 13(12): 559-65.

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

Melamed D, Messika O, Glass-Marmor L, Miller A. Modulation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion in B lymphopoiesis. *Int Immunol*. 2006 Sep; 18(9): 1355-62.

Menezes MM, Valera MC, Koga-Ito CY, Camargo CHR, Mancini MNG. *In vitro* evaluation of the effectiveness of irrigants and intracanal medicaments on microorganisms within root canals. *Int Endod J*. 2004;37(5):311-9.

Mohammadi Z, Abbott PV. The properties and applications of chlorhexidine in endodontics. *Int Endod J* 2009; 42(4):288-302.

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

Mohammadi Z. Endotoxin in endodontic infections:a review. *CDA Journal*. 2011 March; 39 (3); 153-9.

Montagner F, Jacinto RC, Signoretti FG, Gomes BP. *Treponema* species detected in infected root canals and acute apical abscess exudates. *J Endod*. 2010 Nov; 36(11): 1796-9.

Morrison DC, Jacobs DM. Binding of polymyxin B to the lipid A portion of bacterial lipopolysaccharides. *Immunochemistry*. 1976 Oct; 13(10): 813-8.

Morse DR. Endodontic microbiology in the 1970s. *Int Endod J*. May 1981; 14: 69-79.

Murakami Y, Hanazawa S, Tanaka S, Iwahashi H, Yamamoto Y, Fujisawa S.. A possible mechanism of maxillofacial abscess formation: involvement of *Porphyromonas endodontalis* lipopolusaccharide via the expression of inflammatory cytokines. *Oral Microbiol Immunol*. 2001; 16: 321-5.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2004 Nov; 15(6): 348-81.

Narayanan LL, Vaishnavi C. Endodontic microbiology. *J Conserv Dent*. 2010 Oct; 13(4): 233-9.

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

Oliveira LD, Leão MVP, Carvalho CAT, Camargo CHR, Valera MC, Jorge AOC. et al. *In vitro* effects of calcium hydroxide and polymix B on endotoxins in root canals. *J Dent*. 2005;33(2):107-14.

Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC. In vitro effects of endodontics irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; 104(1): 135-42.

Oliveira LD, Carvalho CAT, Carvalho AS, Koga-Ito CY, Valera MC, Jorge AOC. Efeitos *in vivo* do tratamento endodôntico sobre endotoxinas em canais radiculares com polpa necrosada e avaliação dos efeitos citotóxicos. *Brazilian Oral Research* 2009;23(1):33.

Palosaari H, Walgren J, Larmas M, Rönka H, Sorsa T, Salo T, Tjäderhane L. The expression of MMP-8 in human odontoblasts and dental pulp cells is down-regulated by TGF- β 1. *J Dent Res*. 2000; 79(1): 77-84.

Parvianen AK, Barton MH, Notton NN. Evaluation of polymyxin B in an ex vivo model of endotoxemia in horses. *Am J Vet Res*. 2001 Jan; 62(1): 72-6.

Paula-Silva FW, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL. High matrixmetalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod*. 2009; 35(9): 1234-42.

Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod* 2010;36(2):231-7.

Pitts DL, Williams BL, Morton Junior TH. Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *J Endod*. 1982 Jan; 8(1): 10-8.

Reynolds JJ, Hembry RM, Meikle MC. Connective tissue degradation in health and periodontal disease and the roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors. *Adv Dent Res*. 1994 July; 8(2): 312-9.

Reynolds JJ, Meikle MC. Mechanisms of connective tissue matrix destruction in periodontitis. *Periodontol* 2000. 1997;14:144-57.

Rifkind D, Palmer JD. neutralization of endotoxin toxicity in chick embryos by antibiotics. *J Bacteriol*. 1966 Oct; 92(4): 815-9.

Rifkind D. Prevention by polymyxin B of endotoxin lethality in mice. *J Bacteriol*. 1967 Apr; 93(4): 1463-4.

Rôças IN, Siqueira Junior JF. Root canal microbiota of teeth with chronic apical periodontitis. *J Clin Microbiol*. 2008; 46(11): 3599-606.

Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod*. 1994;20(3):127-9.

Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod*. 1993;19(2):76-9.

Santos J, Carrilho M, Teryahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, Pashley D, Tay F, Ferraz C, Tjäderhane. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Dent*. 2009; 35(5):686-9.

Sato Y, Kishi J, Suzuki K, Nakamura H, Hayakawa T. Sonic extracts from a bacterium related to periapical disease activate gelatinase A and inactivate tissue inhibitor of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2. *Int Endod J*. 2009; 42: 1104-1111.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. *J Endod*. 1975 Jan;1(1):19-21.

Schein B, Schilder H. Endotoxin content in endodontically involved teeth. [tribute to Dr. Herbert Schilder]. *J Endod*. 2006;32(4):293-5.

Sena NT, Gomes BP, Vianna ME, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. In vitro antimicrobial activity of sodium hypochlorite and chlorhexidine against selected single-species biofilms. *Int Endod J* 2006;39(11):878-85.

Shimokawa Ki K, Katayama M, Matsuda Y, Takahashi H, Hara I, Sato H, Kaneko S. Matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 activities in human seminal plasma. *Mol Hum Reprod*. 2002 Jan; 8(1):32-6.

Shin S-J, Lee W, Lee J-II, Baek S-H, Kum K-Y, Shon W-J, Bae K-S. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful nonvital teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011. (Article in press).

Shin S-J, Lee J-I, Baek S-H, Lim S-S. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod*. 2002 April;28(4):313-15.

Shoji M, Tanabe N, Mitsui N, Tanaka H, Suzuki N, Takeichi O, Sugaya A, Maeno M. Lipopolysaccharide stimulates the production of prostaglandin E₂ and the receptor Ep4 in osteoblasts. *Life Sci*. 2006; 78(17): 2012-8.

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

Silva LAB, Nelson Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin *in vivo*. *J Endod*. 2002;28(2):94-8.

Silva LAB, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M. Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J*. 2004; 15(2): 109-14.

Silva LAB, Silva RA, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent Res*. 2008; 19(4):296-300.

Siqueira Junior JF, Rôças IN, Santos SR, Lima KC, Magalhães FA, de Uzeda M. Efficacy of instrumentation technique and irrigation regimens in reducing the bacterial population within root canals. *J Endod*. 2002 Mar; 28(3): 181-4.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. *Pseudoramibacter alactolyticus* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2003 Nov; 29(11): 735-8.

Siqueira Junior JF, Rôças IN, Silva MG. Prevalence and clonal analysis of *Porphyromonas gingivalis* in primary endodontic infections. *J Endod*. 2008; 34(11): 1332-6.

Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*. 2004;10:311-18.

Stashenko P, Jandinski JJ, Fujiyoshi P, Rynar J, Socransky SS. Tissue levels of bone resorptive cytokines in periodontal disease. *J Periodontol*. 1991 Aug; 62(8): 504-9.

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

Sulkala M, Tervahartiala T, Sorsa T, Larmas M, Salo T, Tjäderhane. Matrix metalloproteinase-8 (MMP-8) is the major collagenase in human dentin. *Archs Oral Biol*. 2007; 52: 121-7.

Sundqvist G. Taxonomy, ecology, and pathogenicity of the root canal flora. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1994 Oct;78(4):522-30.

Takahashi S, Inoue T, Higaki M, Mizushima Y. Cyclooxygenase inhibitors enhance the production of tissue inhibitor-1 of metalloproteinases (TIMP-1) and pro-matrix metalloproteinase 1 (proMMP-1) in human rheumatoid synovial fibroblasts. *Inflamm Res*. 1997;47:320-3.

Tanabe SI, Grenier D. Macrophage tolerance response to *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* lipopolysaccharide induces differential regulation of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and matrix metalloproteinase 9 secretion. *J Periodontal Res* 2008; 43(3):372-7.

Tanomaru JMG, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J*. 2003 Nov;36(11):733-9.

