



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

**FLÁVIA FIGUEIREDO CHAVES TEIXEIRA**

**MONITORAMENTO CLÍNICO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO  
PERIAPICAL ANTES E APÓS O USO DE DIFERENTES MEDICAÇÕES  
INTRACANAL ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE BIOMARCADORES  
INFLAMATÓRIOS**

2015

**FLÁVIA FIGUEIREDO CHAVES TEIXEIRA**

**MONITORAMENTO CLÍNICO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO  
PERIAPICAL ANTES E APÓS O USO DE DIFERENTES MEDICAÇÕES  
INTRACANAL ATRAVÉS DOS NÍVEIS DE BIOMARCADORES  
INFLAMATÓRIOS**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP - Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia Restauradora, Área de Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Canato Martinho  
Co-orientadora: Profa. Tit. Dra. Márcia Carneiro Valera

São José dos Campos

2015

Apresentação gráfica e normatização de acordo com:  
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para  
Normalização de Trabalhos Acadêmicos do ICT. Rev. São José dos  
Campos: ICT/UNESP; 2014.

Teixeira, Flávia Figueiredo Chaves

Monitoramento clínico do processo inflamatório periapical antes e  
após o uso de diferentes medicações intracanal através dos níveis de  
biomarcadores inflamatórios / Flávia Figueiredo Chaves Teixeira. -  
São José dos Campos : [s.n.], 2015.  
92 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) - Pós-Graduação  
em Odontologia Restauradora - Instituto de Ciência e Tecnologia de  
São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, 2015.

Orientador: Fredererico Canato Martinho

Co-orientador: Márcia Carneiro Carneiro Valera.

1. Citocina inflamatória. 2. Metaloproteinase. 3. Instrumentação.  
4. Medicação intracanal. 5. Canal radicular. I. Martinho,  
Fredererico Canato, orient. II. Valera, Márcia Carneiro Carneiro ,  
co-orient. III. Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos  
Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista. IV. Universidade Estadual  
Paulista 'Júlio de Mesquita Filho'. V. UNESP - Univ Estadual  
Paulista. VI. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Achille Bassi e Seção Técnica de Informática,  
ICMC/USP com adaptações - STATi e STI do ICT/UNESP. Dados fornecidos pelo autor.

## 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, 3 de fevereiro de 2015

E-mail: flavia01.teixeira@gmail.com

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Frederico Canato Martinho** (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP- Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Ana Paula Martins Gomes**

Instituto de Ciência e Tecnologia  
UNESP- Univ Estadual Paulista  
Campus de São José dos Campos

**Profa. Dra. Izabel Coelho Gomes Camões**

UFF- Universidade Federal Fluminense  
Campus de Niterói

São José dos Campos, 03 de fevereiro de 2015.

## DEDICATÓRIA

Aos meus queridos pais, **José Chaves Teixeira e Bernadete Maria Figueiredo Chaves Teixeira** por serem exemplo de trabalho, sabedoria e dedicação, por permitirem que eu pudesse conquistar tudo o que desejasse, por sempre estarem ao meu lado me apoiando e direcionando, sempre com muito zelo, amor e atenção. Por sempre me oferecer tudo de melhor na vida, por muitas vezes fazer do impossível o possível para que eu pudesse estar bem. Os pais são realmente pessoas enviadas por Deus, AMO vocês acima de qualquer coisa e devo tudo à vocês, essa conquista não é só minha, é de vocês também. Admiro muito vocês.

Às minhas queridas irmãs **Érica e Mirela**, minhas melhores amigas e companheiras para a vida toda, sempre me aconselhando e apoiando. Amo vocês acima de qualquer coisa. Tenho muito orgulho de vocês.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Ao meu orientador Professor Frederico Canato Martinho pela dedicação e exatidão em seus trabalhos. Obrigada pelos ensinamentos e atenção. Obrigada por me ensinar sua linha de pesquisa, por despertar em mim o interesse em novas descobertas científicas que irão sanar dúvidas e melhorar o atendimento clínico. Obrigada por confiar em mim e no meu trabalho, pelas palavras de incentivo, motivação e conforto.

À minha Professora da Graduação e Co-orientadora Márcia Carneiro Valera, por todos esses anos de ensinamento e dedicação. Obrigada por ter confiado no meu potencial, por direcionar meu caminho para o estudo científico e ao ensino. A minha admiração pela senhora começou na graduação com sua alegria em dar aula, seu olhar confiante, seu carinho e atenção com o qual tratava os alunos, que se perpetua até hoje. Obrigada pelas palavras de incentivo, conforto e pelos conselhos.

À minha Professora da Graduação Ana Paula Martins Gomes pelos ensinamentos, alegria e atenção em todos esses anos de ótima convivência. Obrigada pelo carinho e por todas as palavras de incentivo e boa formação, sua serenidade, compreensão e simpatia faz com que os alunos sintam-se especialmente bem ao seu lado, seu conhecimento é transmitido facilmente como algo nato. Obrigada pelo incentivo à voar mais alto.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, pois sem Ele nada seria possível. Obrigada por todas as oportunidades, pela família que tenho e pelos caminhos que me direcionou.

Ao instituto de Ciência e Tecnologia – UNESP / SJC na pessoa do Diretor, Prof. Dr. Carlos Augusto Pavanelli e do Vice Diretor, Prof. Tit. Estavão Tomomitso Kimpara.

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia Restauradora na pessoa da Coordenadora do Programa Profa. Tit. Márcia Carneiro Valera.

Ao Prof. Cláudio Antônio Talge Carvalho pelo companheirismo, pelos ensinamentos e pelo positivismo sempre olhando o lado bom de todas as situações.

Ao Prof. Carlos Henrique Ribeiro Camargo pela importância e seriedade em seus ensinamentos e pelas palavras de amizade

Ao Prof. Bruno das Neves Cavalcanti pela dedicação em oferecer ensinamentos a qualquer aluno que tivesse uma dúvida e pela inspiração em sempre aumentar nossos conhecimentos.

Aos queridos amigos do Mestrado: Monique Costa, Flávia Leal, Luciana Ferreira, Rosemary Soares e Emanuel Rovai pelo companheirismo, amizade e atenção nesses anos de boa convivência e aprendizado com cada um.

Aos queridos amigos de Doutorado: Camila Said, Flávia Cardoso, Cláudia Bin, Rafael Binato, Gleyce Oliveira, Ivany Baptista e Aletéia Fernandes por me receberem tão bem, pelos ensinamentos, amizade e pelas palavras de incentivo.

À querida amiga Nádia Ferreira minha co-orientadora no TCC, pelos ensinamentos e amizade desde a graduação, pelo incentivo em entrar na pós-graduação. Foi uma alegria conviver com você e receber seus ensinamentos no Laboratório de Microbiologia, obrigada.

À querida amiga Maria Tereza Pedrosa que me recebeu na pós-graduação e me ofereceu os primeiros ensinamentos no Laboratório. Foi uma alegria te conhecer. Obrigada pela amizade, companheirismo, palavras de incentivo e conforto.

À querida amiga Rafaela Vasconcelos que me ajudou a ingressar na pós-graduação sem ao menos me conhecer. Obrigada por sempre me mostrar bons caminhos.

À querida amiga Ana Cláudia Xavier pela amizade, companheirismo e ensinamentos no Laboratório durante os Testes de ELISA. Muito Obrigada!

À querida amiga Fernanda Feitosa pela amizade desde o 1º ano de graduação que se perpetuou até a pós-graduação. Muito obrigada pelo incentivo, apoio e ensinamentos, sua amizade faz de mim uma pessoa melhor.

À querida amiga Sabrina Feitosa pela amizade que cresceu de forma natural, pelos ensinamentos e incentivo, nossa convivência me ensinou só coisas boas. Muito obrigada por todo auxílio.



Às minhas queridas amigas Breda Oliveira e Isabela Paulino pelo maravilhoso convívio em casa e na universidade, por todos os ensinamentos, incentivo, conselhos e alegrias que passamos juntas, aprendi muito com vocês. Amo muito vocês.

À minha querida amiga Vivian Narana pelo maravilhoso convívio durante a pós-graduação mesmo cursando áreas diferentes e por todo incentivo. Nossa amizade só ampliou nossos conhecimentos e nossas alegrias.

Às minhas queridas amigas Rafaela Canavezi, Patrícia Kimie e Gabriela Mendes pelo maravilhoso convívio em casa e na universidade, por todas as conversas, conselhos e risadas. Tive um grande aprendizado e crescimento com vocês. Amo muito vocês.

À secretária do Departamento de Odontologia Restauradora Rosângela, por sua colaboração sempre que foi preciso.

A todos os professores de Departamento de Odontologia Restauradora pelo ótimo convívio.

Às técnicas do laboratório de Odontologia Restauradora Josiana e Fernanda e aos técnicos de Microbiologia Sérgio e Domingos por toda atenção e ajuda.

Aos funcionários da biblioteca em especial à Renata Couto e Vanusa Paiva pela atenção e disponibilidade sempre que foi preciso.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação Rosemary, Bruno e Ivan pela colaboração e informações prestadas durante curso.

A Capes pelo auxílio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao Professor Gustavo Nascimento pelo auxílio para a realização da estatística

Aos pacientes que foram fundamentais para a realização desta pesquisa.

E a todos que de muitas maneiras colaboraram para a execução deste trabalho.

Muito Obrigada!

**“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina”.**

**Cora Coralina**

## SUMÁRIO

|                                                                                   |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>RESUMO.....</b>                                                                | <b>12</b> |
| <b>ABSTRACT.....</b>                                                              | <b>14</b> |
| <b>1 INTRODUÇÃO.....</b>                                                          | <b>16</b> |
| <b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>                                               | <b>20</b> |
| <b>2.1 Biomarcadores inflamatórios nas infecções endodônticas.....</b>            | <b>20</b> |
| 2.1.2 Citocinas inflamatórias .....                                               | 20        |
| 2.1.3 MMP's nas infecções endodônticas.....                                       | 26        |
| 2.1.4 TIMP's nas infecções endodônticas.....                                      | 29        |
| 2.1.5 Complexos MMP's/TIMP's.....                                                 | 31        |
| <b>2.2 Medicação intracanal versus citocinas inflamatória.....</b>                | <b>33</b> |
| <b>3 PROPOSIÇÃO.....</b>                                                          | <b>36</b> |
| <b>4 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>                                                  | <b>38</b> |
| 4.1 Seleção de pacientes.....                                                     | 38        |
| 4.2 Seleção dos casos.....                                                        | 38        |
| 4.3 Etapas clínicas.....                                                          | 39        |
| 4.3.1 Tratamento endodôntico.....                                                 | 42        |
| 4.3.2 Preparo biomecânico e Medicação Intracanal .....                            | 43        |
| <b>4.4 Etapas Laboratoriais.....</b>                                              | <b>48</b> |
| 4.4.1 Quantificação de biomarcadores e seus antagonistas.....                     | 48        |
| 4.4.2 Análise da produção de biomarcadores inflamatórios e seus antagonistas..... | 49        |
| <b>4.5 Análise Estatística.....</b>                                               | <b>51</b> |
| <b>5 RESULTADOS.....</b>                                                          | <b>52</b> |
| <b>5.1 Citocinas inflamatórias e seus antagonistas.....</b>                       | <b>53</b> |
| 5.1.1 Níveis de citocinas (IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa).....                        | 53        |
| 5.1.2 Citocinas inflamatórias (IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa) versus                  |           |

|                                                                                                                                             |           |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| sinais/sintomas clínicos e radiográficos.....                                                                                               | 53        |
| 5.1.3 Níveis dos receptores antagonistas (IL1-RA, IL6-RA e sTNF-R1).....                                                                    | 56        |
| 5.1.4 Inter-relação citocinas inflamatórias (IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa) e antagonistas (IL1-RA, IL6-RA e sTNF-R1).....                      | 56        |
| <b>5.2 MMP's, TIMP's e Complexos MMP's/TIMP's.(MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-2).....</b> | <b>57</b> |
| 5.2.1 Níveis de MMP-1, MMP-2 e MMP-9.....                                                                                                   | 57        |
| 5.2.2 MMP's <i>versus</i> sinais e sintomas clínicos e radiográficos.....                                                                   | 57        |
| 5.2.3 Níveis de inibidores de MMP's : TIMP's.....                                                                                           | 59        |
| 5.2.4 Inter-relação MMP's e TIMP's.....                                                                                                     | 59        |
| 5.2.5 Níveis dos Complexos MMP's/TIMP's.....                                                                                                | 60        |
| 5.2.6 Complexos MMP's/TIMP's <i>versus</i> sinais e sintomas clínicos e radiográficos.....                                                  | 60        |
| <b>5.3 Análise dos biomarcadores inflamatórios após terapia endodôntica com medicações à base de Ca(OH)<sub>2</sub>.....</b>                | <b>62</b> |
| 5.3.1 Citocinas inflamatórias (IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa) e seus antagonistas (IL1-RA, IL6-RA e sTNF-R1).....                               | 62        |
| 5.3.2 Níveis de MMP's, TIMP's e Complexos MMP's/TIMP's.....                                                                                 | 63        |
| <b>6 DISCUSSÃO.....</b>                                                                                                                     | <b>66</b> |
| <b>7 CONCLUSÃO.....</b>                                                                                                                     | <b>75</b> |
| <b>REFERÊNCIAS.....</b>                                                                                                                     | <b>76</b> |
| <b>ANEXOS.....</b>                                                                                                                          | <b>87</b> |

Teixeira FFC. Monitoramento clínico do processo inflamatório periapical antes e após o uso de diferentes medicações intracanal através dos níveis de biomarcadores inflamatórios [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2015.

## RESUMO

Os objetivos do presente estudo são: 1) Estudar o perfil inflamatório das lesões periapicais de dentes com infecções endodônticas primárias através dos níveis das citocinas inflamatórias: IL-1beta, IL-6, TNF-alfa; correlacionando com a presença de sintomatologia clínica; 2) Investigar os níveis das metaloproteinases [MMP-1, -2 e -9], inibidores de metaloproteinase [TIMP-1 e -2] e complexos MMP/TIMP [MMP1/TIMP1, MMP1/TIMP2, MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP2, MMP9/TIMP1 e MMP9/TIMP2], presentes nos tecidos periapicais de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical; correlacionando com a presença de sintomatologia clínica e reabsorção óssea; 3) Correlacionar os níveis das citocinas inflamatórias [IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa] e seus antagonistas [IL1-RA, IL6-RA, sTNF-R1], presentes nos tecidos periapicais; 4) Estudar a efetividade de diferentes medicações intracanal no controle do processo inflamatório periapical, através do monitoramento dos níveis de citocinas inflamatórias, [IL-1beta, IL-6, TNF-alfa], MMP's [MMP-1, -2 e -9], TIMP's [TIMP-1 e -2] e complexos [MMP1/TIMP1, MMP1/TIMP2, MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP2, MMP9/TIMP1, MMP9/TIMP2] coletadas dos tecidos periapicais. Vinte dentes unirradiculares com necrose pulpar e lesão periapical foram selecionados. Após o preparo biomecânico (PBM) os dentes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de acordo com a medicação intracanal utilizada: Ca(OH)<sub>2</sub>+SSL [Ca(OH)<sub>2</sub> + solução salina fisiológica]; e Ca(OH)<sub>2</sub>+CLX [Ca(OH)<sub>2</sub> + clorexidina gel 2%]. Para a análise dos biomarcadores inflamatórios, foram realizadas coletas utilizando cones de papel estéril/apirogênico, ultrapassando 2 mm além ápice para obtenção do fluido intersticial. As coletas foram realizadas em dois momentos operatórios : coleta após PBM (Coleta inicial-CIF1) e coleta após 14 dias de medicação intracanal (Coleta final-CFF2). Citocinas inflamatórias, metaloproteinases e seus antagonistas foram dosados através do teste imunoenzimático (ELISA). Para análise estatística os dados foram tabulados e analisados pelo programa SPSS for Windows e packpage Statistica 9.0. Resultados: Citocinas e MMP's foram detectadas em 100% das coletas das lesões

periapicais; maiores níveis de MMP's e citocinas foram encontradas nas lesões periapicais > 7 mm ( $p < 0,05$ ); Níveis mais elevados de todos os complexos MMP/TIMP estudados foram detectados nas lesões periapicais  $\leq 7$ mm. Não houve diferença entre as medicações  $[\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{SSL}]$  e  $[\text{Ca}(\text{OH})_2 + \text{CLX gel 2\%}]$  testadas ( $p > 0,05$ ). Todas as medicações intracanal à base de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  reduziram os níveis das citocinas e metaloproteinases presentes nas lesões periapicais de origem endodôntica .

Palavras-chave: Canal radicular. Instrumentação. Citocinas. Metaloproteinases. Medicação intracanal.

Teixeira FFC. Clinical monitoring the inflammatory status of apical periodontitis disease status present in root canal infection before and after the use of different intracanal medication by the levels of inflammatory biomarkers [dissertation]. São José dos Campos (SP):Institute of Science and Technology, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2015.

## ABSTRACT

The aim of this study was: 1) To investigate the inflammatory profile of apical periodontitis disease present in primarily infected root canals determined by the levels of inflammatory cytokines : IL-1beta, IL-6, TNF-alfa; and to correlate with the presence of clinical features; 2) To investigate the levels of metalloproteinases [MMP-1, -2, -9], metalloproteinase inhibitors [TIMP-1 e -2] ; complexes MMP/TIMP [MMP1/TIMP1, MMP1/TIMP2, MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP2, MMP9/TIMP1 e MMP9/TIMP2], present in apical periodontitis disease from teeth with primary endodontic infection; and to correlate with the presence of clinical features; 3) To correlate the levels of IL-1beta, IL-6, TNF-alfa with their respectively antagonists - IL1-RA, IL6-RA, s TNF-R1, all present in apical periodontitis; 4) To evaluate the effectiveness of different root canal medications in the inflammatory process by monitoring the levels of inflammatory cytokines [IL-1beta, IL-6, TNF-alfa], MMP's [MMP-1,-2,-9]; TIMP [TIMP-1 and -2] and complexes [MMP1/TIMP1, MMP1/TIMP2, MMP2/TIMP1, MMP2/TIMP2, MMP9/TIMP1 e MMP9/TIMP2] in apical periodontitis. Twenty patients with single-rooted teeth that had necrotic pulp and periapical periodontitis will be selected. After BMP teeth will be randomly divided into 2 groups according to the root canal medication selection: Ca(OH)<sub>2</sub>+SSL [Ca(OH)<sub>2</sub> + Saline Solution]; e Ca(OH)<sub>2</sub>+CHX [Ca(OH)<sub>2</sub> + chlorhexidine gel 2%]. Samples will be collected from interstitial fluid by using sterile/ apyrogenic paper points. Samples will be performed at two different times: After chemomechanical preparation (S1) and after 14 of root canal medication (S2). Inflammatory cytokines, metalloproteinases and their antagonists will be dosage by ELISA-assay. The levels of inflammatory cytokines, metalloproteinases and their antagonists will be typed on a spreadsheet and statistically analyzed by SPSS for Windows and Statistic package 9.0. Result: MMPs and cytokines were detected in 100% of samples of periapical lesions, higher levels of MMPs and cytokines have been identified in periapical lesions > 7 mm (p < 0.05); higher levels of all MMP / TIMP complexes were detected studied in periapical lesions ≤ 7mm. There was no difference between the



*medications [Ca (OH)<sub>2</sub> + SSL and 2% CHX gel + Ca (OH)<sub>2</sub>] (p >0.05). All intracanal based on Ca (OH)<sub>2</sub> medications influence in the levels of MMPs and cytokines present in the inflammatory periapical lesion. Conclusion: All Ca(OH)<sub>2</sub> medications tested exhibited inflammatory potential against inflammatory biomarkers present in apical periodontitis disease with no differences among them.*

*Results: All inflammatory biomarkers investigated were found in 100% of periapical inflammatory lesions. Higher levels of MMPs (MMP1, MMP2 and MMP9) and cytokines (IL-1beta, IL-6, TNF-alpha) were correlated with larger apical periododontitis lesion >7 mm (p < 0.05). Both Ca (OH)<sub>2</sub> medications [Ca(OH)<sub>2</sub>+SSL and Ca(OH)<sub>2</sub>+CHX] exhibited inflammatory activity against some inflammatory biomarkers present in apical peiodonititis disease p < 0.05 with no differences among them (p > 0.05).*

*Keywords: Root canal. Intrumentation. Cytokines. Metalloproteinases. Root canal medication.*

## 1 INTRODUÇÃO

A infecção bacteriana presente no sistema de canais radiculares, quando não tratada, pode progredir em direção aos tecidos periapicais, estabelecendo um quadro inflamatório, provocado pela migração, ativação e a integração coordenada de células imuno-competentes, caracterizando a periodontite apical (Marton, Kiss, 2000).

Métodos de cultura microbiana ou moleculares revelaram que as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas (Gomes et al., 1994; Martinho et al., 2010, 2014b), dominadas por bacilos gram-negativos anaeróbios estritos, (Martinho et al., 2014b, 2014c; Jacinto et al., 2003; Siqueira et al., 2010). Bactérias gram-negativas, participantes da infecção apresentam como constituinte de membrana externa, moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), também conhecidas como endotoxinas, as quais são responsáveis pela organização e estabilidade bacteriana (Nikaido, Vaara, 1985). Estudos clínicos revelam a presença de LPS bacteriano em 100% dos canais radiculares analisados de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical (Martinho, Gomes, 2008; Martinho et al., 2010, 2011a, 2012, 2014a), sugerindo sua possível participação na destruição óssea perirradicular.

A estrutura histopatológica das periodontites apicais crônicas ou lesões inflamatórias periapicais crônicas compreende, a partir do forame apical, as zonas necróticas e exsudativas, granulomatosa e área fibrosa infiltradas (Yanagisawa, 1980; Egeblad, Werb, 2002) por células incompetentes em interação, como os leucócitos polimorfonucleares macrófagos, linfócitos T, B e plasmócitos. Os tecidos granulamatoso e fibroso, representantes da atividade proliferativa da

inflamação crônica, desenvolvem-se e ocupam o espaço deixado pelo osso reabsorvido (Lin et al., 2002; Garlet, 2004).

O acúmulo de componentes bacterianos presentes nas infecções endodônticas primárias, incluindo endotoxinas de bactérias Gram-negativas (Martinho et al., 2011b, 2012, 2014a), podem estimular a liberação de citocinas inflamatórias por diferentes linhagens celulares (Wilson et al., 1996; Martinho et al., 2010, 2011b, 2012, 2014d).

As infecções crônicas envolvem diferentes citocinas multifuncionais que participam no processo de regulação da resposta imunológica e na inflamação, como por exemplo, o TNF-alfa (Factor de reverse Tumoral) (Safavi, Rossomando, 1991; Ataoglu et al., 2002; Hong et al., 2004; Martinho et al., 2010), interleucina-1 (IL-1) (Martinho et al., 2010, 2012) e interleucina-6 (IL-6) (Barkhordar et al., 1992; Tani-Ishii et al., 1995; Ataoglu et al., 2002; Martinho et al., 2010, 2012, 2014c, 2014d), e prostaglandina – 2 ( $PGE_2$ ) (Le, Vilcek, 1989; Akira et al., 1990; Martinho et al., 2011b). Vale ressaltar que as interações sinérgicas entre estas citocinas são reconhecidas em um processo osteoclástico de retroalimentação negativo ou positivo (Le, Vilcek, 1989; Akira et al., 1990; Martinho et al., 2012).

Diferentes são os mecanismos de retroalimentação entre as citocinas inflamatórias num processo de destruição tecidual. Martinho et al. (2012b) sugerem a participação das citocinas inflamatórias IL- 1 beta, TNF-alfa,  $PGE_2$  e IL-6 no desenvolvimento da periodontite apical crônica, cujos mecanismos de retroalimentação estão diretamente relacionados com aspectos clínicos (presença de sinais/ sintomas) e destruição óssea.

Na destruição tecidual descontrolada, os efeitos deletérios das citocinas inflamatórias são naturalmente controlados pela elaboração e liberação de citocinas anti-inflamatórias e/ou antagonistas, dentre eles, IL-1 RA (receptor antagonista), IL-6 RA, sTNF- R1 (Fator de tumor de

necrose solúvel, Receptor I), (Le, Vilcek, 1989; Akira et al., 1990; Martinho et al., 2012).

Além do efeito deletério das citocinas inflamatórias na periodontite apical, existem várias proteinases que são produzidas, também, por células inflamatórias, como as collagenases (MMP-1 e/ou MMP-8), elastase e gelatinases (MMP-2 e/ou MMP-9), as quais irão promover a degradação do colágeno ou gelatina da matriz extracelular (Massova et al., 1998; Nakata et al., 2000).

As MMP's são normalmente armazenadas intracelular, e quando liberadas, suas atividades são controladas por pró-enzimas e inibidores de metaloproteinases (TIMP's) - TIMP 1, 2, 3 presentes no tecido (Gomez et al., 1997). A inibição das MMP's por estas moléculas é capaz de reduzir os danos provenientes da cascata da inflamação, consequentemente, reduzindo os danos teciduais causado pelas mesmas.

O conceito básico do tratamento do sistema de canais se baseia na remoção mecânica e química dos irritantes do interior de canais infectados, sua modelagem, sua obturação e selamento coronário, propiciando o reparo de lesões periapicais. Durante o preparo biomecânico a solução irrigadora mais utilizada é o hipoclorito de sódio (NaOCl), principalmente por sua ação antimicrobiana (Haapasalo et al., 2005; Martinho, Gomes, 2008; Valera et al., 2009). Entretanto, o preparo biomecânico não elimina completamente a microbiota presente nos canais, sendo necessária a utilização de medicação intracanal (Menezes et al., 2004; Martinho, Gomes, 2008; Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011). O hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$  tem sido a substância de escolha para medicação intracanal por sua capacidade antimicrobiana (Camargo et al., 2006; Maekawa et al., 2011). Estudos revelam a capacidade das medicações intracanaís em regular a expressão gênica das citocinas inflamatórias e sua participação no processo inflamatório. (Tavares et al., 2012, 2013; Martinho et al., 2014c)

Com isso o presente estudo visa monitorar o processo inflamatório periapical através dos níveis de biomarcadores inflamatórios, correlacionando estes níveis com a presença de sintomatologia clínica e área de destruição óssea.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Biomarcadores inflamatórios nas infecções endodônticas**

#### **2.1.2 Citocinas inflamatórias**

Citocina é um termo genérico empregado para designar um extenso grupo de moléculas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Constituem um grupo de fatores extra-celulares que podem ser produzidos por diversas células como monócitos, macrófagos, linfócitos e outras que não sejam linfóides. Todas as citocinas são pequenas proteínas ou peptídeos, algumas contendo moléculas de açúcar ligadas (glicoproteínas). As diferentes citocinas podem ser enquadradas em diversas categorias: interferon (IFN), interleucinas (IL), fator estimulador de colônias (CSF), fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ), e fator de transformação de crescimento (TGF  $\beta$ ) (Cavaillon, 2005)

As citocinas têm como função regular a duração e intensidade das respostas específicas e recrutar células efetoras para áreas onde se desenvolvem respostas inflamatórias e induzem a formação e maturação de novas células à partir de precursores (Janeway et al., 1999).

A produção de citocinas é realizada durante a fase de ativação e fase efetora da imunidade para medir e regular a resposta inflamatória e imunitária. Têm uma vida média curta, estimulam as células com receptores específicos na membrana da célula alvo, têm uma ação

extremamente potente. São moléculas pleiotrópicas (podem atuar sobre muitos tipos celulares diferentes) e também redundantes (várias citocinas podem efetuar as mesmas ações) (Galin, Snyderman, 1999).

Citocinas são classificados como: mediadores e reguladores da imunidade inata [IL1, IL-6, IL-12, IL-16, TNF-alfa (fator de necrose tumoral, INF-gama (interferon gama)]; e mediadores e reguladores da imunidade específica [IL-2, IL-4, TGF-beta (fator de transformação de crescimento), INF-gama] (Galin, Snyderman, 1999).

Walker et al. (2000) investigaram a expressão pró-inflamatória, anti-inflamatória e relação imune das citocinas em lesões periapicais. Foram coletadas amostras através de biópsia de 12 pacientes com granuloma periapical e 12 pacientes com cistos radiculares e analisados por testes de imunohistoquímica anticorpos monoclonal específico e anticorpos policlonal não específico detectaram células com diferentes citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IFN gama) e IL-4 e IL-6 foram encontradas em maior número em células de lesão periapical.

Márton et al. (2000) revisaram o mecanismo de defesa extrarradicular na invasão bacteriana através do forame radicular, resumindo o mecanismo patogênico da periodontite apical na formação de tecido de granulação e a organização bacteriana frente a infecção pulpar. A dinâmica entre o mecanismo defensivo e destrutivo produzido pela patogenicidade pode promover a melhora ou piora nos sinais e sintomas das periodontites apicais influenciando na estratégia de tratamento.

Balton et al. (2001) analisaram a influência de IL-1 e IL-6 na reabsorção óssea provocada por infecção pulpar através da exposição pulpar e inoculação de patógenos como *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus micros* e *Streptococcus intermedius* em primeiros molares de ratos. Após 21 dias os ratos foram sacrificados e a reabsorção óssea e os níveis de citocina foram determinados através de tomografia e teste de ELISA. Os autores

concluíram que os níveis de IL-6 mostram-se mais elevados que IL-1 em presença de destruição óssea.

Lin et al. (2002) correlacionaram lesão periapical e reabsorção óssea após indução de lesão periapical em molares de ratos, foram identificados mRNA para MMP-1, TIMP-1, IL-6 e COX-2 (cicloxigenase), o desenvolvimento da lesão foi detectado por hibridização in situ durante 5, 10, 15 e 20 dias. Os autores observaram que macrófagos e osteoblastos estão envolvidos na lesão periapical, promovendo a reabsorção óssea por MMP-1, IL-6 e COX-2. A presença de COX-2 reduziu a reabsorção óssea apical em 43% e simultaneamente diminuiu a produção de MMP-1 e IL-6 identificados por mRNAs.

Prso et al. (2007) avaliaram a presença de TNF-alfa e IL-6 em lesões periapicais através de coleta cirúrgica de tecido periapical em infecções endodônticas de 45 dentes de pacientes divididos em 3 grupos (G1-sintomáticos, G2-assintomáticos, G3-controle sem presença de lesão). Níveis de TNF- alfa e IL-6 foram detectados elevados em pacientes sintomáticos e assintomáticos em comparação com o grupo controle, entretanto não houve diferença significativa entre pacientes sintomáticos e assintomáticos.

Duarte et al. (2009) analisaram clinicamente e imunologicamente os efeitos do tratamento de mucosite e periimplantite comparando os níveis de citocina. Pacientes que utilizavam implantes dentários de titanium foram divididos em grupos: n = 10 saudáveis (controle), n = 10 mucosite, n = 20 periimplantite. Coletas do fluído intersticial foram feitas com cone de papel posicionado 3 mm no sulco gengival antes e após o tratamento da mucosite e periimplantite com raspagem e remoção do biofilme com curetas e bochecho com clorexidina 0,12% durante 3 meses. IL-4,10 e 12, TNF-alfa, ativador do receptor do Fator nuclear kappa B ligante (RANKL), osteoprotegerina (OPG) e fluído crevicular periimplantite (PICF) foram mensurados pelo teste ELISA



imunoenzimático, os resultados indicaram redução nos níveis de TNF-alfa, OPG e RANKL nas perimplantites e mucosites.

Martinho et al. (2010) investigaram o perfil microbiano e níveis de endotoxinas em canais radiculares que apresentavam infecção endodôntica primária com diagnóstico de periodontite apical, determinando a antigenicidade de macrófagos e níveis de IL-1 beta, TNF-alfa correlacionando com sintomas clínicos e radiográficos. Foi realizada a coleta do fluido intersticial periapical com auxílio de cone de papel de 21 canais radiculares que apresentavam infecção endodôntica primária e lesão periapical. Técnicas de PCR foram utilizadas para detecção bacteriana, teste de “Limulus Amebocyte Lysate” (LAL) foi utilizado para mensurar endotoxinas e IL-1beta / TNF-alfa foram dosados do sobrenadante de macrófagos estimulados com conteúdo infeccioso através do teste de ELISA. *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas endodontalis* e *Treponema socranskii* foram espécies bacterianas gram-negativas mais encontradas, correlação entre número de bactérias gram-negativas e níveis de IL-1 beta e TNF-alfa e níveis elevados de endotoxina estiveram relacionados com maior produção de IL-1 beta e TNF-alfa, que também foram relacionadas com maior destruição óssea provocada por lesão periapical observada radiograficamente.

Maciel et al. (2012) avaliaram a expressão gênica de citocinas inflamatórias em lesões inflamatórias periapicais frente à infecção por *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus prevotii*. Foi realizada a inoculação dessas bactérias em canais radiculares de dentes de ratos “germ free”. Os animais foram sacrificados em 7 e 14 dias após inoculação e amostras do tecido periapical foram coletadas. Expressão de RNAm para citocinas IFN-gama, TNF-alfa, RANKL (ativador do receptor do Fator nuclear kappa-B ligante), IL-10, IL-4 e TGF-beta (Fator de crescimento transformador beta) foram detectados através de PCR real-time. Todas as citocinas mostraram-se dependentes do tipo de bactéria,

contudo, TGF-beta e IL-10 apresentaram maior regulação na resposta inflamatória periapical.

Henriques et al. (2011) determinaram a relação da expressão de RNAm entre IFN-gama, TNF-alfa, IL-1beta, IL-17A, IL-10 e MCP-1 e o desenvolvimento de lesão periapical refratária. Amostras do fluído intersticial coletadas através do cone de papel em vinte pacientes divididos em 2 grupos: G1- dentes com lesão refratária e G2- dentes com vitalidade pulpar (grupo controle) foram analisadas através do teste de PCR. Níveis de TNF-alfa, INF gama, IL -17A e MCP-1 mRNA foram significativamente mais elevados na resposta imune de dentes com perpetuação da lesão periapical e falha no tratamento endodôntico.

Graunaite et al. (2011) revisaram a resposta inflamatória do hospedeiro que apresentava periodontite apical e produção de citocina na degradação do tecido periapical e concluíram que a quantidade e interação de moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias podem influenciar na progressão da doença necessitando de diferentes modalidades de tratamentos com base na regulação de expressão de citocina.

de Brito et al. (2012) avaliaram a expressão de RNAm para CD4+, CD8+ e CD8+T; TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17A, IL-10, CCL2/MCP-1, CCL4, CCL5, CXCR4, CCR5, nas lesões periapicais de origem endodôntica. Amostras do fluído intersticial periapical, foram coletadas de 20 dentes que apresentavam necrose pulpar e periodontite apical através da inserção do cone de papel 2 mm além ápice antes e após 7 dias sem medicação intracanal, apenas selamento coronário com cimento de eugenol. Os resultados de PCR Real Time apresentaram diminuição de citocinas inflamatórias afirmando o controle local do processo inflamatório.

Martinho et al. (2012) investigaram a correlação entre sinais e sintomas e destruição óssea periapical e níveis de citocina IL-1 beta, IL-6, IL-10, TNF-alfa; prostaglandina PGE-2, após a estimulação de macrófagos com conteúdo endodôntico infeccioso, coletados do canal

radicular com presença de infecção endodôntica primária em lesão periapical (PEIAP). Amostras de 21 canais radiculares infectados foram coletadas usando cone de papel. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) foi utilizado para detecção bacteriana e teste “Limulus Amebocyte Lysate” (LAL) foi utilizado para quantificação de endotoxinas. Macrófagos (Raw 264-7) foram estimulados com conteúdo infeccioso coletado dos canais radiculares. Níveis de IL-1 beta, IL-6, IL-10, TNF- alfa e PGE-2 foram determinados pelo teste de ELISA. Bactérias e endotoxinas foram encontrados em 100% dos canais, IL-6 e TNF-alfa foram correlacionados com o tamanho da lesão periapical; a presença de exsudato, sinais e sintomas e tamanho da lesão periapical foram correlacionados com IL-1 beta, PGE-2 e TNF-alfa.

Márton e Kiss (2014) realizaram revisão de literatura visando avaliar a relação entre reabsorção e regeneração óssea na expansão e cicatrização da periodontite na lesão inflamatória periapical. Os autores concluíram que os dados entre o mecanismo de regeneração e destruição estão presentes nos diferentes estágios da periodontite apical e esta dinâmica de equilíbrio depende da infecção, e injúria do tecido do hospedeiro.

Martinho et al. (2014c) investigaram a expressão dos receptores celulares as bactérias presentes nas infecções endodônticas primárias avaliando a atividade de macrófagos “Toll-like receptor 4” (TLR-4), “p38 mitogen-activated protein kinase” (MAPK), “nuclear fator kappa B (NF- $\kappa$  B)” e determinaram níveis de endotoxina e interleucina (IL-6 e -10) produzidas em simulação endodôntica com macrófagos. Amostras de 21 canais radiculares foram coletados com cone de papel, os canais radiculares contendo Macrófagos Raw 264.7 foram simulados e através do teste de Checkerboard e hibridização DNA-DNA foi usada para análise bacteriana, “Limulus Amebocyte Lysate” (LAL) foi usada para quantificar endotoxinas, p 38 MAPK e NF- $\kappa$ B foi determinado por análise “Western Blot”. IL-6 e -10 foi determinado pelo teste de ELISA. Bactérias e

endotoxinas foram detectadas em 100% dos canais das amostras, as bactérias mais frequentes foram *Parvimonas micra*, *Fusobacterium nucleatum ssp* e *Porphyromonas endodontalis*. O conteúdo endodôntico da infecção endodôntica primária indicou potente ativação inflamatória de TLR-4 determinada por p 38 MAPK e NF $\kappa$ B culminando no aumento de macrófagos e níveis de IL-6 ,IL-10 interferindo significativamente nos níveis de endotoxina.

### 2.1.3 MMP's nas infecções endodônticas

As MMP's fazem parte da família das enzimas metaloproteinases que assumem um papel importante na cicatrização de "feridas". As enzimas são proteínas que facilitam reações biológicas, mas que não são consumidas nem sofrem alterações quando tomam parte nas reações. Os substratos naturais para diferentes MMP's variam substancialmente, incluindo importantes proteínas da matriz extracelular como o colágeno e os proteoglicanos. As MMP's degradam estas proteínas fragmentando-as em pequenas partes, diferentes MMP's podem atuar em diversas partes do mesmo substrato. As matrizes metaloproteinase degradam as proteínas que compõem a matriz extracelular dos tecidos e requerem um íon metálico de zinco no centro ativo da enzima (Gibson et al., 2009).

Durante a cicatrização normal as MMP's são produzidas pelas células inflamatórias ativadas, principalmente neutrófilos e macrófagos, e células da ferida (células epiteliais, fibroblastos e células endoteliais vasculares) (Justulin et al., 2010).

Inicialmente, quando sintetizadas, as MMP's permanecem em forma latente (inativas ou pró-MMP). Elas são ativadas por outras proteases que recortam uma parte pequena da molécula. Isto abre o

centro ativo da molécula de MMP para ligar-se ao substrato da sua proteína. Outras células chamadas inibidores de tecido de metaloproteinase (TIMP's) podem inibir as MMP's ativadas e bloquear a ativação de MMP's (Justulin et al., 2010), formando complexos MMP's/TIMP's.

Alguns indivíduos podem apresentar uma predisposição genética que contribui para a persistência da condição de periodontite apical. MMP's estão associadas com níveis de inflamação e estão relacionadas com cárie, injúria pulpar e destruição do tecido periapical, apresentam papel principal na reabsorção óssea (Menezes et al., 2012).

A expressão de MMP-9 é significativamente elevada e apresentam correlação com bactérias gram-negativas em pacientes que apresentam periodontite apical sintomática quando comparado com pacientes assintomáticos (Ahmed et al., 2013).

Satoyoshi et al. (2001) detectaram a atividade gelanólítica de metaloproteinase e matriz metaloproteinase MMP-2, MMP-9 na cultura de odontoblastos em dentes bovinos. A atividade de MMP-2 coincide com o processo de desenvolvimento de odontoblastos. Através da análise da reação de transcriptase reversa polimerase concluiu-se a hipótese de MMP-2 participar do processo importante de maturação da matriz de dentina incluindo a fosforilação e mineralização dentinária e óssea.

Buzoglu et al. (2009) investigaram presença e níveis de metaloproteinase MMP-2 e MMP-9 em abscesso periapical através da coleta de exsudato inflamatório por aspiração, com auxílio de micropipeta, após abertura de dentes com abscesso periapical agudo ou crônico. As amostras foram analisadas pelo método de zimografia e observou-se níveis elevados de MMP-9 quando comparados com os níveis de MMP-2, entretanto MMP-2 não foi detectada em abscesso periapical crônico.

Santos et al. (2009) investigaram a presença de MMP's na dentina coronária e radicular através da análise de proteínas de dentina de dentes humanos extraídos pelo teste de Zimografia e Western

blotting. A presença de atividade gelanolítica tanto na dentina coronária quanto na radicular correspondente à MMP-2 e MMP-9, sendo MMP-2 mais evidente na matriz desmineralizada radicular, enquanto que MMP-8 esteve presente na coroa e raiz, evidenciando a contribuição das MMP's na degradação da união resina-dentina.

Carneiro et al. (2009) analisaram a presença de MMP-9 em lesão de dentes que apresentaram periodontite apical, através da coleta cirúrgica e análise de 10 lesões não epitelializadas e 10 lesões periapicais epitelializadas. PCR real time indicou a expressão de MMP-9 tanto em casos de epitelação e não epitelação de lesão sem diferença significativa.

Silva et al. (2010) investigaram MMP's em periodontite apical durante a fase de cicatrização periapical após o tratamento do canal radicular. Após a indução de lesão periapical, dentes caninos foram tratados com medicação de hidróxido de cálcio. Cento e oito dias após o tratamento, a presença de inflamação, foi examinada à partir da presença bacteriana e MMP-1, -2 e -9 no tecidos através de testes de histoquímica e imunohistoquímica. Altos níveis de MMP's foram encontrados em dentes que não foram tratados (grupo controle) e os dentes tratados com hidróxido de cálcio demonstraram uma diminuição na porcentagem de contaminação bacteriana.

Souza et al. (2014) avaliaram a expressão de indutor de matriz de metaloproteinase (EMMPRIN) e (MMP's -1, -2, -9) durante o desenvolvimento de lesão periapical em ratos. Foram induzidos lesão periapical nos primeiros molares inferiores durante os períodos de 7,14, 21 e em 42 dias. O tamanho da lesão periapical foi mensurada através de tomografia microcomputadorizada e a expressão de EMMPRIN e MMP's -1, -2 e -9 foram determinadas através de PCR real time. Os autores concluíram que houve correlação positiva entre a expressão de EMMPRIN e MMP's 1, -2 e -9 na fase ativa do desenvolvimento da lesão periapical.