Teronen O, Salo T, Laitinen J, Törnwall J, Ylipaavalniemi P, Kottinen YT, Hietanen J, Sorsa T. Characterization of interstitial collagenases in jaw cyst wall. *Eur J Oral Sci*. 1995; 103(3): 141-7.

Tjäderhane L, Larjava H, Sorsa T, Uitto VJ, Larmas M, Salo T. The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions. *J Dent Res*. 1998;77(8):1622-9.

Tjäderhane, L., Palosaari, H., Wahlgren, J., Larmas, M., Sorsa, T., Salo, T. Human Odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res*. 2001; 15:55-58.

Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonem M, Salo T. The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *Int Endod J*. 2007; 40: 282-9.

Uitto V-J, Overall CM, McCulloch C. Proteolytic host enzymes in gingival crevice fluid. *Periodontol* 2000. 2003;31:77-104.

Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Jorge AO. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Oct;110(4):e70-4.

Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BP et al. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol*. 2007;22(6):411-8.

Vianna ME, Gomes BP, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of chlorhexidine and sodium hypochlorite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Jan;97(1):79-84.

Vilela PGF. Avaliação da liberação de metaloproteínases da matriz (MMP-3 e MMP-8) por macrófagos ativados por diferentes concentrações de endotoxinas (LPS) em variados períodos de tempo [Dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (SP): UNESP – Univ Estadual Paulista: 2009.

Wahl LM, Corcoran ML. Regulation of monocyte/macrophage metalloproteinase production by cytokines. *J Periodontol*. 1993;64(5 Suppl):467-73.

Wahlgren J, Maisi P, Sorsa T, Sutinen M, Tervahartiala T, Pirilä E, Teronen O, Hietanen J, Tjäderhane L, Salo T. Expression and induction of collagenases (MMP-8 and -13) in plasma cells associated with bone-destructive lesions. *J Pathol*. 2001; 194: 27-224.

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.

Wang CY, Stashenko P. Characterization of bone-resorbing activity in human periapical lesions. *J Endod.* 1993; 19: 107-11.

Wang X, Zhang C, Lin Q. Alteration of immunological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *Zhonghua Kou Qiang Yi Za Zhi.* 2001; 36(6): 417-20.

Willians JC, Gharbia SE, Gulabivala K, Rajendram D, Mehta N, Huttson R, Collins MD, Shah HN. Noncultivable microbial communities in dentine and cementum: a molecular analytical approach. *Clin Infect Dis.* 1997; 25 (suppl 2): S233-4.

Yamasaki M, Nakane A, Kumazawa M, Hashioka K, Horiba N, Nakamura H. Endotoxin and Gram-negative bacteria in the rat periapical lesions. *J Endod.* 1992 Oct; 18(10): 501-4.

Yang W-K, Kim M-R, Lee Y, Son H-H, Lee W. Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitors in MG63 cells. *J Endod.* 2006; 32 (12): 1142-5.

Yelsilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M. Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod.* 1995 Oct; 21(10): 513-5.

Zhang Y, McCluskey K, Fujii K, Wahl LM. Differential regulation of monocyte matrix metalloproteinase and TIMP-1 production by TNF-alpha, granulocyte-macrophage CSF, and IL-1 beta through prostaglandin-dependent and-independent mechanisms. *J Immunol.* 1998;161(6):3071-6.

Zehnder, M. Root canal irrigants. *J Endod.* 2006; 32(5): 389-98.

Anexo 1 – Certificado do Comitê de Ética

unesp  **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / suely@fosjc.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Envolvendo Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **089/2007-PH/CEP**, sobre **“Ação do tratamento endodôntico sobre metaloproteinase da matriz (MMP-8) e endotoxinas em dentes com necrose pulpar – Estudo in vivo”**, sob a responsabilidade de **CLAUDIO ANTONIO TALGE CARVALHO**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 13 de novembro de 2007



Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi
Coordenadora do CEP/HUMANOS/FOSJC

Recebi o original deste documento.
em <u>29/11/07</u>
Ass.: <u>[Assinatura]</u>