#### 2.1.4 TIMP's nas infecções endodônticas

Inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMP's) são os maiores inibidores celulares de MMP's. São proteínas multifuncionais, possuem peso molecular em torno de 21 KDa e são secretadas na matriz extracelular, contudo podem ser encontradas próximas a superfície celular quando associadas com alguma outra proteína ligada à membrana (Carneiro et al., 2006). São expressas por muitos tipos celulares incluindo fibroblastos, queratinócitos, macrófagos, e células endoteliais (Carneiro, 2006).

As TIMP's interferem no crescimento e sobrevivência celular. Distúrbios de MMP's e TIMP's estão envolvidas na etiologia de algumas doenças como a artrite, enfisema pulmonar, arteriosclerose e periodontite, na qual a perda de matriz extracelular é a maior característica (Carneiro et al., 2006). Por esta razão existe um grande interesse no desenvolvimento de inibidores sintéticos de MMP's, os quais poderiam ser usados na terapia médica odontológica (Carneiro, 2006).

Letra et al. (2013) analisaram a associação de metaloproteinases (MMP's) e seus inibidores (TIMP's) nas infecções endodônticas. MMP-2, MMP-7, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 apresentam níveis significativamente altos em casos de abscesso apical crônico e periodontite apical assintomática. MMP's têm influência maior na destruição tecidual em casos de abscesso apical crônico e TIMP's são preferencialmente associadas aos casos de periodontites assintomáticas.

Hannas et al. (2006) em revisão de literatura visando mostrar o papel fisiológico e patológico da matriz extracelular, matriz metaloproteinase (MMP's) na remodelação e degradação nos processos em meio oral. Verificaram que a expressão de diferentes MMP's pode regular a condição patológica da inflamação e invasão tumoral. O equilíbrio entre a atividade de MMP's e tecido inibitório de

metaloproteinase (TIMP's) parecem controlar a extensão da remodelação da matriz extracelular. Verificaram ainda que, MMP's podem participar da organização do esmalte e matriz orgânica de dentina, evidenciando que MMP's podem estar envolvidas na etiologia da fluorose do esmalte e amelogênese imperfeita. Os autores concluíram que MMP's estão relacionadas com a progressão da cárie, inflamação da polpa e destruição do tecido apical e periodontal.

Verstappen e Von den Hoff (2006) analisaram sob revisão a função das TIMP's e o envolvimento nas doenças bucais. O controle de MMP na matriz extracelular é feito através das TIMP's que realizam função inibitória, o desequilíbrio entre MMP e TIMP provoca várias condições patológicas como câncer, artrite reumatóide, fenda palatina e periodontite. O papel das MMP's em patologias tem sido extensivamente descrito na literatura, a função das TIMP's está relacionada com muitas doenças, principalmente de cabeça e pescoço, sendo o diagnóstico e terapêutica avaliados correlacionados com TIMP.

Amalinei et al. (2010) revisaram o papel das MMP's e TIMP's em vários grupos de patologias: 1) destruição tecidual, metástase, artrite reumatóide, osteoartrite, úlceras, doença periodontal, doença neuroinflamatória; 2) fibroses, cirroses, arteroesclerose, esclerose múltipla; 3) Cardiomiopatia, epidermólise bolhosa e aneurisma. Recentemente foi descoberta uma nova função para MMP como angiogênese e apoptose, um mecanismo defensivo anti-tumor. Contudo deve haver na matriz celular um equilíbrio no nível de MMP controlada por TIMP que tem função terapêutica inibitória de MMP.

Oyarzún et al. (2010) analisaram o envolvimento de Membrana type I e matriz metaloproteinase (MTI-MMP) e TIMP nas doenças periodontais através da análise por Western-blot imunohistoquímica do tecido gengival de 10 pacientes saudáveis e 12 pacientes com periodontite. MTI-MMP e TIMP-2 foram significativamente mais elevadas em periodontite quando comparada com gengiva sadia, o



desequilíbrio entre estes mediadores moleculares sugere envolvimento com doença periodontal.

Matriz de metaloproteinases podem iniciar a destruição tecidual característica da periodontite crônica. MMP-3 e TIMP-1 apresentam associação e expressão significativamente elevada em periodontites crônicas (Letra et al., 2012).

Weitoff et al. (2014) estudaram a atividade de metaloproteinase e produção de hormônios esteróides sexuais após tratamento intra-articulares com glicocorticóide em sinovite em joelho. Dezoito pacientes com artrite reumatóide e sinovite foram avaliados e amostras de MMP-1/TIMP e MMP-3, testosterona, estradiol, sulfato dehydroepiandrosterona, hormônio folicular luteinizante foram coletados com injeção de 20 mg de triamcinolone hexacetonide 24 h, 48 h, 1 vez na semana e 2 vezes na semana. Níveis do complexo MMP1-TIMP e MMP-3 foram menores após o tratamento. Entretanto a redução do nível de MMP-3 indica a inibição inflamatória, mas provavelmente ocorre o processo de destruição da cartilagem dentro da articulação.

#### 2.1.5 Complexos TIMP's - MMP's

Complexo TIMP-MMP é essencial para arquitetura, fisiologia e biomecânica dos tecidos humanos, no geral todas as MMP's são inibidas por TIMP's uma vez que são ativadas, mas as gelatinases (MMP-2 e MMP-9) podem formar complexos com TIMP's quando as enzimas estão em forma latente. O complexo latente de MMP-2 com TIMP-2 serve para facilitar a ativação à superfície da célula por uma MMP ancorada à membrana (Brew et al., 2000).

Papadopoulos et al. (2005) avaliaram a significância clínica de matriz metaloproteinase na atividade do infarto do miocárdio.

Níveis de MMP-1, TIMP-1 e Complexo MMP-1/TIMP-1 foram coletadas através do sangue e mensuradas através do teste de ELISA em 24 pacientes entre 14 e 59 anos com infarto do miocárdio (IM). O complexo TIMP-MMP foi menor em 36% dos casos.

Hoikkala et al. (2006) investigaram os níveis de MMP-2, MMP-9 e TIMP-1 e complexo MMP-2/TIMP-2 no prognóstico com pacientes com câncer. Coletas de 59 pacientes: 30 carcinoma de células escamosas, 21 com adenocarcinoma e 8 com outros tipos histológicos foram analisados através dos testes de ELISA, revelando que os níveis do complexo MMP-2/TIMP-2 e TIMP-1 não tiveram relação correspondente aos tumores.

Vigetti et al. (2006) analisaram a relação entre o envelhecimento e risco de doença vascular através de testes “in vitro” com modelo de células do músculo liso aórtico (AoSMC) e seu comportamento em ordem de evolução durante o envelhecimento, teste de PCR real time, teste Elisa e zimografia revelaram que células jovens de AoSCM podem ser inibidas por TIMP-1 e TIMP-2; o papel do complexo MMP-2/TIMP-2 foi confirmado para regulação de AoSCM (células do músculo liso aórtico).

Pennanen et al. (2008) mensuraram o nível circulatório de gelatinase e inibidores de tecido no diagnóstico de tumores sólidos severos como o Linfoma. Foram monitorados 126 pacientes (31 com linfoma Hodiking e 95 Linfoma não-hodking) e 44 pacientes saudáveis (grupo controle). Amostras de sangue foram coletadas e os níveis de MMP-9, pró MMP-2, complexo MMP-2/TIMP-2, TIMP-1 e TIMP-2 foram analisadas através do teste de ELISA imunoenzimático. Níveis plasmáticos de pró MMP-2 e complexo MMP-2/TIMP-2 foram significativamente elevados em pacientes com Linfoma em comparação com o grupo controle, já os níveis de TIMP-2 foram significativamente menores em pacientes com Linfoma em comparação com o grupo controle.

Anne e Taina (2010) monitoraram a presença de MMP-2 e MMP-9 e seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 na degradação de matriz e metástase em vários tumores. Doze pacientes do sexo feminino com carcinoma cervical escamoso e vinte e sete pacientes também do sexo feminino saudáveis (grupo controle) tiveram amostras sanguíneas coletadas e analisadas pelo teste de ELISA. A média dos níveis circulatório de TIMP-2 e complexo MMP-2/TIMP-2 foram elevados no grupo controle em comparação com pacientes que apresentam tumor maligno, TIMP-2 apresentou níveis significativamente altos no grupo controle, os níveis de TIMP-2 e complexo MMP-2/TIMP-2 foram menores em pacientes com carcinoma cervical escamoso.

Atualmente, não existem relatos na literatura sobre a função do Complexo TIMP-MMP na área da Odontologia.

## **2.2 Medicação Intracanal *versus* citocinas Inflamatórias**

Bactérias e seus subprodutos são uma das principais causas da periodontite apical, por isso tem se dado ênfase à busca de um protocolo de desinfecção ideal (Rôças, Siqueira, 2010; Vera et al., 2012; Xavier et al., 2013; Rôças et al., 2014).

Apesar da instrumentação ter assumido grande importância na prática clínica, o uso de medicação intracanal tem sido comprovado para otimizar a desinfecção do canal radicular (Siqueira, de Uzeda 1996; Rôças, Siqueira, 2010; Xavier et al., 2013).

Entre as medicações utilizadas, o hidróxido de cálcio  $[Ca(OH)_2]$  é a medicação intracanal mais utilizada na endodontia (Siqueira, de Uzeda, 1996; Gomes et al., 2003; Vianna et al., 2007; Rôças, Siqueira 2010; Oliveira et al., 2012; Vera et al., 2012; Xavier et al., 2013).

Recentemente a clorexidina (CLX) apresentou grande potencial como medicação intracanal sozinha ou associada ao  $\text{Ca(OH)}_2$  em forma de pasta. (Gomes et al., 2003; Vianna et al., 2007; Tavares et al., 2013).

Diferentes pastas de  $\text{Ca(OH)}_2$  usando principalmente como veículo a solução salina, propilenoglicol e clorexidina gel 2%, têm sido usados por 7 ou 14 dias e têm se analisado a influência e eliminação de bactérias e endotoxinas que infectam o canal radicular e níveis de citocina inflamatória em periodontites apicais (Vianna et al., 2007; Rocas, Siqueira, 2010; Oliveira et al., 2012; Tavares et al., 2012; Vera et al., 2012; Xavier et al., 2013).

Khan et al. (2008) testaram a hipótese da desnaturação de IL-1alfa, TNF-alfa e CGRP devido a ação de  $\text{Ca(OH)}_2$ . IL-1alfa, TNF-alfa e CGRP foram incubadas com  $\text{Ca(OH)}_2$  durante 7 dias. Após o período de incubação, o pH das amostras foi neutralizado e a concentração dos mediadores foi mensurada por imunoenensaio ELISA (R&D System and SPIBio).  $\text{Ca (OH)}_2$  desnaturou IL-alfa, TNF-alfa, e CGRP em 50% dos casos.

Silva et al. (2008) determinaram o efeito do MTA (agregado trióxido mineral) sobre a expressão de citocina em tecido pulpar de ratos. Após exposição pulpar na presença de MTA foram dosados durante 10 e 20 dias a expressão de CCL5/RANTES, CCL2/MCP1, IL-1 alfa, IFN-gama, TNF-alfa e IL-6 através do teste de PCR real time. CCL2, IL-4 e IL-6 não foram detectados, enquanto que TNF-alfa foi expressado em níveis elevados após 20 dias de exposição, CCL5 e IL-1 em expressão de RNAm foi menor após 10 dias de tratamento e a produção de IFN foi menor em 20 dias, concluiu-se que o MTA tem baixa regulação nas citocinas inflamatórias CCL5, IL-1 alfa e IFN gama e pode ter efeito antiinflamatório.

Mohammadi e Dummer (2011) realizaram revisão de literatura sobre as propriedades e aplicações clínicas do hidróxido de

cálcio na endodontia e traumatologia incluindo a atividade antibacteriana, antifúngica e efeito sobre biofilme. No hidróxido de cálcio (pH:12,5-12,8), a dissociação do íon  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{OH}^-$  tem efeito vital na indução de deposição de tecido duro e propriedades antibacterianas. O efeito letal em células bacterianas é devido à desnaturação de proteína e danos ao DNA e membrana citoplasmática. A atividade antimicrobiana tem sido observada em menor efetividade em patógenos *Enterococcus faecalis* e *Candida albicans*. Hidróxido de Cálcio tem sido efetivo contra endotoxina, entretanto, há controvérsias quanto ao seu efeito sobre biofilme microbiano.

Tavares et al. (2012) avaliaram a influência do hidróxido de cálcio no fluído intersticial periapical em canais radiculares humanos. A expressão de RNAm e níveis de IFN-gama, TNF-alfa, IL-1 beta, IL-17A e IL-10 e MCP-1 foram analisadas pelo teste PCR real time imediatamente após a limpeza dos canais e após 15 dias. Níveis de IL-1 beta, IFN-gama e IL-10 foram significativamente menores nos dentes que receberam hidróxido de cálcio, demonstrando os benefícios do hidróxido de cálcio.

Tavares et al. (2013) avaliaram a influência da clorexidina usada como irrigante e medicação intracanal na expressão de citocinas periapicais em dentes que apresentavam lesão periapical. Níveis de citocina IFN-gama, TNF-alfa, IL-1beta, IL17-A, IL-10 e CCL2/MCP-1 (chemokine monocyte chemoattractant protein-1), foram analisadas pelo teste PCR real time após a limpeza dos canais e após 15 dias, a coleta foi feita através de cone de papel introduzido no canal radicular 2 mm além ápice. Expressão de RNAm para IL-1 beta, INF gama, IL-10 e CCL2/ MCP foram mais elevados após 15 dias sem medicação intracanal. Não houve diferença significativa entre expressão de RNAm e citocinas quando comparado com dentes que receberam medicação intracanal. A aplicação de CLX impediu o aumento de citocinas imunorreguladoras 15 dias após o início do tratamento.

### 3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo tem como objetivo avaliar a ação de diferentes medicações intracanal sobre biomarcadores inflamatórios presentes na lesão periapical :

- a) Estudar o perfil inflamatório das lesões periapicais de dentes com infecções endodônticas primárias através dos níveis das citocinas inflamatórias: IL-1beta, IL-6, TNF-alfa; correlacionando com a presença de sintomatologia clínica e destruição óssea periapical;
- b) Correlacionar os níveis das citocinas inflamatórias [IL-1 beta, IL-6 e TNF- alfa] e seus antagonistas [IL-RA, IL-6RA, sTNF-RI] presentes nos tecidos periapicais;
- c) Investigar níveis de MMP-1, MMP-2, MMP-9 presentes nos tecidos periapicais de dentes com infecção endodôntica primária e lesão periapical correlacionando com a presença de sintomatologia clínica e destruição óssea periapical;
- d) Correlacionar os níveis das MMP-1, MMP-2 e MMP-9 e seus antagonistas TIMP-1 e TIMP-2 presentes nos tecidos periapicais;
- e) Investigar os complexos MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-2 presentes nos tecidos periapicais correlacionando com a presença de sintomatologia clínica e destruição óssea periapical;

- f) Estudar a efetividade de diferentes medicações intracaneais no controle do processo inflamatório periapical, através do monitoramento dos níveis de citocinas inflamatórias [IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa], metaloproteinases [MMP-1, MMP-2 e MMP-9], inibidores de metaloproteinase [TIMP-1 e TIMP-2] e os complexos MMP's/TIMP's [MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-2] coletadas dos tecidos periapicais.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos-ICT/ UNESP (ANEXO B).

### **4.1 Seleção de pacientes**

Foram selecionados 20 pacientes / 20 dentes encaminhados para a Clínica de Endodontia do Departamento de Odontologia Restauradora da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (UNESP) com necessidade de tratamento endodôntico em dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Foi realizada anamnese, selecionando pacientes com condições favoráveis de saúde local e sistêmica. Os pacientes assinaram um termo de consentimento livre esclarecido, aceitando fazer parte do estudo e também em cumprir as condições estabelecidas para a pesquisa.

### **4.2 Seleção dos casos**

Foram selecionados 20 pacientes com dentes que apresentavam necessidade de intervenção endodôntica por infecção endodôntica primária e presença de lesão periapical. Os pacientes foram selecionados seguindo critérios de inclusão e exclusão pré-estabelecidos.



Foram excluídos pacientes que apresentassem qualquer alteração sistêmica como diabetes e hipertensão para não influenciar no processo de resposta inflamatória do hospedeiro à infecção a ser analisada; pacientes que fizeram utilização de antifúngicos e antibióticos ( $\leq 3$  meses).

#### **4.3 Etapas Clínicas**

Foram selecionados 20 pacientes / 20 dentes unirradiculares com necrose pulpar e presença de lesão periapical. Foram excluídos da pesquisa dentes com dor espontânea, dentes com raízes curvas impossibilitando a inserção do cone de papel por toda a extensão do canal radicular, dentes calcificados ou canais atrésicos que impossibilitam a coleta com cone de papel, dentes com doença periodontal, presença de fratura radicular, exposição da câmara pulpar ao meio bucal, impossibilidade de isolamento absoluto e de inserção do cone de papel no canal radicular em seu comprimento de trabalho. Todos os dentes que apresentaram qualquer tipo de agudização durante o período de 14 dias de medicação foram excluídos da pesquisa (nenhum paciente no presente estudo apresentou agudização no período de 14 dias) O diagnóstico de necrose pulpar foi realizado através de teste de sensibilidade ao frio (Figura 1) utilizando Endofrost Roeko (Langenau, Baden-Württemberg, Alemanha).

A presença de lesão periapical foi detectada através de radiografia convencional. O tamanho da lesão foi, medido no seu maior diâmetro no sentido vertical ou horizontal com auxílio de régua milimetrada. Dados clínicos quanto à presença de sintomatologia clínica provocada (presença de dor prévia, dor à palpação e dor à percussão) foram documentados.

Este estudo foi realizado através de coletas realizadas pelo grupo científico do laboratório de odontologia restauradora do Instituto de Ciência e Tecnologia/UNESP na Faculdade de Odontologia do Campus de São José dos Campos e as imagens utilizadas foram cedidas pela aluna de doutorado Nádia Souza Ferreira, Flávia Goulart da Rosa Cardoso e pelo docente do curso de pós-graduação em Odontologia Restauradora na especialidade de endodontia Prof Frederico Canato Martinho.

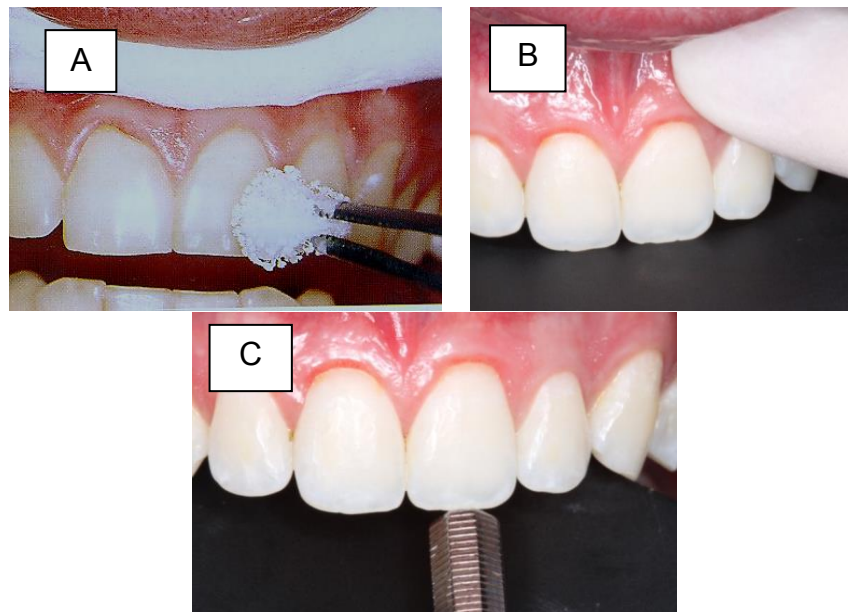


Figura 1 - Testes clínicos. A) Teste de sensibilidade ao frio; B) Palpação; C) Percussão vertical.

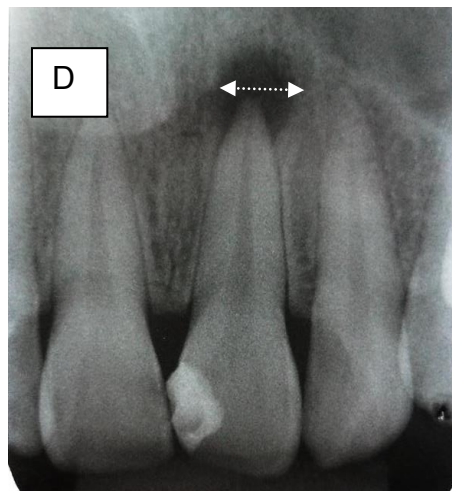


Figura 2 - Exame radiográfico e medição do tamanho da lesão periapical.

#### 4.3.1 Tratamento endodôntico

Todos os instrumentos utilizados nesta pesquisa foram submetidos à esterilização por radiação gama com cobalto 60 (dose 20 KGy por 6 h) pela Embrarad (Empresa Brasileira de Radiação, Cotia, SP, Brasil) e todos os passos subseqüentes foram realizados de forma asséptica. Inicialmente, os pacientes foram submetidos à anestesia, isolamento absoluto seguido de profilaxia com pasta profilática (Vigodent S/A Indústria e Comércio, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e escova de Robinson (Microdont-Micro Usinagem de Precisão Ltda, São Paulo, SP, Brasil). Após os dentes foram lavados com solução salina fisiológica (Laboratório Sanobiol, Pouso Alegre, MG, Brasil) e um vedamento da interface coroa/ lençol foi realizado utilizando uma barreira física de resina fotopolimerizável (Top Dam-FGK Dentaire-Labordental). Em seguida, foi realizada desinfecção do campo operatório utilizando swabs (Jiangsu Medical Materials Co. Ltd, Jiangsu, China) estéreis umedecidos em água oxigenada 30 volumes (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil) seguido de hipoclorito de sódio 5,25% (Byofórmula, São José dos Campos, SP, Brasil). Foi realizada abertura coronária com auxílio de brocas acionadas em alta rotação, sob refrigeração com solução salina fisiológica apirogênica (Figura 3). Após foi realizada neutralização do conteúdo séptico do canal radicular.

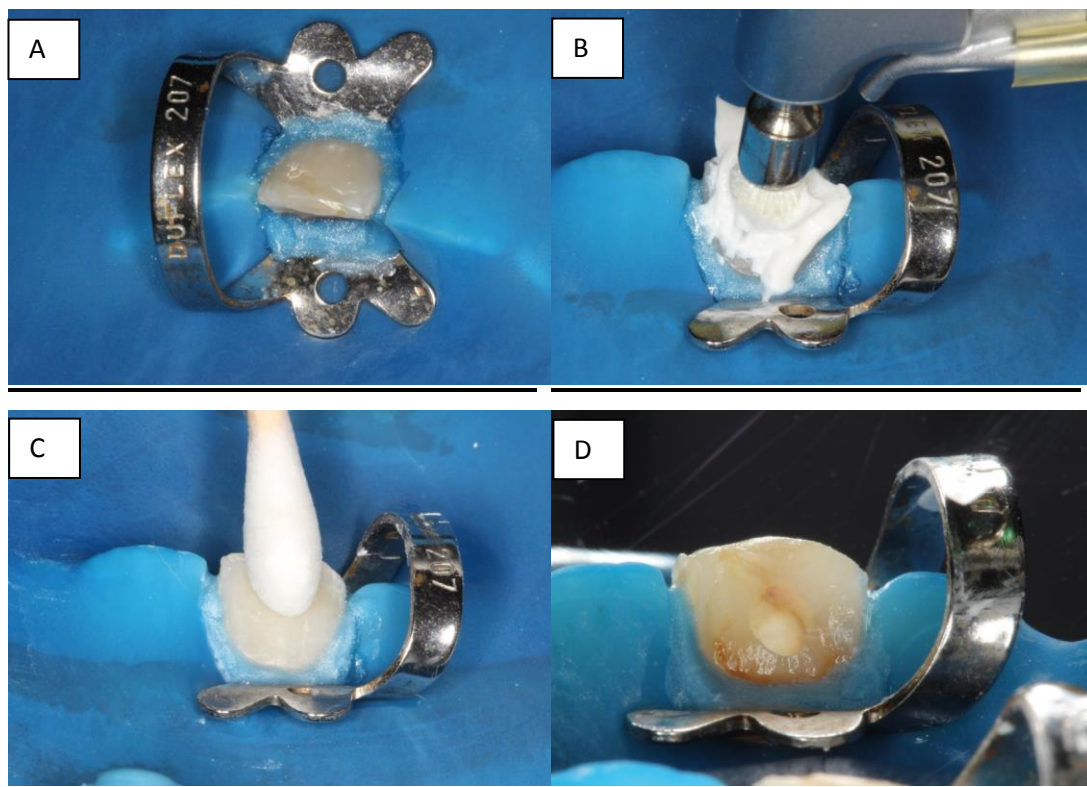


Figura 3 - Abertura coronária. A) isolamento absoluto; B) profilaxia; C) desinfecção do campo operatório; D) abertura coronária.

#### 4.3.2 Preparo Biomecânico e Medicação intracanal

Foi realizado utilizando hipoclorito de sódio 2,5% como solução irrigadora. A instrumentação dos canais radiculares foi realizada por um único profissional. O comprimento de trabalho (CT) foi determinado radiograficamente e com o uso do localizador apical (Root Zx II- JMorita do Brasil) (Figura 4). O canal radicular foi instrumentado em toda sua extensão, considerando, o CT ao “ponto 0” determinado no localizador apical.

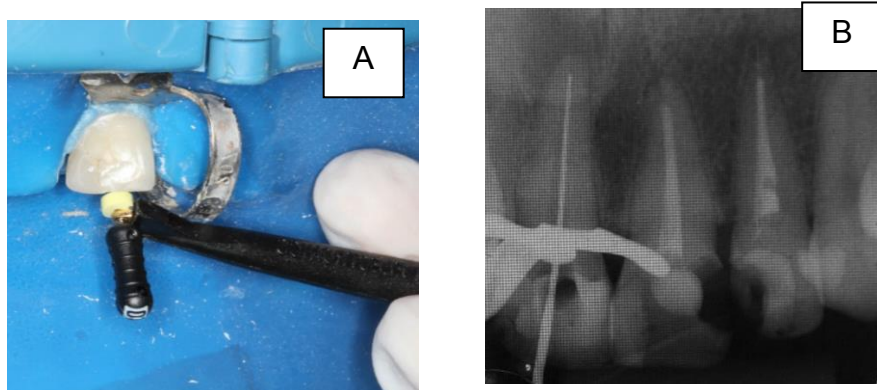


Figura 4 - Realização da odontometria. A) uso do localizador apical; B) confirmação radiográfica.

O preparo apical foi realizado com a utilização do Kit 701 e 702 do Sistema Rotatório Mtwo (RomiBras LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) (Figura 5). Para cada dente, foi determinado o diâmetro anatômico inicial, e em seguida os canais foram instrumentados a partir do diâmetro anatômico inicial. Todos os dentes foram instrumentados até no mínimo a lima #40.04 da sequência do sistema Mtwo. A cada troca de lima foi utilizada lima K#15 ultrapassando 1 mm além do ápice, sendo o instrumento apical foraminal (IAF).

Durante todo o preparo, o canal foi irrigado com 5 ml de hipoclorito de sódio 2,5% a cada troca de instrumento. Após, todos os dentes foram irrigados com 10 mL de solução salina fisiológica estéril e aprotogênica. Ao final do preparo apical, foi utilizada uma lima tipo K#30 para a realização da ampliação foraminal 2 mm além ápice, a qual permitiu a inserção do cone de papel 2 mm além ápice para CIF1 - Coleta Inicial do Fluido Intersticial da lesão Periapical (Figura 6).

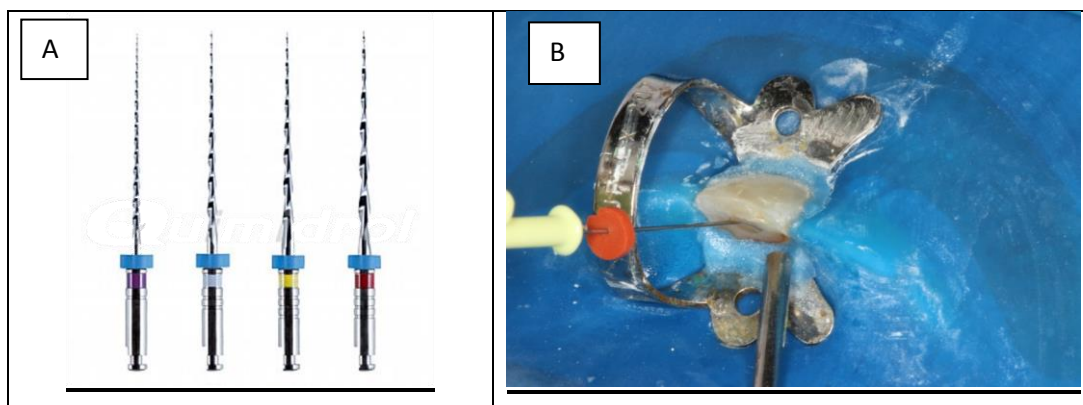


Figura 5 - Preparo Biomecânico. A) Sistema Rotatório Mtwo; B) Irrigação.

Logo após a instrumentação, os canais foram secos utilizando cones de papel absorventes estéreis (Dentsply Maillfer Ind. E Com. Ltda, Petrópolis, RJ, Brasil). Para a coleta inicial, um cone de papel estéril / apirogênico foi introduzido 2 mm além do comprimento do dente, em direção ao tecido periapical, e deixado por 60 s, em seguida, armazenado em eppendorf contendo 2 mL de solução tampão (PBS – phosphate buffered saline), 0,1% de solução Tween 20 e 1 µl de coquetel de inibidores de protease (Sigma-Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA). Um total de 3 cones de papel foram utilizados para coleta de cada amostra. As amostras foram armazenadas a -20 °C para posterior dosagem dos biomarcadores inflamatórios através da técnica de ELISA R&D Systems (Minneapolis, Minnesota, U.S.A) (Figura 6).

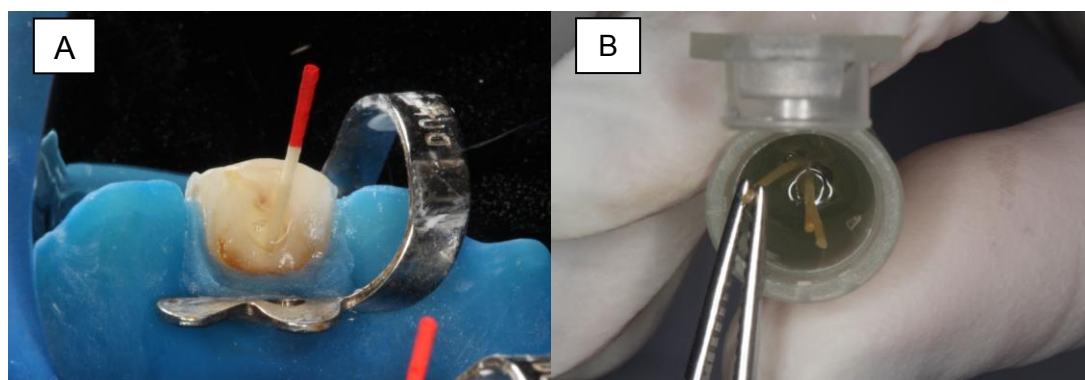


Figura 6 - Coleta do conteúdo do canal radicular. A) Cone de papel no interior do canal radicular; B) Três cones de papel armazenados em PBS.

Após o preparo biomecânico e coleta dos canais radiculares, os dentes foram divididos aleatoriamente em 2 grupos de acordo com a medicação intracanal à ser utilizada:

Quadro1- Divisão dos Grupos de acordo com a medicação intracanal testada

| Grupos                        | N  | Solução Irrigadora | Medicação Intracanal             |
|-------------------------------|----|--------------------|----------------------------------|
| <b>Ca(OH)<sub>2</sub>+SSL</b> | 10 | NaOCl 2,5%         | Ca(OH) <sub>2</sub> + sol Salina |
| <b>Ca(OH)<sub>2</sub>+CLX</b> | 10 | NaOCl 2,5%         | Ca(OH) <sub>2</sub> + CLX gel 2% |

A associação das medicações foi realizada na proporção 1:1 em volume e levada ao canal radicular com o auxílio de limas e lentulo (Dentsply/Maillefer Instruments SA, Ballaigues, Switzerland) até completo preenchimento do canal. Em seguida, os dentes foram selados inserindo uma camada de coltosol (Vigodent, Rio de Janeiro, RJ, Brasil)



seguido de restauração provisória com cimento de ionômero de vidro (S.S. White Artigos Dentários Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) (Figura7).

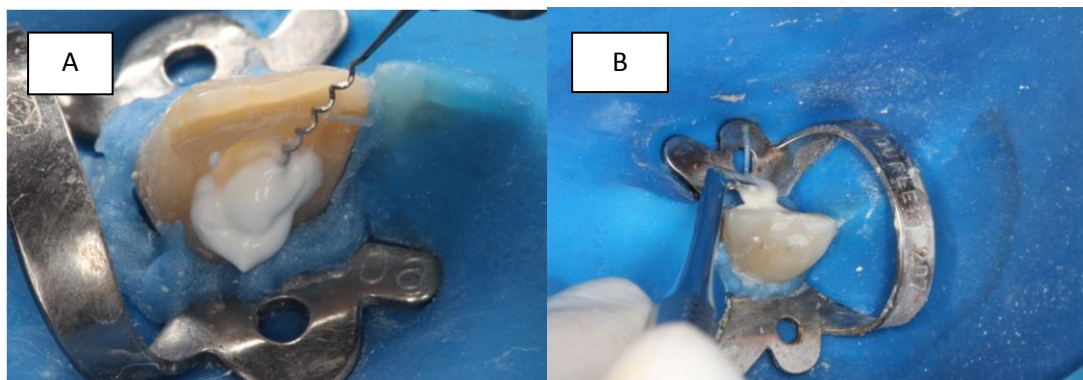


Figura 7 - Inserção de Medicação intracanal e selamento coronário. A) Preenchimento do canal radicular com medicação intracanal com auxílio de lentulo; B) Selamento coronário com cimento de ionômero de vidro.

Transcorrido o período de 14 dias, o paciente foi novamente submetido à anestesia, isolamento e antisepsia do campo operatório (semelhante à primeira sessão de atendimento), remoção do selamento coronário, remoção da MIC com lima Kerr #30 e irrigação com Sol. Salina nos casos em que a CLX gel 2% foi utilizada como medicação intracanal, (Consepsis V – Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, USA). E em seguida, foi realizada a **CFF2- Coleta Final do Fluido intersticial da lesão periapical**, de forma semelhante à Coleta Inicial (CIF1).

Após a Coleta Final, foi utilizado EDTA durante 3min no interior do canal radicular e para sua remoção foi utilizado Sol. Salina, os casos que não apresentaram dor e estavam secos, foram obturados com cones de guta-percha (Dentsply Maillefer Ind. Com. Ltda. Petrópolis, RJ, Brasil) e cimento obturador AH Plus (Dentsply DeTrey GmbH, Konstanz). Os dentes foram radiografados para comprovação de adequado preenchimento em lateralidade da obturação do canal radicular.

## 4.4 Etapas Laboratoriais

### 4.4.1 Quantificação de biomarcadores inflamatórios e seus antagonistas

Posteriormente todas as coletas, foram armazenadas em solução tampão contendo 0,1% de solução Tween 20 e 1 µL de coquetel de inibidores de proteases (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), foram agitados por 30 min, centrifugados a 10000 rpm por 5 min, e divididas em alíquotas para a quantificação das citocinas e metaloproteinases por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA-enzymelinked immunisorbent assay). Os biomarcadores avaliados foram a IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa; MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2 através do uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Todos os reagentes foram levados à temperatura ambiente e a solução diluente foi acionada em cada poço contendo o anticorpo monoclonal específico contra a citocina pró-inflamatória ou metaloproteinase a ser quantificada. Os padrões e amostras foram adicionados aos poços, permitindo a ligação da citocina ao anticorpo imobilizado. Após período de incubação recomendado pelo fabricante, os poços foram lavados com solução tampão e um segundo anticorpo policlonal específico contra a citocina, e conjugado a fosfatase alcalina, foi adicionado. As placas foram novamente incubadas e lavadas. A seguir, foi adicionado em todos os poços o substrato (NaDPH), que inicia a reação colorimétrica catalisada pela fosfatase alcalina, seguido de incubação e adição da solução amplificadora da reação colorimétrica. Após novo período de incubação, a solução de parada foi adicionada. O desenvolvimento e a intensidade da cor foram quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA. A curva padrão foi feita com os padrões fornecidos no kit pelo fabricante.

#### 4.4.2 Análise da produção de biomarcadores inflamatórios e seus antagonistas - Teste de ELISA

Para a análise da quantidade dos biomarcadores inflamatórios: citocinas inflamatórias (IL-1beta, IL-6, TNF-alfa); metaloproteinases (MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-2) e antagonistas (IL1-RA, IL6-RA, sTNF-RI), presentes nos tecidos periapicais, foi utilizado teste imunoenzimático (ELISA), sempre em duplicata. Para isso, foram utilizados anticorpos de captura das respectivas citocinas marcados com biotina. A reação foi revelada com solução contendo substrato cromogênico e peróxido de hidrogênio e as densidades ópticas (DO) foram lidas em leitor de microplacas com comprimento de onda de 405 nm.

No princípio do teste de ELISA (figura 8), utilizada neste estudo, o anticorpo de um antígeno particular é, inicialmente, adsorvido no poço da placa. Depois, o antígeno é adicionado e se liga ao anticorpo (AC). Em seguida, um segundo e diferente anticorpo ligado à enzima é adicionado (anticorpo biotinilado). Na sequência, é adicionada estreptovidina conjugada a peroxidase, na qual a estreptovidina irá se ligar na biotina do AC secundário e a porção peroxidase ficará exposta para reagir com o substrato cromogênico. É então adicionado o substrato cromogênico [(solução A ( $H_2O_2$ ) + Solução B (Tetrametilbenzodina – TMB)], no qual, a  $H_2O_2$  será quebrada pela peroxidase em  $H_2O + \frac{1}{2} O_2$ . Por sua vez, o  $O_2$  irá agir sobre o TMB, deixando de incolor para azul. Finalmente é adicionada uma solução de parada “stop solution” (2 N  $H_2SO_4$ ), tornando a reação amarela, e permitindo a mensuração da quantidade de antígeno presente na amostra, de acordo com a intensidade da cor amarela lida em espectrofotômetro, numa densidade óptica (DO) de 450 nm.

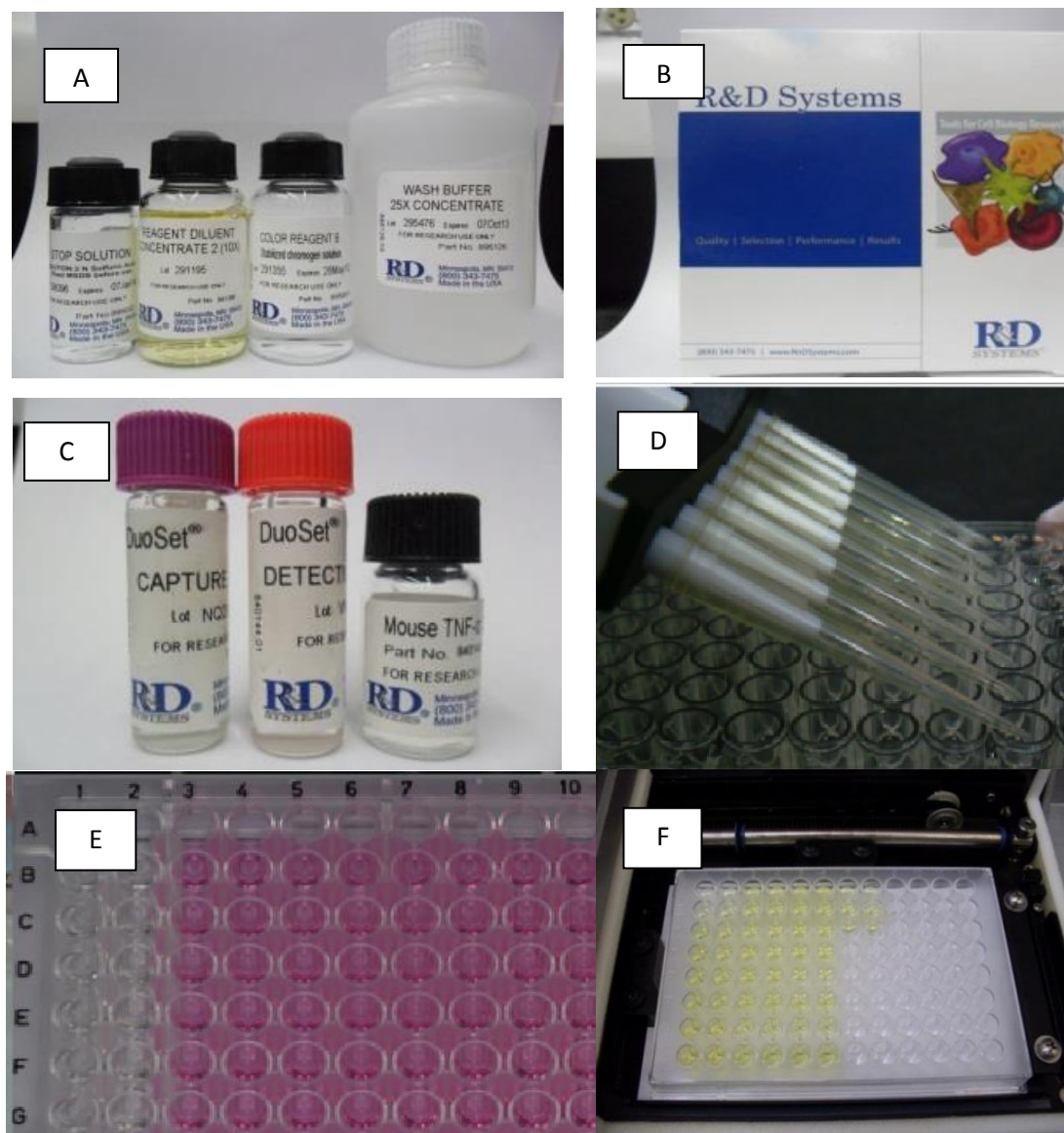


Figura 8 - Kit Duo-set ELISA. A) Kit para reação enzimática nas placas; B) Kit DuoSet C) Anticorpo de detecção e anticorpo de captura; D) Distribuição da placa com padrões e amostras; E) Incubação da placa com padrões e amostras; F) Leitura das placas de poços após reação enzimática.

#### 4.5 Análise Estatística

Os dados coletados de cada paciente foram duplamente digitados, e posteriormente analisados com o software STATA 12.0 (StataCorp., College Station, TX, USA). Inicialmente, a análise descritiva seguida pelo teste de Bartlett foram conduzidos para determinar a distribuição dos dados. Os dados que não apresentaram uma distribuição normal foram, então, devidamente, transformados em log 10. Após, a análise de variância de um fator foi conduzida para determinar a concentração dos marcadores imunológicos (MMP, TIMP, MMP/TIMP, citocinas inflamatórias e respectivos receptores) de acordo com os sintomas clínicos e alteração radiográfica. Adicionalmente, a linearidade e a associação entre os marcadores imunológicos e o tamanho de área radiolúcida (mm) foram testadas com a correlação linear de Pearson e com a regressão linear simples, respectivamente. As mesmas análises foram conduzidas para explorar a possível regulação na expressão de cada marcador imunológico. Teste t-pareado foi realizado para determinar a comparação entre a concentração dos marcadores imunológicos encontrada antes e após o tratamento endodôntico. Para todas as análises mencionadas, o valor de  $p < 0.05$  foi considerado significativo.

## 5 RESULTADOS

A tabela 1 apresenta os níveis de marcadores biológicos encontrados nos 20 dentes com infecções endodônticas primárias e presença de lesão periapical.

Tabela 1 - Níveis de marcadores biológicos encontrados nos dentes com infecções endodônticas primárias e presença de lesão periapical

| <b>MMP's e TIMPS</b> | <b>Valores médios<br/>(pg/ml)</b> | <b>Citocinas<br/>antagonistas</b> | <b>Valores médios<br/>(pg/ml)</b> |
|----------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| <b>MMP1</b>          | 789,43 ± 342,83                   | <b>IL1-beta</b>                   | 374,67 ± 253,55                   |
| <b>MMP2</b>          | 894,00 ± 591,62                   | <b>TNF-alfa</b>                   | 256,22 ± 103,04                   |
| <b>MMP9</b>          | 968,35 ± 579,30                   | <b>IL-6</b>                       | 239,02 ± 24,58                    |
| <b>TIMP-1</b>        | 481,74 ± 200,89                   | <b>IL1-RA</b>                     | 96,49 ± 22,26                     |
| <b>TIMP2</b>         | 206,46 ± 86,09                    | <b>STNF-R1</b>                    | 43,60 ± 15,29                     |
| <b>MMP1/TIMP1</b>    | 244,24 ± 173,73                   | <b>IL6-RA</b>                     | 137,25 ± 20,95                    |
| <b>MMP1/IMP2</b>     | 230,87 ± 150,97                   |                                   |                                   |
| <b>MMP2/TIMP1</b>    | 224,41 ± 156,91                   |                                   |                                   |
| <b>MMP2/TIMP2</b>    | 394,64 ± 266,29                   |                                   |                                   |
| <b>MMP9/TIMP1</b>    | 546,56 ± 388,04                   |                                   |                                   |
| <b>MMP9/TIMP2</b>    | 383,41 ± 234,20                   |                                   |                                   |

## 5.1 Citocinas inflamatórias e seus antagonistas

### 5.1.1 Níveis de citocinas (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa)

As citocinas IL-1 beta, TNF-alfa e IL-6 foram detectados em 100% das amostras (20/20) coletadas do fluído intersticial periapical nos respectivos níveis médios - IL-1 beta ( $374,67 \pm 253,55$  pg/mL), TNF-alfa ( $256,228 \pm 103,04$  pg/mL,) e IL-6 ( $239,02 \pm 24,58$  pg/mL,) (Tabela 1). Correlação positiva foi encontrada entre IL-1beta e TNF-alfa ( $p < 0,001$ ,  $r = 0,818$ ).

### 5.1.2 Citocinas inflamatórias (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa) versus sinais/sintomas clínicos e radiográficos

Teste de Bartlett/One-way ANOVA indicaram correlação entre níveis mais elevados de IL-1 beta e TNF-alfa, detectados nas áreas de maior destruição óssea periapical (lesões periapicais  $> 7$  mm) quando comparadas as áreas de menor destruição (lesões periapicais  $\leq 7$ mm) IL-1 beta ( $615,42 \pm 73,34$  pg/mL,  $\times 133,93 \pm 41,22$  pg/mL,, respectivamente) e TNF-alfa ( $330,73 \pm 22,08$  pg/mL,  $\times 181,73 \pm 97,96$  pg/mL, respectivamente) (Tabela 2).

Tabela 2 – Valores dos biomarcadores inflamatórios (IL-1 beta IL-6, TNF-alfa, IL-1RA, sTNF-R1, IL-6RA) de acordo com o critério radiográfico (tamanho da lesão periapical) e sintomatologia

|                 | Tamanho da lesão (mm) |              | Sintomatologia |               |               |
|-----------------|-----------------------|--------------|----------------|---------------|---------------|
|                 | ≤ 7                   | >7           | I              | A             | P             |
| <b>IL-1beta</b> | 133,93±41,22          | 615,42±73,34 | <0,0001        | 325,94±238,79 | 447,78±273,35 |
| <b>IL-1RA</b>   | 88,77±14,23           | 104,21±26,67 | 0,123          | 103,78±22,27  | 85,56±18,39   |
| <b>TNF-alfa</b> | 181,73±97,96          | 330,73±22,08 | <0,0001        | 247,60±106,01 | 269,17±104,12 |
| <b>STNF-R1</b>  | 36,95±8,20            | 30,25±5,53   | 0,342          | 45,20±16,25   | 41,21±14,45   |
| <b>IL-6</b>     | 233,07±16,95          | 244,97±30,16 | 0,291          | 232,80±20,76  | 248,36±28,22  |
| <b>IL-6RA</b>   | 134,01±20,09          | 140,50±22,36 | 0,503          | 137,10±15,30  | 152,47±19,57  |



Tabela 3 – Valores dos biomarcadores inflamatórios (IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa, IL-1RA, sTNF-R1, IL-6RA) de acordo com a presença ou ausência de sintomatologia :

|                 | Dor prévia        |                   |       | Dor à palpação    |                   |       | Dor à Percussão   |                   |       |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|-------|-------------------|-------------------|-------|
|                 | Ausência          | Presença          | “p”   | Ausência          | Presença          | “p”   | Ausência          | Presença          | “p”   |
| <b>IL-1beta</b> | 393,81<br>±244,56 | 317,28<br>±300,92 | 0,573 | 338,29<br>±252,38 | 520,23<br>±231,06 | 0,207 | 355,88<br>±237,29 | 440,07<br>±318,08 | 0,521 |
| <b>IL-1RA</b>   | 100,74<br>±21,70  | 83,76<br>±20,85   | 0,143 | 98,07<br>±23,25   | 90,19<br>±19,22   | 0,541 | 99,38<br>±22,16   | 87,82<br>±22,57   | 0,328 |
| <b>TNF-alfa</b> | 277,66<br>±88,02  | 191,91<br>±128,17 | 0,108 | 239,88<br>±109,32 | 321,60<br>±19,13  | 0,161 | 261,21<br>±98,35  | 241,27<br>±127,31 | 0,718 |
| <b>STNF-R1</b>  | 42,68<br>±16,83   | 46,39<br>±10,31   | 0,65  | 44,35<br>±14,90   | 40,61<br>±18,86   | 0,673 | 44,80<br>±16,69   | 40,00<br>±10,68   | 0,558 |
| <b>IL-6</b>     | 240,99<br>±27,73  | 213,11<br>±11,00  | 0,549 | 237,10<br>±25,56  | 246,70<br>±21,51  | 0,499 | 235,78<br>±21,80  | 248,72<br>±32,40  | 0,321 |
| <b>IL-6RA</b>   | 133,48<br>±20,27  | 148,59<br>±20,86  | 0,168 | 135,23<br>±21,99  | 145,32<br>±15,97  | 0,403 | 140,07<br>±16,33  | 158,76<br>±19,50  | 0,536 |

### 5.1.3 Níveis dos receptores antagonistas (IL- 1RA, IL-6RA, sTNF-R1)

Receptores antagonistas IL-1RA, IL-6RA e sTNFR1 foram detectados em 100% das amostras coletadas (20/20) das lesões periapicais nos respectivos valores médios: IL-1 RA (96,49  $\pm$  22,26pg/mL), sTNFR1 (43,60  $\pm$  15,29 pg/mL) e IL-6 RA (137,25  $\pm$  20,95pg/mL) (Tabela 1).

### 5.1.4 Inter-relação citocinas inflamatórias (IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa) e antagonistas IL-1 RA, IL-6 RA, sTNF-R1)

Teste de correlação de Pearson indicou correlação negativa entre sTNF-R1 e TNF-alfa ( $p < 0,05$ ;  $r = -0,578$ ).

Tabela 4 - Regressão linear simples entre citocinas inflamatórias (IL-1 beta, IL-6, TNF-alfa) e receptores antagonistas (IL-1RA, IL-6RA, sTNF-R1) detectadas nas lesões periapicais de dentes com infecção endodôntica primária

| <b>IL-1beta</b> |               |                      |                  |
|-----------------|---------------|----------------------|------------------|
|                 | <b>B</b>      | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>P</b>         |
| <b>IL-1RA</b>   | 4,82          | 0,18                 | 0,062            |
| <b>STNF-R1</b>  | -3,90         | 0,33                 | 0,059            |
| <b>IL-6RA</b>   | 2,48          | 0,04                 | 0,385            |
| <b>TNF-alfa</b> |               |                      |                  |
|                 | <b>B</b>      | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>P</b>         |
| <b>IL-1RA</b>   | 2,35          | 0,26                 | 0,022            |
| <b>STNF-R1</b>  | <b>-13,92</b> | <b>0,70</b>          | <b>&lt;0,001</b> |
| <b>IL-6RA</b>   | 0,64          | 0,02                 | 0,584            |
| <b>IL-6</b>     |               |                      |                  |
|                 | <b>B</b>      | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>P</b>         |
| <b>IL-1RA</b>   | -0,42         | 0,14                 | 0,102            |
| <b>STNF-R1</b>  | -0,21         | 0,02                 | 0,588            |
| <b>IL-6RA</b>   | 0,38          | 0,11                 | 0,157            |

## 5.2 MMP's, TIMP's e Complexos MMP's/TIMP's (MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2)

### 5.2.1 Níveis de metaloproteínases MMP-1, MMP-2 e MMP-9

Metaloproteínases foram detectadas em 100% das amostras coletadas. Níveis mais elevados de MMP-9 ( $968,35 \pm 342$  pg/mL), seguida de MMP-2 ( $894 \pm 591,62$  pg/mL) e MMP-1 ( $789,43 \pm 342,83$  pg/mL) foram detectados nas lesões periapicais.

Correlação positiva foi encontrada entre: MMP-1 e MMP-2 ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,976$ ), MMP-9 e MMP-1 ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,945$ ) e MMP-9 e MMP-2 ( $p < 0,001$ ;  $r = 0,962$ ), respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 – Teste de correlação de Pearson entre MMP-1, MMP-2 e MMP-9 detectadas nas lesões periapicais de dentes com infecção endodôntica primária

|              | <b>MMP-1</b> | <b>MMP-2</b> | <b>MMP-9</b> | <b>Total MMP</b> |
|--------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| <b>MMP-1</b> | -            | -            | -            | -                |
| <b>MMP-2</b> | 0,976**      | -            | -            | -                |
| <b>MMP-9</b> | 0,945**      | 0,962**      | -            | -                |

### 5.2.2 MMP's versus sinais/ sintomas clínicos e radiográficos

Teste de Bartlett/ One-way ANOVA indicaram associação entre níveis mais elevados de MMP-9 na presença de sintomatologia ( $1275.57 \pm 722.35$ pg/mL) quando comparado aos casos assintomáticos

( $763,53 \pm 364,97$  pg/mL) ( $p = 0,049$ ) (Tabela 7). Particularmente, níveis mais elevados de MMP-9 ( $1530,65 \pm 533,58$  pg/mL) foram encontrados nos casos com dor à palpação quando comparados à sua ausência ( $2319,05 \pm 1390,27$  pg/mL) ( $p = 0,043$ ) (Tabela 7).

Associação positiva (Correlação de Pearson) foi encontrada entre elevados níveis de MMP-1 ( $1041,88 \pm 221,33$  pg/mL  $\times$   $430,57 \pm 260,46$  pg/mL,  $p < 0,001$ ), MMP-9 ( $1389,66 \pm 505,59$  pg/mL  $\times$   $547,04 \pm 241,68$ ,  $p < 0,001$ ) e maior destruição óssea periapical ( $> 7$ mm) versus menor destruição óssea periapical ( $\leq 7$ mm), respectivamente (Tabela 7 e Figura 9 ).

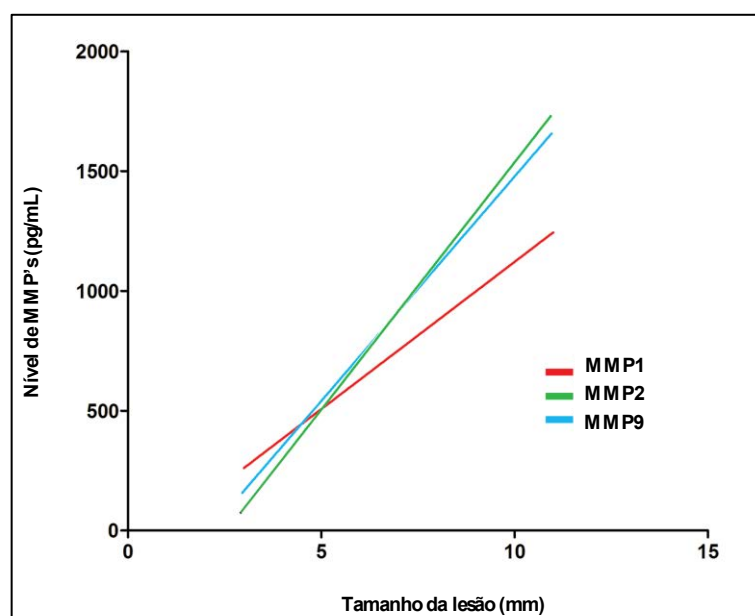


Figura 9 - Correlação de Pearson encontrada entre níveis de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 e tamanho da lesão periapical. (MMP-1,  $r = 0,959$ ,  $p < 0,001$ ), (MMP-2,  $r = 0,933$ ,  $p < 0,001$ ) e (MMP-9,  $r = 0,865$ ,  $p < 0,001$ ).

### 5.2.3 Níveis de inibidores de MMP's (TIMP's)

TIMP's foram detectadas em todas as coletas analisadas (20/20). Níveis mais elevados de TIMP-1 ( $481,79 \pm 200,89$  pg/mL) foram encontrados em relação à TIMP-2 ( $206,45 \pm 86,09$  pg/mL) (Tabela 1).

### 5.2.4 Inter-relação MMP's e TIMP's

Teste correlação de Pearson indicou correlação entre MMP-1 x TIMP-1 ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,460$ ) e MMP-1 x TIMP-2 ( $p < 0,05$ ;  $r = 0,461$ ), respectivamente (Figura 10).

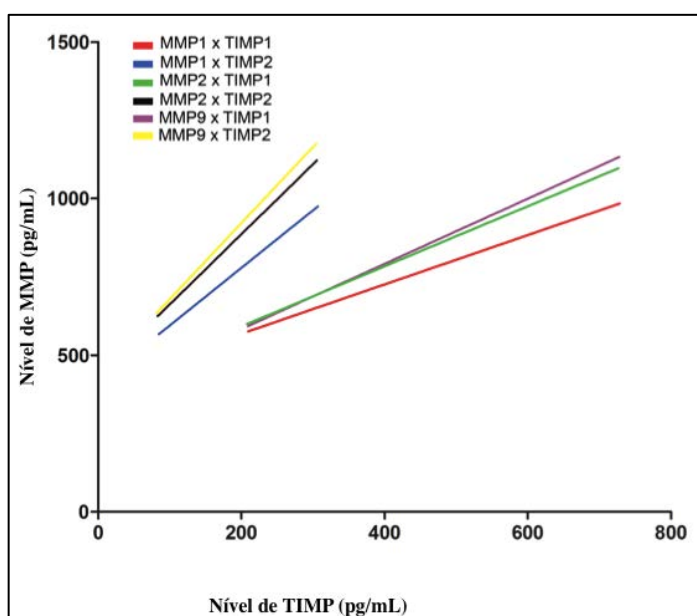


Figura 10 - Correlação de Pearson entre níveis de metaloproteinases (MMP) e inibidores de MMP (TIMP) – MMP-1 x TIMP-1 ( $p < 0,05$ ,  $r = 0,460$ ) e MMP-1 x TIMP-2 ( $p < 0,05$ ,  $r=0,461$ ).

Tabela 6 – Regressão linear simples entre MMP e TIMP's detectadas nas lesões de dentes com infecção endodôntica primária

|               | <b>MMP-1</b> |                      |          |
|---------------|--------------|----------------------|----------|
|               | <b>B</b>     | <b>R<sup>2</sup></b> | <b>P</b> |
| <b>MMP-2</b>  | 0,56         | 0,95                 | <0,001   |
| <b>MMP-9</b>  | 0,57         | 0,88                 | <0,001   |
| <b>TIMP-1</b> | 0,78         | 0,21                 | <0,05    |
| <b>TIMP-2</b> | 1,83         | 0,23                 | <0,05    |

#### 5.2.5 Níveis dos Complexos MMP's/ TIMP's

Todos os complexos investigados (MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-2) foram detectados em 20/20 amostras coletadas do fluído intersticial periapical. Níveis mais elevados dos complexos de MMP-2/TIMP-2 ( $394,54 \pm 266,29$  pg/mL) e MMP-9/TIMP-1 ( $546,56 \pm 388,04$  pg/mL) foram encontrados nas lesões periapicais comparados aos complexos MMP-1/TIMP-1 ( $244,24 \pm 173,73$  pg/mL), MMP-1/TIMP-2 ( $230,87 \pm 150,97$  pg/mL), MMP-2/TIMP-1 ( $224,41 \pm 156,91$  pg/mL) e MMP-9/TIMP-2 ( $383,41 \pm 234,20$  pg/mL) (Tabela 1).

#### 5.2.6 Complexos MMP's/TIMP's *versus* sinais / sintomas clínicos e radiográfico

Níveis mais elevados de todos os complexos estudados foram detectados nas áreas de menor destruição óssea periapical (lesões periapicais  $\leq 7$  mm) quando comparadas as áreas de maior destruição (lesões periapicais  $> 7$  mm) ( $p < 0,001$ ) (Tabela 7).

Tabela 7- Valores dos biomarcadores inflamatórios (MMP's, TIMP's, Complexos MMP's/TIMP's) de acordo com o critério radiográfico e presença ou ausência de sintomatologia

|            | Tamanho lesão (mm)  |                       |              | Sintomatologia        |                       |              | Dor Prévia            |                       |              | Dor à palpação        |                       |              | Dor à Percussão       |                       |              |
|------------|---------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|--------------|-----------------------|-----------------------|--------------|
|            | ≤7                  | >7                    | Valor de "p" | Ausência              | Presença              | Valor de "p" | Ausência              | Presença              | Valor de "p" | Ausência              | Presença              | Valor de "p" | Ausência              | Presença              | Valor de "p" |
| MMP1       | 536,99<br>(±239,84) | 1041,88<br>(±221,33)  | <0,0001      | 719,73<br>(±275,41)   | 893,98<br>(±423,10)   | 0,277        | 838,59<br>(±265,50)   | 641,97<br>(±524,76)   | 0,278        | 718,55<br>(±333,10)   | 1072,99<br>(±235,82)  | 0,06         | 779,79<br>(±290,80)   | 818,36<br>(±510,86)   | 0,834        |
| MMP2       | 430,57<br>(±260,46) | 1356,75<br>(±441,03)  | <0,0001      | 735,66<br>(±480,60)   | 1030,66<br>(±692,90)  | 0,148        | 951,74<br>(±527,07)   | 719,40<br>(±799,77)   | 0,462        | 773,22<br>(±565,67)   | 1375,43<br>(±479,57)  | 0,06         | 843,85<br>(±522,06)   | 1043,09<br>(±819,41)  | 0,529        |
| MMP9       | 547,04<br>(±241,68) | 1389,66<br>(±505,59)  | <0,0001      | 763,53<br>(±364,97)   | 1275,57<br>(±722,35)  | 0,049        | 997,23<br>(±499,68)   | 879,63<br>(±840,68)   | 0,703        | 827,77<br>(±512,60)   | 1530,65<br>(±533,58)  | 0,02         | 893,93<br>(±476,63)   | 1191,61<br>(±846,09)  | 0,33         |
| Total MMP  | 1513,8<br>(±739,58) | 3788,24<br>(±1138,53) | <0,0001      | 2218,18<br>(±1099,92) | 3300,27<br>(±1833,27) | 0,114        | 2767,66<br>(±1270,38) | 2241,09<br>(±2164,49) | 0,493        | 2319,05<br>(±1390,27) | 3978,92<br>(±1244,41) | 0,043        | 2516,94<br>(±1266,46) | 3053,27<br>(±2174,98) | 0,502        |
| TIMP1      | 521,79<br>(±252,97) | 441,70<br>(±132,82)   | 0,387        | 478,82<br>(±228,94)   | 486,13<br>(±164,74)   | 0,939        | 523,79<br>(±198,10)   | 355,62<br>(±166,83)   | 0,106        | 456,15<br>(±231,83)   | 584,14<br>(±97,47)    | 0,265        | 501,70<br>(±213,05)   | 421,88<br>(±163,88)   | 0,456        |
| TIMP2      | 223,62<br>(±108,41) | 189,30<br>(±56,92)    | 0,382        | 205,21<br>(±98,12)    | 208,34<br>(±70,60)    | 0,929        | 224,48<br>(±84,90)    | 152,41<br>(±71,50)    | 0,109        | 195,49<br>(±91,64)    | 250,34<br>(±41,77)    | 0,256        | 215,01<br>(±91,31)    | 180,81<br>(±70,24)    | 0,557        |
| Total TIMP | 745,42<br>(±361,39) | 631,01<br>(±189,74)   | 0,392        | 684,04<br>(±327,06)   | 694,48<br>(±235,55)   | 0,932        | 748,28<br>(±283,00)   | 508,02<br>(±238,32)   | 0,205        | 651,64<br>(±305,48)   | 834,49<br>(±139,25)   | 0,255        | 716,22<br>(±304,36)   | 602,70<br>(±234,11)   | 0,478        |
| MMP1/TIMP1 | 413,21<br>(±14,97)  | 75,28<br>(±7,35)      | <0,0001      | 273,39<br>(±176,68)   | 200,53<br>(±170,98)   | 0,372        | 235,63<br>(±178,35)   | 270,09<br>(±175,86)   | 0,712        | 264,65<br>(±172,82)   | 162,64<br>(±175,31)   | 0,306        | 257,22<br>(±177,40)   | 205,34<br>(±175,25)   | 0,577        |
| MMP1/TIMP2 | 377,32<br>(±18,88)  | 84,42<br>(±10,21)     | <0,0001      | 258,41<br>(±154,81)   | 189,55<br>(±144,77)   | 0,331        | 222,14<br>(±153,77)   | 257,06<br>(±156,10)   | 0,664        | 249,80<br>(±149,68)   | 155,18<br>(±150,99)   | 0,273        | 242,62<br>(±155,82)   | 195,62<br>(±145,68)   | 0,561        |
| MMP2/TIMP1 | 376,11<br>(±32,84)  | 72,71<br>(±7,81)      | <0,0001      | 244,82<br>(±156,10)   | 193,79<br>(±164,72)   | 0,492        | 210,45<br>(±156,10)   | 266,29<br>(±171,63)   | 0,507        | 241,38<br>(±155,97)   | 156,53<br>(±165,88)   | 0,348        | 231,93<br>(±158,96)   | 201,85<br>(±168,33)   | 0,722        |
| MMP2/TIMP2 | 641,77<br>(±116,59) | 147,52<br>(±20,01)    | <0,0001      | 419,33<br>(±247,84)   | 357,62<br>(±305,52)   | 0,624        | 360,54<br>(±246,99)   | 496,95<br>(±325,39)   | 0,334        | 424,03<br>(±262,94)   | 277,10<br>(±283,58)   | 0,337        | 400,62<br>(±254,88)   | 372,82<br>(±330,05)   | 0,867        |
| MMP9/TIMP1 | 904,19<br>(±47,73)  | 150,63<br>(±11,83)    | <0,0001      | 585,45<br>(±380,98)   | 440,35<br>(±407,66)   | 0,427        | 492,71<br>(±376,16)   | 631,49<br>(±449,41)   | 0,503        | 576,66<br>(±388,58)   | 330,38<br>(±366,08)   | 0,267        | 547,81<br>(±380,78)   | 466,19<br>(±488,90)   | 0,695        |
| MMP9/TIMP2 | 611,06<br>(±19,87)  | 155,76<br>(±15,42)    | <0,0001      | 418,10<br>(±235,80)   | 331,39<br>(±237,40)   | 0,432        | 367,42<br>(±236,85)   | 431,40<br>(±245,68)   | 0,61         | 411,86<br>(±235,60)   | 269,61<br>(±219,67)   | 0,289        | 395,48<br>(±234,81)   | 347,19<br>(±255,69)   | 0,7          |

\* Teste de Bartlett/ one-way ANOVA ( $p < 0,05$ )

### 5.3 Análise dos biomarcadores inflamatórios após terapia endodôntica com medicações à base de Ca(OH)<sub>2</sub>

#### 5.3.1 Citocinas inflamatórias (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa) e seus antagonistas (IL1-RA, IL6-RA e sTNF-R1)

As citocinas IL-1 beta, TNF-alfa e IL-6 foram detectadas em 100% das amostras coletadas. As medicações Ca(OH)<sub>2</sub> + SSL e Ca(OH)<sub>2</sub>+CLX foram eficazes na redução do IL-1beta ( $p < 0,05$ ), TNF-alfa ( $p < 0,001$ ) e IL-6 ( $p < 0,001$ ). A Tabela (8) apresenta, os receptores IL-RA, sTNFR1, IL-6 RA que também foram detectados em 100% das amostras coletadas (20/20) das lesões periapicais. Não houve diferença estatística entre os níveis de IL-1 RA, sTNF-R1, IL-6 RA encontrados antes e após terapia endodôntica nos grupos Ca(OH)<sub>2</sub> + SSL e Ca(OH)<sub>2</sub> + CLX ( $p > 0,05$ ) (Tabela 8). Foi observado reduções dos níveis de IL-1 beta, TNF-alfa e IL-6 após terapia endodôntica à base de Ca(OH)<sub>2</sub> + SSL e Ca(OH)<sub>2</sub> + CLX.

Tabela 8 - Distribuição dos valores de citocinas e receptores antagonistas (média e  $\pm$  dp) detectados nas lesões periapicais antes e após a terapia endodôntica utilizando Ca(OH)<sub>2</sub> + SSL como medicação

|                         |          | [Ca(OH) <sub>2</sub> + SSL]    |                                 | Valor "p" |
|-------------------------|----------|--------------------------------|---------------------------------|-----------|
|                         |          | Inicial                        | Após Tratamento                 |           |
| Citocinas               | IL-1beta | 425,0 $\pm$ 266,7 <sup>A</sup> | 237,5 $\pm$ 148,4 <sup>Ba</sup> | 0,001     |
|                         | TNF-alfa | 260,3 $\pm$ 103,6 <sup>A</sup> | 122,7 $\pm$ 51,3 <sup>Ba</sup>  | < 0,001   |
|                         | IL-6     | 235,8 $\pm$ 22,4 <sup>A</sup>  | 129,3 $\pm$ 12,0 <sup>Ba</sup>  | < 0,001   |
| Receptores Antagonistas | IL-1RA   | 89,3 $\pm$ 14,2 <sup>A</sup>   | 87,1 $\pm$ 14,4 <sup>Aa</sup>   | 0,746     |
|                         | STNF-R1  | 40,5 $\pm$ 11,5 <sup>A</sup>   | 39,8 $\pm$ 12,4 <sup>Aa</sup>   | 0,901     |
|                         | IL-6RA   | 151,2 $\pm$ 19,7 <sup>A</sup>  | 149,1 $\pm$ 19,3 <sup>Aa</sup>  | 0,773     |

\* Letra maiúscula – Intra-grupo análise (Teste "t" pareado) ( $p < 0,05$ ); \*Letra minúscula – análise inter-grupo (Teste de Bartlett/one-way ANOVA) ( $p < 0,05$ );



Tabela 9 - Distribuição dos valores de citocinas e receptores antagonistas (média e  $\pm$  dp) detectados nas lesões periapicais antes e após a terapia endodôntica utilizando  $\text{Ca(OH)}_2$  + SSL como medicação

|                         |           | [Ca(OH) <sub>2</sub> + CLX]    |                                 | Valor<br>“p” |
|-------------------------|-----------|--------------------------------|---------------------------------|--------------|
|                         |           | Inicial                        | Após Tratamento                 |              |
| Citocinas               | IL-1beta  | 324,3 $\pm$ 242.8 <sup>A</sup> | 168,6 $\pm$ 119.9 <sup>Ba</sup> | 0,003        |
|                         | TNF-alpha | 252,1 $\pm$ 107.9 <sup>A</sup> | 124,6 $\pm$ 59.9 <sup>Ba</sup>  | <0,001       |
|                         | IL-6      | 224,2 $\pm$ 16.8 <sup>A</sup>  | 112,8 $\pm$ 13.0 <sup>Ba</sup>  | <0,001       |
|                         | IL-1RA    | 103,7 $\pm$ 120.0 <sup>A</sup> | 101,35 $\pm$ 26,9 <sup>Aa</sup> | 0,844        |
| Receptores Antagonistas | STNF-R1   | 46,7 $\pm$ 18.4 <sup>A</sup>   | 46,3 $\pm$ 18,3 <sup>Aa</sup>   | 0,959        |
|                         | IL-6RA    | 123,3 $\pm$ 10.4 <sup>A</sup>  | 121,6 $\pm$ 8,53 <sup>Aa</sup>  | 0,693        |

\* Letra maiúscula – Intra-grupo análise (Teste “t” pareado) ( $p < 0,05$ );

\*Letra minúscula – análise inter-grupo (Teste de Bartlett/one-way ANOVA) ( $p < 0,05$ );

### 5.3.2 Níveis de MMP's, TIMP's e Complexos MMP's/ TIMP's

Metaloproteinases (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) e os seus inibidores (TIMP-1 e TIMP-2) foram detectadas em 100% das amostras (20/20) coletadas do fluído intersticial periapical de dentes com infecções endodônticas primárias e presença de lesão periapical após terapia endodôntica com medicações à base de  $\text{Ca(OH)}_2$ . As medicações  $\text{Ca(OH)}_2$  + SSL e  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX foram eficazes na redução dos níveis de MMP-1 ( $p < 0,001$ ), MMP-2 ( $p < 0,05$ ) e MMP-9 ( $p < 0,05$ ). Na Tabela 10 foram apresentados os valores médios e desvio padrão ( $\pm$  DP) dos níveis de MMP's, TIMP's e Complexos MMP's/TIMP's antes e após terapia endodôntica. Não houve diferença estatisticamente significativa entre  $\text{Ca(OH)}_2$  + SSL e  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX ( $p > 0,05$ ). Também não houve diferença estatística entre os níveis de TIMP-1 e TIMP-2 encontrados antes e após terapia endodôntica no  $[\text{Ca(OH)}_2 + \text{SSL}]$  e  $[\text{Ca(OH)}_2 + \text{CLX}]$  ( $p > 0,05$ ) (Tabela 10).

Todos os complexos investigados (MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1, MMP-9/TIMP-2)

foram detectados nas coletas do fluído intersticial periapical. Não houve diferença significativa entre os valores médios de todos os complexos estudados encontrados antes e após terapia endodôntica independente da medicação intracanal testada ( $p > 0,05$ ) (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição dos valores de MMP's, TIMP's e complexos (média e  $\pm$  dp) detectados nas lesões periapicais antes e após a terapia endodôntica utilizando  $\text{Ca(OH)}_2$  + SSL como medicação

|                 |                     | <b>Ca(OH)<sub>2</sub> +SSL</b>    |                                   | <b>Valor "P"</b> |
|-----------------|---------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|------------------|
|                 |                     | <b>Inicial</b>                    | <b>Após Tratamento</b>            |                  |
| <b>MMP</b>      | <b>MMP-1</b>        | 859,2 $\pm$ 380.2 <sup>A</sup>    | 381,4 $\pm$ 160.9 <sup>Ba</sup>   | <0,001           |
|                 | <b>MMP-2</b>        | 1024,9 $\pm$ 652.9 <sup>A</sup>   | 484,4 $\pm$ 321.8 <sup>Ba</sup>   | <0,001           |
|                 | <b>MMP-9</b>        | 1161,3 $\pm$ 680.9 <sup>A</sup>   | 536,4 $\pm$ 279.4 <sup>Ba</sup>   | 0,001            |
|                 | <b>Total MMP</b>    | 3044,7 $\pm$ 1,705.5 <sup>A</sup> | 1,475.1 $\pm$ 824.5 <sup>Ba</sup> | 0,005            |
| <b>TIMP</b>     | <b>TIMP-1</b>       | 478,2 $\pm$ 184.9 <sup>A</sup>    | 470,7 $\pm$ 342.0 <sup>Aa</sup>   | 0,903            |
|                 | <b>TIMP-2</b>       | 204,9 $\pm$ 79.2 <sup>A</sup>     | 200,9 $\pm$ 79.0 <sup>Aa</sup>    | 0,852            |
|                 | <b>Total TIMP</b>   | 683,2 $\pm$ 264.2 <sup>A</sup>    | 670,9 $\pm$ 258.8 <sup>Aa</sup>   | 0.751            |
|                 | <b>MMP-1/TIMP-1</b> | 210,2 $\pm$ 173.6 <sup>A</sup>    | 204,1 $\pm$ 172.2 <sup>Aa</sup>   | 0,906            |
| <b>MMP/TIMP</b> | <b>MMP1/TIMP2</b>   | 203,3 $\pm$ 153.7 <sup>A</sup>    | 200,2 $\pm$ 153.2 <sup>Aa</sup>   | 0,967            |
|                 | <b>MMP2/TIMP1</b>   | 196.5 $\pm$ 157.1 <sup>A</sup>    | 194,6 $\pm$ 159.0 <sup>Aa</sup>   | 0,952            |
|                 | <b>MMP2/TIMP2</b>   | 359,9 $\pm$ 280.6 <sup>A</sup>    | 352,2 $\pm$ 280.3 <sup>Aa</sup>   | 0,929            |
|                 | <b>MMP9/TIMP1</b>   | 453,1 $\pm$ 395.7 <sup>A</sup>    | 448,6 $\pm$ 391.6 <sup>Aa</sup>   | 0,932            |
|                 | <b>MMP9/TIMP2</b>   | 343,9 $\pm$ 235.6 <sup>A</sup>    | 345,7 $\pm$ 248.6 <sup>Aa</sup>   | 0,963            |

\* Letra maiúscula – Intra-grupo análise (Teste "t" pareado) ( $p < 0,05$ );

\*Letra minúscula – análise inter-grupo (Teste de Bartlett/one-way ANOVA) ( $p < 0,05$ )

Tabela 11 - Distribuição dos valores de MMP's, TIMP's e complexos (média e  $\pm$  dp) detectados nas lesões periapicais antes e após a terapia endodôntica utilizando  $\text{Ca(OH)}_2$ +CLX como medicação

|                 |                     | Ca(OH) <sub>2</sub> +CLX          |                                  | Valor<br>"P" |
|-----------------|---------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------|
|                 |                     | Inicial                           | Após<br>Tratamento               |              |
| <b>MMP</b>      | <b>MMP-1</b>        | 719,5 $\pm$ 304.4 <sup>A</sup>    | 376,5 $\pm$ 163,9 <sup>Bb</sup>  | <0,001       |
|                 | <b>MMP-2</b>        | 762,3 $\pm$ 523.8 <sup>A</sup>    | 387,6 $\pm$ 260,1 <sup>Bb</sup>  | <0,001       |
|                 | <b>MMP-9</b>        | 775,3 $\pm$ 402.5 <sup>A</sup>    | 421,4 $\pm$ 199,4 <sup>Bb</sup>  | 0,004        |
|                 | <b>Total MMP</b>    | 2257,4 $\pm$ 1,209.9 <sup>A</sup> | 1189,1 $\pm$ 606,9 <sup>Bb</sup> | 0,003        |
| <b>TIMP</b>     | <b>TIMP-1</b>       | 485,1 $\pm$ 225,8 <sup>A</sup>    | 477,6 $\pm$ 222,3 <sup>Aa</sup>  | 0,940        |
|                 | <b>TIMP-2</b>       | 207,9 $\pm$ 96,7 <sup>A</sup>     | 202,7 $\pm$ 95,9 <sup>Aa</sup>   | 0,904        |
|                 | <b>Total TIMP</b>   | 693,3 $\pm$ 322,5 <sup>A</sup>    | 649,3 $\pm$ 295,4 <sup>Aa</sup>  | 0,757        |
|                 | <b>MMP-1/TIMP-1</b> | 278.3 $\pm$ 176.1 <sup>A</sup>    | 271,4 $\pm$ 172,9 <sup>Aa</sup>  | 0,931        |
| <b>MMP/TIMP</b> | <b>MMP1/TIMP2</b>   | 258. 4 $\pm$ 151.0 <sup>A</sup>   | 257,9 $\pm$ 154,2 <sup>Aa</sup>  | 0,994        |
|                 | <b>MMP2/TIMP1</b>   | 252. 3 $\pm$ 160.8 <sup>A</sup>   | 248,2 $\pm$ 161,7 <sup>Aa</sup>  | 0,954        |
|                 | <b>MMP2/TIMP2</b>   | 429.3 $\pm$ 261.3 <sup>A</sup>    | 422,1 $\pm$ 260,0 <sup>Aa</sup>  | 0,952        |
|                 | <b>MMP9/TMP1</b>    | 601.8 $\pm$ 386.0 <sup>A</sup>    | 585,4 $\pm$ 386,3 <sup>Aa</sup>  | 0,926        |
|                 | <b>MMP9/TIMP2</b>   | 422.9 $\pm$ 238.3 <sup>A</sup>    | 414,1 $\pm$ 234,9 <sup>Aa</sup>  | 0,935        |

\* Letra maiúscula – Intra-grupo análise (Teste "t" pareado) ( $p < 0,05$ );

\*Letra minúscula – análise inter-grupo (Teste de Bartlett/one-way ANOVA)  
( $p < 0,05$ )

## 6 DISCUSSÃO

As lesões periapicais começam com uma infecção bacteriana predominantemente anaeróbica, presente nos canais radiculares necróticos, desenvolvendo uma resposta imunológica que pode resultar na reação inflamatória do tecido periapical e também na reabsorção óssea (Walker et al., 2000; Lin et al., 2002; Nair, 2004; de Brito et al., 2012). A patogenicidade das bactérias presentes nessas lesões é influenciada por fatores como: (1) interação de microrganismos presentes nos canais radiculares; (2) liberação de endotoxinas (lipopolissacarídeos - LPS) (Nair, 2004); (3) síntese de enzimas (colagenases – MMP-1 e/ou MMP-8, elastase e gelatinase – MMP-2 e /ou MMP-9) que regulam a degradação de praticamente toda a matriz extracelular (ECM); e (4) a habilidade do patógeno de interagir com as defesas do hospedeiro através da atividade de células de defesa como macrófagos, linfócitos, neutrófilos e leucócitos polimorfonucleares - PMNs, (Whalgren et al., 2002; Nair, 2004; Hannas et al., 2007).

Dessa maneira, um dos objetivos do presente estudo foi correlacionar o perfil inflamatório das lesões periapicais com os níveis de citocinas inflamatórias liberadas pelas células de defesa. As citocinas avaliadas (IL-1beta, IL-6 e TNF-alfa), são mediadores e reguladores da imunidade inata e participam da destruição tecidual (Gallin, Snyderman et al., 1999). Seus efeitos deletérios são regulados por seus respectivos antagonistas (IL-1 RA, IL-6 RA, sTNF-R1) (Le, Vilcek, 1989; Akira et al., 1990) que foram mensurados durante a realização do teste de ELISA.

Na coleta inicial, IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa foram detectadas em todas as coletas do fluído intersticial periapical. Estes achados corroboram com a literatura (Tavares et al., 2012; Martinho et al., 2011b; Martinho et al., 2014a, 2014b). IL-1 media e regula a imunidade inata estimulando ou inibindo as reações inflamatórias (Cavaillon, 2005) , apresenta papel importante na função osteoclástica, sendo o primeiro estimulador na reabsorção óssea (Balton et al., 2001). A IL-6 estimula a resposta imune em infecções e traumas apresentando papel importante na indução de febre e na resposta inflamatória aguda (Schuster et al., 2003). O TNF-alfa induz a liberação de mediadores secundários como ácido araquidônico e óxido nítrico, que estimulam a dor (Montón et al., 1998).

Neste estudo níveis mais elevados de IL-1 beta e TNF-alfa foram encontrados nas áreas de maior destruição óssea quando comparadas as áreas de menor destruição, confirmando seu papel na reabsorção óssea. Estes achados, estão de acordo com Martinho et al., 2010, no qual verificaram relação direta entre IL-1 beta e tamanho de lesão periapical. Martinho et al., 2012 verificaram relação direta entre as citocinas TNF-alfa e IL-6; e maior destruição óssea periapical.

No presente estudo não foi observado relação direta entre níveis das citocinas inflamatórias estudadas (IL-1 beta, IL-6 e TNF-alfa) e o desenvolvimento de sintomatologia clínica. Martinho et al. (2011a, 2012) verificaram relação entre maior nível de determinadas citocinas estudadas e a presença de sintomatologia. Entretanto, vale ressaltar que no presente estudo, foi realizada a dosagem de várias células além do sobrenadante dos macrófagos e a dosagem de citocinas inflamatórias foi realizada diretamente do fluído intersticial periapical, enquanto, Martinho et al. (2011b, 2012), dosaram citocinas do sobrenadante de macrófagos estimulados com conteúdo microbiano coletado de canais radiculares.

Na coleta inicial, receptores antagonistas IL-1RA, sTNF-R1, IL RA também foram detectados em todas as amostras coletadas. O

teste de correlação de Pearson indicou correlação negativa entre sTNF-R1 e TNF-alfa. As citocinas inflamatórias e os seus antagonistas desempenham diferentes funções durante o processo inflamatório. O antagonista IL-1RA inibe a atividade da IL-1beta, controlando e equilibrando o processo inflamatório (Tountas et al., 1999; Arend, 1991). Durante o processo inflamatório, a presença de citocinas antagonistas representam uma tentativa de controlar o avanço da progressão da doença, entretanto poucos estudos são encontrados na literatura elucidando essas correlações.

É importante ressaltar, que a resposta inflamatória, é complexa e dinâmica, envolvendo a participação de diferentes biomarcadores inflamatórios, os quais podem estar inter-relacionados, estabelecendo um mecanismo de retroalimentação entre os mesmos (Cavaillon, 2005). Cavaillon (2005) relatou que em consequência do aumento do nível das citocinas inflamatórias, ocorre a estimulação da produção de metaloproteinases (MMP-1, MMP-2 e MMP-9). Neste estudo, o teste de correlação de Pearson não indicou relação significativa entre maior nível de citocinas com os níveis de MMP's.

Na coleta inicial, MMP-1, MMP-2 e MMP-9 foram detectadas no fluido intersticial periapical, confirmando a participação das MMP's no processo de destruição tecidual periapical (Buzoglu et al., 2009). Entre elas, níveis mais elevados foram apresentados pela MMP-9 e menores pela MMP-1. Shin et al. (2002) utilizando teste de zimografia para avaliar os níveis de MMP's (-1, -2, -3) em lesões periapicais, verificaram níveis de MMP-3 > MMP-2 > MMP-1. Buzoglu et al. (2009) verificaram níveis mais elevados de MMP-9 em abscessos periapicais agudos e crônicos quando comparados aos níveis de MMP-2 presente apenas na condição aguda.

Neste estudo, correlação positiva foi encontrada entre maiores níveis de MMP-1, MMP-2 e MMP-9 com maior área de destruição óssea periapical. Sabe-se que MMP's coletivamente promoveram a

degradação da matriz extracelular e proteínas da membrana basal na inflamação crônica e tamanho de destruição óssea periapical (Wahlgren et al., 2002). Lin et al. (2002) ao correlacionar a lesão periapical e a reabsorção óssea, verificaram que macrófagos e osteoblastos estão envolvidos na lesão periapical promovendo a reabsorção óssea por MMP-1, IL-6 e COX-2. Wan et al. (2004), verificaram que a MMP-9 está relacionada com maior área de destruição periapical. Vale ainda ressaltar que, no presente estudo, teste de correlação de Pearson indicou inter-relações entre as MMP's estudadas, elucidando a ação coletiva das mesmas no processo de destruição tecidual.

Particularmente, maiores níveis de MMP-9 foram correlacionados com o desenvolvimento de sintomatologia clínica, especificamente, em presença de dor à palpação. A participação da MMP-9 no desenvolvimento de sintomatologia é reportada na literatura (Shin et al., 2011; Ahmed et al., 2013). Ahmed et al. (2013) testaram a hipótese que a expressão elevada de MMP-9 estava relacionada com a presença de sintomatologia; os autores concluíram que níveis mais elevados de MMP-9 esteve presente nos casos com sintomatologia quando comparados aos assintomáticos.

Sabe-se que a atividade das MMP's é controlada por pró-enzimas e inibidores, conhecidos por inibidores teciduais de metaloproteinase (TIMP), que reduzem os danos provenientes da cascata inflamatória (Gómez et al., 1997), e estão presentes principalmente nas periodontites assintomáticas (Letra et al., 2013). O equilíbrio entre a atividade das MMP's e dos TIMP's controlam a remodelação da matriz extracelular (Hannas et al., 2007), contudo o seu desequilíbrio está relacionado às condições patológicas como fenda palatina e periodontite (Verstappen, Von Den Hoff., 2006). Particularmente, no presente estudo, ambos os testes estatísticos aplicados (correlação de Pearson e Regressão linear) indicaram correlações entre níveis de MMP-1 e TIMP-1 e TIMP-2, elucidando a inter-relação entre MMP's e TIMP's, equilibrando

o processo de destruição tecidual nas lesões estudadas, caracterizando um processo crônico.

Assim como as MMP's, os TIMP's estão relacionados com o processo de destruição e remodelação tecidual, neste estudo níveis mais elevados de TIMP-1 foram encontrados em casos de periodontites apicais assintomáticas, já níveis mais elevados de MMP-2, e -9 foram encontrados em casos de periodontites apicais sintomáticas. Letra et al. (2013) compararam os níveis de MMP-2, -3, -7, -9, -14, -16 e -25 e TIMP-1 e TIMP-2, em dentes sintomáticos e assintomáticos, através do teste de PCR real time e teste de imunohistoquímica. Níveis mais elevados de TIMP-1 foram encontrados em casos de periodontites apicais assintomáticas, já níveis mais elevados de MMP-2, -7 e -9 foram encontrados em casos de periodontites apicais sintomáticos.

A relação entre as metaloproteinases e seus inibidores é complexa, sendo ainda pouco estudada na odontologia. As MMP's (MMP-1, MMP-2 e MMP-9) formam complexos com os TIMP's (TIMP-1 e TIMP-2), quando essas enzimas estão em forma latente, levando a estabilização do mecanismo de ativação enzimática (Visse et al., 2003). Na medicina, elevados níveis circulatórios desses complexos, especialmente o MMP-2/TIMP-2, já têm sido utilizados para o diagnóstico de tumores severos como o Linfoma (Pennanen et al., 2008) e no prognóstico de pacientes com câncer como adenocarcinoma e carcinoma de células escamosas (Hoikkala et al., 2006).

Neste estudo, foram avaliados os complexos: MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, MMP-2/TIMP-2, MMP-9/TIMP-1 e MMP-9/TIMP-2. Nas coletas iniciais, foram detectadas a presença de todos os complexos estudados, sendo mais elevados, os níveis dos complexos de MMP-2/TIMP-2 e MMP-9/TIMP-1 em comparação aos complexos MMP-1/TIMP-1, MMP-1/TIMP-2, MMP-2/TIMP-1, e MMP-9/TIMP-2. No presente estudo, níveis mais elevados de todos os complexos estudados foram detectados nas áreas de menor destruição



óssea periapical ( $\leq 7\text{mm}$ ) quando comparadas as áreas de maior destruição ( $> 7\text{mm}$ ).

Diferentes são as modalidades da terapia endodôntica, podendo o tratamento endodôntico ser realizado em sessão única ou múltipla, na qual a última utiliza-se medicação intracanal. Sabe-se que o preparo químico-mecânico isoladamente, não é capaz de eliminar a infecção, em 100%, presente no sistema de canais radiculares. Desta forma, julga-se necessário a utilização das medicações intracanaís. É importante ressaltar que a terapia endodôntica deve visar não só a eliminação de microorganismo, mas também, que favoreça a resolução do processo inflamatório periapical.

Entre as medicações intracanaís, o hidróxido de Cálcio  $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$  é mais utilizado (Siqueira, de Uzeda 1996; Gomes et al., 2003; Vianna et al., 2007; Rocas, Siqueira, 2010; Oliveira et al., 2012; Vera et al., 2012; Xavier et al., 2013) devido a sua capacidade antimicrobiana e anti-inflamatória (Camargo et al., 2006; Maekawa et al., 2011). Recentemente a clorexidina (CLX) também tem apresentado grande potencial como medicação isolada ou combinada ao  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  (Gomes et al., 2003, Vianna et al., 2007; Tavares et al., 2013).

Diferentes estudos até o momento avaliaram a efetividade clínica do uso de medicações intracanaís no combate à infecção presente nos canais radiculares (Martinho et al., 2008; Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011). Entretanto, poucos estudos avaliaram o potencial anti-inflamatório das medicações intracanaís direto no tecido periapical, através da coleta do fluído intersticial e monitoramento de diferentes biomarcadores inflamatórios.

No presente estudo, avaliamos a efetividade do hidróxido de cálcio e sua associação à clorexidina no processo inflamatório periapical. O método utilizado para a coleta do fluído intersticial periapical foi realizado de acordo com a literatura (Tavares et al., 2013; Martinho et al., 2014b). Após a instrumentação e previamente a coleta final foi

realizado ampliação foraminal, permitindo que o cone de papel estéril/apirogênico alcance a região apical, (Tavares et al., 2013; Martinho et al., 2014c). Citocinas, MMP's e complexos foram monitorados antes e após 14 dias do uso da medicação intracanal.

O  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  e sua associação com a clorexidina foram eficazes na redução dos níveis inflamatórios de IL-1 beta, TNF-alfa e IL-6, não havendo diferença significativa entre as medicações testadas. Tavares et al. (2012) também avaliaram a influência do hidróxido de cálcio no fluido intersticial periapical em canais radiculares humanos. A expressão de RNAm e níveis de IFN-gama, TNF-alfa, IL-1, IL-17A, IL-10 e MCP-1 (quimiocina quimioatractiva de monócitos da proteína-1) foram analisados pelo teste de PCR real time logo após a limpeza dos canais e após 15 dias do uso da medicação, demonstrando que níveis de IL-1 beta, IFN-gama e IL-10 foram significativamente menores nos dentes que receberam hidróxido de cálcio, confirmando os benefícios do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Khan et al. (2008) analisaram a hipótese da ação de desnaturação do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  sobre as citocinas IL-1 alfa, TNF-alfa e GRP (calcitonina gene relacionado com o peptídeo). Durante 7 dias IL-1 alfa, TNF-alfa e CGRP foram incubadas com  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , após o período de incubação, houve desnaturação de IL-1 alfa, e CGRP em 50% das amostras incubadas concluindo que a desnaturação de citocinas inflamatórias é um potencial mecanismo do  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  contribuindo para resolução de periodontites apicais.

Já em 2013, Tavares et al. avaliaram a influência da clorexidina gel 2%, usada como irrigante e medicação intracanal na expressão de citocinas periapicais em dentes que apresentavam lesão periapical, níveis de citocina IFN-gama, TNF-alfa, IL-1 beta, IL17-A, IL-10 e CCL2/MCP-1 (quimiocina quimiotractiva de monócitos de proteína-1). Após 15 dias de uso de medicação; os autores concluíram que a aplicação de CLX impede o aumento tanto de citocinas quanto imunorreguladores.

Neste estudo, após 14 dias de medicação intracanal, foi observado uma redução significativa nos níveis das MMP's investigadas-MMP-1, -2, e -9, sem diferença entre o uso do  $\text{Ca(OH)}_2$  isolado ou associado à clorexidina. Corroborando com o presente estudo, Ahmed et al. (2013), após 14 dias do uso das medicações  $\text{Ca(OH)}_2$  + SSL e  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX, verificaram que ambas as medicações foram eficazes na redução dos níveis de  $\text{MMP-9} > \text{MMP-2} > \text{MMP-1}$ . Silva et al. (2010) também indicaram níveis mais baixos de MMP's, após realizado tratamento endodôntico com medicação à base de  $\text{Ca(OH)}_2$  em dentes caninos com lesões periapicais induzidas.

Após o uso de medicação intracanal [ $\text{Ca(OH)}_2$  + SSL e  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX gel 2%] por 14 dias, TIMP-1 e TIMP-2 foram encontradas em todas as amostras das lesões periapicais, não havendo diferença entre os níveis de TIMP-1 e TIMP-2 encontradas antes e após terapia endodôntica independentemente da medicação utilizada.

Após 14 dias de medicação [ $\text{Ca(OH)}_2$  + SSL e  $\text{Ca(OH)}_2$  + CLX gel 2%], os complexos TIMP's e MMP's foram detectados em todas as amostras coletadas do fluído intersticial periapical, não havendo diferença significativa entre os valores encontrados antes e após a terapia endodôntica, independentemente da medicação intracanal testada.

É importante ressaltar, que este estudo, foi o primeiro estudo clínico à avaliar o complexo TIMP/MMP nas lesões periapicais.

Vale ressaltar, que as medicações intracanaís testadas, apresentam alta atividade antimicrobiana conforme relatado na literatura, e paralelamente, exercem um importante papel no controle inflamatório periapical conforme demonstrado no presente estudo. Sendo assim, não podemos atribuir a redução dos biomarcadores inflamatórios periapicais apenas a atividade anti-inflamatória das medicações, mas também, indiretamente, a sua atividade antimicrobiana, favorecendo ao quadro de equilíbrio entre carga do agente agressivo e a defesa dos hospedeiros.

Por fim, baseado no presente estudo, ambas as medicações intracanaís testadas,  $\text{Ca(OH)}_2$  associado ou não a clorexidina, contribuíram para a redução do quadro inflamatória periapical. Apesar de não existir diferença significativa entre as medicações, vale ressaltar que a clorexidina aumenta a atividade antimicrobiana do  $\text{Ca(OH)}_2$ , podendo a mesma, ser considerada, principalmente nos casos de infecções persistentes após terapia endodôntica em que foi utilizado  $\text{Ca(OH)}_2$  como medicação intracanal.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos permitiram concluir que:

- a) Associação clínica foi encontrada entre níveis de citocinas inflamatórias e maior destruição óssea, particularmente entre os níveis de IL-1beta e TNF-alfa;
- b) Correlação positiva foi encontrada entre os níveis de citocinas inflamatórias e seus antagonistas;
- c) Todas as MMP's estiveram correlacionadas com lesão periapical; e correlação foi encontrada particularmente entre MMP-9 e dor à palpação;
- d) TIMP-1 e TIMP-2 estiveram presentes nas lesões periapicais e TIMP-1 esteve relacionada com maior área de destruição óssea periapical;
- e) Todos os complexos investigados estiveram presente nos tecidos periapicais apresentando níveis mais elevados relacionados com menor destruição óssea;
- f) Todas as medicações intracanaís testadas à base de hidróxido de cálcio, contribuíram para a redução do processo inflamatório periapical, determinado pela redução dos biomarcadores presentes no tecido periapical.

## 8 REFERÊNCIAS\*

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

Akira S, Hirano T, Taga T, Kishimoto T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). FASEB J.1990 Aug;4(11):2860-7.

Amalinei C, Caruntu ID, Giuşca SE, Balan RA. Matrix metalloproteinases involvement in pathologic conditions. Rom J Morphol Embryol. 2010;51(2):215-28.

Anne TM, Taina TH. Levels of Circulating TIMP-2 and MMP2-TIMP2 Complex Are Decreased in Squamous Cervical Carcinoma. Obstet Gynecol Int. 2010;2010:179351.

Arend WP. Interleukin 1 receptor antagonist. A new member of the interleukin 1 family. J Clin Invest. 1991 Nov;88(5):1445-51.

Ataoglu T, Ungör M, Serpek B, Haliloğlu S, Ataoğlu H, Ari H. Interleukin-1beta and tumour necrosis factor-alpha levels in periapical exudates. Int Endod J. 2002 Feb;35(2):181-5.

Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1992 Mar;73(3):334-6.

---

\*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 2014; citado em 30 set.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.ht](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.ht)

Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infect Immun*. 2001 Feb;69(2):744-50.

Brew K, Dinakarbandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.

Buzoglu HD, Unal H, Ulger C, Mert S, Kücükylidirim S, Er N. The zymographic evaluation of gelatinase (MMP-2 and -9) levels in acute and chronic periapical abscesses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Nov;108(5):e121-6.

Camargo CH, Bernardineli N, Valera MC, de Carvalho CA, de Oliveira LD, Menezes MM, et al. Vehicle influence on calcium hydroxide pastes diffusion in human and bovine teeth. *Dent Traumatol*. 2006 Dec;22(6):302-6.

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

Carneiro E. Análise da expressão de MMP-2,-9,-14, TIMP-1,-2 e Reck em granulomas e cistos periapicais [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, USP- Universidade de São Paulo; 2006.

Cavaillon MJ. Encyclopedia of molecular cell biology and molecular medicine, 2. ed. Wiley -VCH Verlag, Weinheim, Alemanha: Masson; 2005. Vol. 8

de Brito LC, Teles FR, Teles RP, Totola AH, Vieira LQ, Sobrinho AP. T-lymphocyte and cytokine expression in human inflammatory periapical lesions. *J Endod*. 2012 Apr;38(4):481-5.

Duarte PM, de Mendonça AC, Máximo MB, Santos VR, Bastos MF, Nociti FH. Effect of anti-infective mechanical therapy on clinical parameters and cytokine levels in human peri-implant diseases. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):234-43.

Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.

Gallin J, Snyderman K. Inflammation basic principles and clinical correlates. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 1999.

Garlet GP, Martins W Jr, Fonseca BA, Ferreira BR, Silva JS. Matrix metalloproteinases, their physiological inhibitors and osteoclast factors are differentially regulated by the cytokine profile in human periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 2004 Aug;31(8):671-9.

Gibson D, Cullen B, Legerstee R, Harding KG, Schultz G. MMPs made easy. *Wounds International*. 2009;1(1):1-6.

Gomes BP, Drucker DB, Lilley JD. Positive and negative associations between bacterial species in dental root canals. *Microbios*. 1994;80(325):231-43.

Gomes BP, Sato E, Ferraz CC, Teixeira FB, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Evaluation of time required for recontamination of coronally sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorhexidine. *Int Endod J*. 2003 Sep;36(9):604-9.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation, and biological functions. *Eur J Cell Biol*. 1997;74:111-22.

Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V. Pathogenesis of apical periodontitis: a literature review. *J Oral Maxillofac Res*. 2012 Jan 1;2(4):e1.

Haapasalo M, Endal U, Zandi H, Coil J. Eradication of endodontic infection by instrumentation and irrigation solutions. *Endod Top*. 2005;10:71-102.

Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjäderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand*. 2007 Feb;65(1):1-13.

Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *J Endod*. 2011 Dec;37(12):1659-62.

Hoikkala S, Pääkkö P, Soini Y, Mäkitaro R, Kinnula V, Turpeenniemi-Hujanen T. Tissue MMP-2 and MMP-9 are better prognostic factors than serum MMP-2/TIMP-2-complex or TIMP-1 in stage I-III lung carcinoma. *Cancer Lett*. 2006 May 8;236(1):125-32.



Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med*. 2004 Mar;33(3):162-9.

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 Oct;18(5):285-92.

Janeway CA Jr, Travers P, Walport M, Shlomichik. The immune system in the health and disease. 4 ed. New York: Garland; 1999.

Justulin Jr LA, Della-Coleta HHM, Taboga SR, Felisbino SL. Matrix Metaloproteinase MMP-2 and MMP-9 activity and localization during ventral prostate atrophy and regrowth. *J Androl*. 2010; 33 (5):696-708.

Khan AA, Sun X, Hargreaves KM. Effect of calcium hydroxide on proinflammatory cytokines and neuropeptides. *J Endod*. 2008 Nov;34(11):1360-3.

Le JM, Vilcek J. Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab Invest*. 1989 Dec;61(6):588-602.

Letra A, Ghaneh G, Zhao M, Ray H Jr, Francisconi CF, Garlet GP, et al. MMP-7 and TIMP-1, new targets in predicting poor wound healing in apical periodontitis. *J Endod*. 2013 Sep;39(9):1141-6.

Letra A, Silva RM, Rylands RJ, Silveira EM, de Souza AP, Wendell SK, et al. MMP3 and TIMP1 variants contribute to chronic periodontitis and may be implicated in disease progression. *J Clin Periodontol*. 2012 Aug;39(8):707-16.

Lin SK, Kok SH, Kuo MY, Wang TJ, Wang JT, Yeh FT, 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 Jun;110(3):246-53.

Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J*. 2012 Apr;45(4):354-62.

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, Freitas LF, Nascimento GG, Fernandes AM, Leite FR, Gomes AP, et al. Clinical comparison of the effectiveness of single-file reciprocating systems and rotary systems for removal of endotoxins and cultivable bacteria from primarily infected root canals. *J Endod.* 2014 May;40(5):625-9.

Martinho FC, Gomes BP. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2008 Mar;34(3):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, Leite FR, Chiesa WM, Nascimento GG, Feres M, Gomes BP. Signaling pathways activation by primary endodontic infectious contents and production of inflammatory mediators. *J Endod.* 2014c Apr;40(4):484-9.

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.* 2011b May;37(5):602-7.

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

Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Correlation between clinical/radiographic features and inflammatory cytokine networks produced by macrophages stimulated with endodontic content. *J Endod.* 2012 Jun;38(6):740-5.

Martinho FC, Leite FR, Nascimento GG, Cirelli JA, Gomes BP. Clinical investigation of bacterial species and endotoxin in endodontic infection and evaluation of root canal content activity against macrophages by cytokine production. *Clin Oral Investig.* 2014b Dec;18(9):2095-102.

Márton IJ, Kiss C. Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod.* 2014 Feb;40(2):155-63.

Márton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 2000;Jun;15(3):139-50.

Massova I, Kotra LP, Fridman R, Mobashery S. Matrix metalloproteinase structures, evolution, and diversification. *FASEB J.* 1998 Sep;12(12):1075-95.

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

Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR. Genetic susceptibility to periapical disease: conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. *J Endod.* 2012 May;38(5):604-7.

Mohammadi Z, Dummer PM. Properties and applications of calcium hydroxide in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2011 Aug;44(8):697-730.

Montón C, Rañó A, Torres A. Inflammatory response in pneumonia. *Arch Bronconeumol.* 1998 Nov;34 Suppl 2:11-6.

Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Nov 1;15(6):348-81.

Nakata K, Yamasaki M, Iwata T, Suzuki K, Nakane A, Nakamura H. Anaerobic bacterial extracts influence production of matrix metalloproteinases and their inhibitors by human dental pulp cells. *J Endod.* 2000 Jul;26(7):410-3.

Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol Rev.* 1985 Mar;49(1):1-32.

Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AO. Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. *J Endod.* 2012 Aug;38(8):1053-7.

Oyarzún A, Arancibia R, Hidalgo R, Peñafiel C, Cáceres M, González MJ, et al. Involvement of MT1-MMP and TIMP-2 in human periodontal disease. *Oral Dis.* 2010 May;16(4):388-95.

Papadopoulos DP, Moyssakis I, Makris TK, Poulakou M, Stavroulakis G, Perrea D, et al. Clinical significance of matrix metalloproteinases activity in acute myocardial infarction. *Eur Cytokine Netw.* 2005 Jun;16(2):152-60.

Pennanen H, Kuittinen O, Turpeenniemi-Hujanen T. Plasma MMP-2-TIMP-2 complex levels measured during follow-up predict a risk of relapse in patients with malignant lymphoma. *Eur J Haematol.* 2008 Jan;80(1):46-54.

Prso IB, Kocjan W, Simić H, Brumini G, Pezelj-Ribarić S, Borčić J, et al. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin 6 in human periapical lesions. *Mediators Inflamm.* 2007;2007:38210. Epub 2006 Dec 27.

Rôças IN, Siqueira JF Jr, Del Aguila CA, Provenzano JC, Guilherme BP, Gonçalves LS Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 2014 Feb;40(2):168-72.

Rôças IN, Siqueira JF Jr. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J Endod.* 2010 Jan;36(1):45-52.

Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 1991 Jan;17(1):12-4.

Santos J, Carrilho M, Tervahartiala T, Sorsa T, Breschi L, Mazzoni A, et al. Determination of matrix metalloproteinases in human radicular dentin. *J Endod.* 2009 May;35(5):686-9.

Satoyoshi M, Kawata A, Koizumi T, Inoue K, Itohara S, Teranaka T, et al. Matrix metalloproteinase-2 in dentin matrix mineralization. *J Endod.* 2001 Jul;27(7):462-6.

Schuster B, Kovaleva M, Sun Y, Regenhard P, Matthews V, Grötzinger J, Rose-John S, Kallen KJ. Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF. *J Biol Chem.* 2003 Mar 14;278(11):9528-35.

Shin SJ, LeeJI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulp and periapical lesion. *J Endod* 2002 Apr;28(4):313-5.

Shin SJ, LeeJI, Baek SH, Kum KY, ShonWJ, Bae KS. Matrix Metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painfull, nonvital teeth. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011 Oct; 112 (4): 548-54.

Silva BMJ, Vieira LQ, Sobrinho AP. The effects of mineral trioxide aggregates on cytokine production by mouse pulp tissue. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 May;105(5):70-6.

Silva PFW, 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 Feb;36(2):231-7.

Siqueira JF Jr, Sakamoto M, Rosado AS. Microbial community profiling using terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Methods Mol Biol*. 2010;666:71-85.

Siqueira JF Jr, de Uzeda M. Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod*. 1996 Dec;22(12):674-6.

Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G. Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. *Arch Oral Biol*. 2014 Sep;59(9):944-53.

Tani-Ishii N, Wang CY, Stashenko P. Immunolocalization of bone-resorptive cytokines in rat pulp and periapical lesions following surgical pulp exposure. *Oral Microbiol Immunol*. 1995 Aug;10(4):213-9.

Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Oliveira RR, Maciel KF, Vieira LQ, et al. The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. *J Endod*. 2013 Jul;39(7):889-92.

Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Teles FR, Teles RP, Vieira LQ, et al. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod*. 2012 Oct;38(10):1368-71.

Tountas NA, Casini-Raggi V, Yang H, Di Giovine FS, Vecchi M, Kam L, et al. Functional and ethnic association of allele 2 of the interleukin-1 receptor antagonist gene in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1999 Oct;117(4):806-13.

Valera MC, da Rosa JA, Maekawa LE, de Oliveira LD, Carvalho CA, Koga-Ito CY, et al. Action of própolis 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.

Valera MC, Silva KC, Maekawa LE, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Camargo CH, et al. Antimicrobial activity of sodium hypochlorite associated with intracanal medication for *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* inoculated in root canals. *J Appl Oral Sci.* 2009 Nov-Dec;17(6):555-9.

Vera J, Siqueira JF Jr, Ricucci D, Loghin S, Fernández N, Flores B, et al. One- versus two-visit endodontic treatment of teeth with apical periodontitis: a histobacteriologic study. *J Endod.* 2012 Aug;38(8):1040-52.

Verstappen J, Von den Hoff JW. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res.* 2006 Dec;85(12):1074-84.

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

Vigetti D, Moretto P, Viola M, Genasetti A, Rizzi M, Karousou E, et al. Matrix metalloproteinase 2 and tissue inhibitors of metalloproteinases regulate human aortic smooth muscle cell migration during in vitro aging. *FASEB J.* 2006 Jun;20(8):1118-30.

Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res.* 2003; 92(08):827-39.

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 Nov;35(11):897-904.

Walker KF, Lappin DF, Takahashi K, Hope J, Macdonald DG, Kinane DF. Cytokine expression in periapical granulation tissue as assessed by immunohistochemistry. *Eur J Oral Sci.* 2000 Jun;108(3):195-201.

Weitoft T, Larsson A, Rönnblom L. Serum levels of sex steroid hormones and matrix metalloproteinases after intra-articular glucocorticoid treatment

in female patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*. 2008 Mar;67(3):422-4.

Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res*. 1996 Aug;31(6):393-407.

Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, et al. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod*. 2013 Aug;39(8):959-64.

Yanagisawa S. Pathologic study of periapical lesions 1. Periapical granulomas: clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J Oral Pathol*. 1980 Sep;9(5):288-300.

**ANEXO A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

Acredito ter sido esclarecido (a) a respeito das informações que leram para mim, descrevendo o estudo a ser realizado e concordo em receber atendimento em consultório odontológico. Declaro conhecer os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, e que minha participação não implicará em nenhuma despesa.

NOME/RESPONSÁVEL \_\_\_\_\_

RG \_\_\_\_\_ CPF \_\_\_\_\_

ENDEREÇO COMPLETO \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Assinatura Responsável

\_\_\_\_\_

Assinatura Pesquisador



## ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética

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



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Monitoramento do processo inflamatório periapical antes e após o uso de diferentes medicações intracanaís através dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases e seus antagonistas

**Pesquisador:** Flávia Figueiredo Chaves Teixeira

**Área Temática:**

**Versão:** 4

**CAAE:** 27203514.3.0000.0077

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 754.621

**Data da Relatoria:** 15/08/2014

#### Apresentação do Projeto:

A infecção bacteriana presente no sistema de canais radiculares, quando não tratada, pode progredir em direção aos tecidos periapicais, estabelecendo um quadro inflamatório, provocado pela migração, ativação e a integração coordenada de células imuno-competentes, caracterizando a periodontite apical ( Marton& Kiss, 2000). Métodos de cultura microbiana ou moleculares revelaram que as infecções endodônticas primárias são polimicrobianas ( Gomes et al., 1994; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2014b), dominadas por bacilos gram-negativos anaeróbios estritos, (Martinho et al. 2014 c, Jacinto et al., 2003; Siqueira et al., 2011; Sakamoto et al., 2010; Martinho et al., 2014b). Bactérias gram-negativas, participantes da infecção apresentam como constituinte de membrana externa, moléculas de lipopolissacarídeos (LPS), também conhecidas como endotoxinas, as quais são responsáveis pela organização e estabilidade bacteriana (Vaara& Nikaido, 1984). Estudos clínicos revelam a presença de LPS bacteriano em 100% dos canais radiculares analisados de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical ( Martinho & Gomes, 2008; Martinho et al.,2010; Marinho et al., 2011a; Martinho et al., 2012a; Martinho et al., 2014a), sugerindo sua possível participação na destruição óssea periradicular.A estrutura histopatológica das periodontites apicais crônicas ou lesões inflamatórias periapicais crônicas compreende, a partir do forame apical, as zonas necróticas e exsudativas, granulomatosa

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



Continuação do Parecer: 154/21

e fibrosa infiltradas ( Yanagisawa, 1980; Egeblad & Werb, 2002) por células incompetentes em interação, como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos, linfócitos T, B e plasmócitos. Os tecidos granulatoso e fibroso, representantes da atividade proliferativa da inflamação crônica, desenvolvem-se e ocupam o espaço deixado pelo osso reabsorvido (Sze- Kwan et al., 2002; Garlet, 2004). A literatura revela a detecção de LPS bacteriano em 100% dos canais radiolares analisados de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical (Jacinto et al., 2005; Vianna et al., 2008; Martinho & Gomes, 2008; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011a; Martinho et al., 2012a; Martinho et al., 2014a, b, c.). Altas concentrações de endotoxinas parecem estar relacionadas com dor espontânea (Jacinto et al., 2005) e presença de sintomatologia clínica (Martinho & Gomes 2008; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011b; Martinho et al., 2012); sugerindo forte associação entre a presença de LPS no canal radiolar e o desenvolvimento de lesão periapical. O acúmulo de componentes bacterianos presentes nas infecções endodônticas primárias, incluindo principalmente endotoxinas de bactérias Gram-negativas ( Martinho et al., 2011a ; Martinho et al., 2012a; Martinho et al., 2014a), podem estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias por diferentes linhagens celulares (Wilson et al., 1996; Martinho et al., 2010; Martinho et al., 2011a; Martinho et al., 2012; Martinho et al., 2014 b ), através da ativação de receptores de membrana TLR-2 e TLR-4 ( Hosoya & Matsushima, 1997; Hong et al., 2004). As infecções crônicas envolvem diferentes citocinas multifuncionais que participam no processo de regulação a resposta imunológica e na inflamação, como por exemplo, o TNF-  $\alpha$  (Safavi & Rossomando, 1991; Ataoglu et al., 2002; Hong et al., 2004; Martinho et al., 2010), interleucina- 1 (IL-1) ( Martinho et al. 2010, Martinho et al. 2012b) e interleucina- 6 (IL-6) (Barkhordar et al., 1992; Tani-Ishii et al., 1995; Ataoglu et al., 2002; Martinho et al., 2010; Martinho et al. 2012b; Martinho et al. 2014b; Martinho et al. 2014 c.), e prostaglandina  $\alpha$  2 ( PGE2) ( Le & Vilek, 1989; Akira et al., 1990; Martinho et al. 2011b). Vale ressaltar As interações sinérgicas entre estas citocinas são reconhecidas em um processo osteolítico de  $\alpha$ feedback $\alpha$  negativo ou positivo ( Le & Vilek, 1989; Akira et al., 1990; Martinho et al., 2012b). Diferentes são os mecanismos de  $\alpha$ feedback $\alpha$  entre as citocinas inflamatórias num processo de destruição tecidual. Martinho et al. (2012 b) sugerem a participação das citocinas pró-inflamatórias L- 1  $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , PGE2 e IL-6 no desenvolvimento da periodontite apical crônica, cujos mecanismos de  $\alpha$ feedback $\alpha$  estão diretamente relacionados com aspectos clínicos ( presença de sinais/ sintomas) e destruição óssea. Na destruição tecidual descontrolada, o efeito deletério das citocinas inflamatórias, são naturalmente controlados pela elaboração e liberação de citocinas anti-inflamatória e/ou antagonistas, dentre eles, IL-1 RA ( receptor antagonist), IL-6 RA, o TNF- RI ( Soluble Tumor

Endereço: Av. Eng. Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3647-6078

Fax: (12)3647-6010

E-mail: cep@ccjc.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 754/5/1

Neurosis Factor Receptor I), s TNF-RII ( Le & Vileek, 1989; Akira et al., 1990; Martinho et al., 2012b). Além do efeito deletério das citocinas pró-inflamatórias na periodontite apical, existem várias proteinases que são produzidas, também, por células inflamatórias, como as colagenases (MMP-1 e/ou MMP-8), elastase e gelatinases (MMP-2 e/ou MMP-9), as quais irão promover a desnaturação do colágeno ou gelatina da matriz extracelular ( Massova et al., 1998; Nakata et al., 2000). Na inflamação, as MMP-9 são principalmente secretadas por leucócitos polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) e macrófagos (Whalgren et al., 2002). As MMPs são normalmente armazenadas intracelular, e quando liberadas, suas atividades são controladas por pró-enzimas e inibidores de metaloproteinases (TIMPs)- TIMP 1, 2, 3 presentes no tecido (Gomez et al., 1997). A inibição das MMPs por estas moléculas é capaz de reduzir os danos provenientes da cascata da inflamação, consequentemente, reduzindo os danos teciduais causado pelas mesmas. Produtos bacterianos ligantes de receptores TLR  $\hat{c}$  Toll Like Receptors $\hat{c}$  ( Blesharski et al., 2003), regula uma importante proteína de superfície expressa por neutrófilos, macrófagos e monócitos ( Bouhon et al., 2000) denominada TREM- 1  $\hat{c}$  Triggering Receptor Expressed in Myeloid Cells-1 $\hat{c}$ . Simultaneamente ao processo de regulação TREM-1, sTREM-1 (Soluble Triggering Receptor Expressed in Myeloid Cells-1) é liberado, o qual é considerado um importante marcador para infecção bacteriana, (Gibort et al., 2004a; Gibot et al., 2004b; Determann et al., 2006). O conceito básico do tratamento do sistema de canais se baseia na remoção mecânica e química dos irritantes do interior de canais infectados, sua modelagem, sua obturação e selamento coronário, propiciando o reparo de lesões periapicais. Durante o preparo biomecânico a solução irrigadora mais utilizada é o hipoclorito de sódio e, principalmente por sua ação antimicrobiana (Haapasalo et al., 2005; Martinho & Gomes, 2008; Gomes et al., 2009; Valera et al., 2008). Entretanto, o preparo biomecânico não elimina completamente a microbiota presente nos canais, sendo necessária a utilização de medicação intracanal (Menezes et al., 2004; Martinho et al., 2008; Valera et al., 2010; Maekawa et al., 2011). O hidróxido de cálcio tem sido a substância de escolha para medicação intracanal por sua capacidade antimicrobiana, capacidade de dissolver tecido, induzir a mineralização (Camargo et al., 2006; Maekawa et al., 2011) e sua atividade anti-inflamatória. Com isso o presente estudo visa monitorar o processo inflamatório periapical e investigar endotoxinas antes e após o uso de diferentes medicações intracanaís, avaliar níveis de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteínas e seus antagonistas coletadas dos tecidos periapicais; correlacionando estes níveis com a presença de sintomatologia clínica e área de destruição óssea.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: cep@fzjc.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 754.621

**Objetivo da Pesquisa:**

Os objetivos do presente estudo são:

- 1) Estudar o perfil inflamatório das lesões periapicais de dentes com infecções endodônticas primárias através dos níveis das citocinas pró-inflamatórias: IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ; correlacionando com a presença de sintomatologia clínica;
- 2) Investigar os níveis das metaloproteinases: MMP1/ TIMP1, MMP1/TIMP2, MMP9/TIMP1 e MMP9/TIMP2, presentes nos tecidos periapicais de dentes com infecções endodônticas primárias e lesão periapical; correlacionando com a presença de sintomatologia clínica;
- 3) Correlacionar os níveis das citocinas pró-inflamatórias IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF $\alpha$  e seus antagonistas IL1-RA, IL6-RA, e TNF-R1, presentes nos tecidos periapicais;
- 4) Estudar a efetividade de diferentes mediações intraoais no controle do processo inflamatório periapical, através do monitoramento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias [IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$ ] e MMPs [MMP1/TIMP1, MMP1/TIMP2, MMP9/TIMP1, MMP9/TIMP2] coletadas dos tecidos periapicais. Vinte dentes unirradiáveis com necrose pulpar serão selecionados.

Após, será realizado o PBM utilizando Mtwo +NaOCl 2,5%. Em seguida, os dentes serão divididos aleatoriamente em 2 grupos de acordo com a mediação intraoal utilizada: GI [Ca(OH) $_2$  + solução salina fisiológica]; e GII [ Ca(OH) $_2$  + clorexidina gel 2%]. Para a análise dos biomarcadores inflamatórios, serão realizadas coletas utilizando cones de papel estéril/apirgêneo, ultrapassando 2mm além ápice para obtenção do fluido intersticial da lesão periapical. As coletas serão realizadas em dois momentos operatórios: coleta após PBM (Coleta inicial e CFI1) e coleta após 14 dias de mediação intraoal (Coleta final- CFI2). Citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases e seus antagonistas serão dosados através do teste imunoenzimático (ELISA). Para análise estatística os dados serão tabulados e analisados pelo SPSS for Windows e package Statistica 9.0.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

A presente pesquisa não apresenta riscos para a saúde dos pacientes

**Benefícios:**

O presente estudo, visa inovar a linha de pesquisa, estudando de forma direta do processo inflamatório estabelecido no tecido periapical, através da coleta do fluido intersticial direto da lesão periapical, serão avaliados não só os níveis das citocinas inflamatórias e metaloproteinases, mas também tem por objetivo comparar os níveis das mesmas com seus antagonistas, dados

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo 777  
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@focj.unesp.br

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



Continuação do Parecer: 754.8/1

importantes ainda não apresentados na literatura endodôntica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

O presente projeto visa monitorar o processo inflamatório envolvido nas lesões periapicais de origem endodôntica, através dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases e seus antagonistas antes e após a terapia endodôntica, avaliando o suposto efeito anti-inflamatório de mediações à base de  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ . Espera-se obter dados relevantes quanto níveis das citocinas pró-inflamatórias, metaloproteinases e seus antagonistas, correlacionando-os com a presença de sintomatologia clínica e grau de destruição óssea periapical.

**3.4.1 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases e seus antagonistas**

Posteriormente todas as coletas, as amostras armazenadas em solução tampão contendo 0,1% de solução Tween 20 e 1  $\mu\text{L}$  de coquetel de inibidores de proteases (Sigma Aldrich Inc., St. Louis, MO, USA), serão agitados por 30 minutos, centrifugados a 10000 rpm por 5 minutos, e divididas em aliquotas para a quantificação das citocinas e metaloproteinases por meio de ensaio imunoenzimático (ELISA- enzymelinked immunisorbent assay). Os biomarcadores avaliados serão a IL- $\beta$ , IL-6, TNF- $\gamma$ ; MMP1/TIMP1, MMP1/TIMP2, MMP9/TIMP1 e MMP9/TIMP2 através do uso de kits laboratoriais específicos (Human Quantikine, R&D Systems, Minneapolis, EUA). Todos os reagentes serão levados a temperatura ambiente e a solução diluente será adicionada em cada poço contendo o anticorpo monoclonal específico contra a citocina pró-inflamatória ou metaloproteinase a ser quantificada. Os padrões e amostras serão adicionados aos poços, permitindo a ligação da citocina ao anticorpo imobilizado. Após período de incubação recomendado pelo fabricante, os poços serão lavados com solução tampão um segundo anticorpo policlonal específico contra a citocina, e conjugado a fosfatase alcalina será adicionado. As placas serão novamente incubadas e lavadas. A seguir, será adicionado em todos os poços o substrato (NaDPH), que inicia a reação colorimétrica catalisada pela fosfatase alcalina, seguido de incubação e adição da solução amplificadora da reação colorimétrica. Após novo período de incubação, a solução de parada será adicionada. O desenvolvimento e a intensidade da cor serão quantificados utilizando um leitor de placas para ELISA. A curva padrão será feita com os padrões fornecidos no kit pelo fabricante.

**FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS**

Análise estatística Os dados serão introduzidos numa planilha de cálculo e inicialmente estatisticamente analisados usando SPSS for Windows (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). O teste exato de Fisher ou de Qui-quadrado de Pearson, quando apropriados, serão usados para se testar a hipótese de que não existe nenhuma relação entre os aspectos clínicos e níveis de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases. Teste de Friedman será utilizado para comparar os níveis de citocinas pró-inflamatórias, endotoxinas, metaloproteinases e seus antagonistas. Para

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777  
 Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
 UF: SP Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
 Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: ceph@focjc.unesp.br



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



Continuação do Parecer 754/2014

análise de regressão linear múltipla, os dados coletados serão introduzidos numa planilha de cálculo e estatisticamente analisados usando package Statistica 9.0 (Sta-Soft Inc, Tulsa, Ok) de acordo com a equação  $Y_i = a + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_iX_i$ . Variações clínicas tais como dor à palpação ou dor à percussão serão fixadas como variáveis dependentes, com nível de significância de 5%. Odds ratio será utilizado para classificação das associações entre as variáveis clínicas e citocinas/ metaloproteinases, como positivas ou negativas. As associações positivas serão consideradas aquelas com média de Odds ratio  $\geq 0,2$ , e negativas  $\leq 0,5$ .

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Avaliamos que o TCLE atende minimamente ao objetivo a que se propõe, pois, apresenta a pesquisa, os pesquisadores e os riscos, em uma linguagem acessível, garantindo ainda a livre escolha do participante em todos os momentos da pesquisa.

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O pesquisador atendeu às solicitações do CEP.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Aprovação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O Colegiado concorda com o parecer emitido pelo relator.

SÃO JOSE DOS CAMPOS, 18 de Agosto de 2014

---

Assinado por:  
**JANETE DIAS ALMEIDA**  
(Coordenador)

Endereço: Av. Eng.º Francisco José Longo 777  
Bairro: Jardim São Dimas CEP: 12.245-000  
UF: SP Município: SÃO JOSE DOS CAMPOS  
Telefone: (12)3947-9078 Fax: (12)3947-9010 E-mail: cep@fojc.unesp.br