



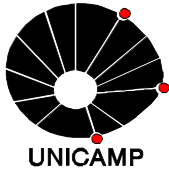
DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE

**MICROBIOLOGICAL ANALYSIS AND ENDOTOXINS,
PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND METALLOPROTEINASE
QUANTIFICATION IN PRIMARY ENDODONTIC INFECTIONS
WITH PERIAPICAL LESION**

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, DE ENDOTOXINAS, DE
CITOCINAS PRÓINFLAMATÓRIAS E DE METALOPROTEINASES
EM INFECÇÕES ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS COM LESÕES
PERIAPICAIS**

PIRACICABA

2014



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE

**MICROBIOLOGICAL ANALYSIS AND ENDOTOXINS,
PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND METALLOPROTEINASE
QUANTIFICATION IN PRIMARY ENDODONTIC INFECTIONS
WITH PERIAPICAL LESION**

**ANÁLISE MICROBIOLÓGICA, DE ENDOTOXINAS, DE CITOCINAS
PRÓINFLAMATÓRIAS E DE METALOPROTEINASES EM INFECÇÕES
ENDODÔNTICAS PRIMÁRIAS COM LESÕES PERIAPICAIS**

Thesis presentes to the Piracicaba Dentistry School of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Clinical Dentistry, in Endodontic Area.

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Doutor em Clínica Odontológica, na área de Endodontia.

Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo De Almeida Gomes

Este exemplar corresponde à versão final da tese defendida por Daniel Rodrigo Herrera Morante e orientada pela Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

H433a Herrera, Daniel Rodrigo, 1976-
Análise microbiológica, de endotoxinas, de citocinas pró-inflamatórias e de metaloproteínas em infecções endodônticas primárias com lesões periapicais / Daniel Rodrigo Herrera Morante. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Reação em cadeia da polimerase. 2. Endotoxinas. 3. Citocinas. 4. Metaloproteases. I. Gomes, Brenda Paula Figueiredo de Almeida. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Microbiological analysis and endotoxins, proinflammatory cytokines and metalloproteinase quantification in primary endodontic infections with periapical lesion

Palavras-chave em inglês:

Polymerase chain reaction

Endotoxins

Cytokines

Metalloproteases

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutor em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes [Orientador]

Carlos Estrela

Antônio Paulino Ribeiro Sobrinho

Francisco Jose de Souza Filho

Alexandre Augusto Zaia

Data de defesa: 14-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 14 de Fevereiro de 2014, considerou o candidato DANIEL RODRIGO HERRERA MORANTE aprovado.

Prof. Dra. BRENDA PAULA FIGUEIREDO DE ALMEIDA GOMES

Prof. Dr. CARLOS ESTRELA

Prof. Dr. ANTÔNIO PAULINO RIBEIRO SOBRINHO

Prof. Dr. FRANCISCO JOSE DE SOUZA FILHO

Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

ABSTRACT

Lipopolysaccharides (LPSs, known as endotoxins) present in the outer layers of Gram-negative bacterial envelope, and released during bacteria multiplication and death, can egress into periradicular tissues, acting as one of the most potent stimuli for immunocompetent cells in the release of inflammatory mediators and matrix metalloproteinases (MMPs). Thus, the objectives of this study were: **1)** To evaluate the influence of primarily infected root canal contents (bacterial and endotoxin contents) on host-immune response by interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α), prostaglandin E₂ (PGE₂), matrix metalloproteinases (MMP) MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13 production and to correlate their levels with clinical features (**chapter 1**); **2)** To investigate the influence of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ultrasonic activation after chemo-mechanical preparation (CMP) on eliminating/reducing oral bacterial lipopolysaccharide (LPS, known as endotoxins) and cultivable bacteria in teeth with pulp necrosis and apical periodontitis (**chapter 2**); **3)** To investigate the endotoxin levels from primary endodontic infection before and after CMP, and to determine their antigenicity against 3T3 fibroblasts through gelatinolytic activity of MMPs (**chapter 3**). **Methods:** Root canal content samples were taken from 24 primarily infected root canals with apical periodontitis by using sterile/apyrogenic paper points. Samples were taken at different clinical times: S1- before CMP; S2- after CMP; S3- after EDTA: G1- with ultrasonic activation (n=12) and G2- without ultrasonic activation (n=12). PCR technique (16S rRNA) was used for the detection of the target bacteria. Culture techniques were used to determine the number of colony-forming units (CFU). Limulus Amebocyte Lysate (LAL) was used to measure endotoxin. Cytokines and MMPs levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from samples that were taken passing 2 mm through the root apex after CMP. The levels of MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activity were measured using the zymography technique. The Pearson coefficient was used to correlate the amount of endotoxins with cytokine and MMP levels. Clinical data were set as dependent variables and correlated by individual correlation with each cytokine and MMP level. Friedman's and Wilcoxon tests was

used to compare the amount of bacteria and endotoxin contents at each clinical time. Data obtained from gelatinolytic activity was analysed using Anova and Tukey's tests. The significance levels always were set at 5% ($p < 0,05$). **Results:** IL-1 α , IL-1 β , TNF- α and PGE₂, as well as, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13 were detected in all samples. A correlation between endotoxin levels with cytokines and MMPs production was found ($p < 0.05$). Root canal exudation was positively correlated with high levels of TNF- α , and symptomatic teeth were correlated with IL-1 β , PGE₂ and MMP-8 ($p < 0.05$). CMP were effective in reducing endotoxins and bacterial load ($p < 0.05$). Higher values of endotoxin reduction were achieved when EDTA received ultrasonic activation (99.92%) compared with the no-activation group (99.56%; $p < 0.05$). No differences were found in the bacterial load reduction after EDTA when comparing G1 (99.98%) and G2 (99.93%) ($p > 0.05$). A correlation was found between the levels of endotoxins and MMP-2 expression ($p < 0.05$). No gelatinolytic activity of MMP-9 was observed. **Conclusion: 1)** Primarily infected root canal infection content is a potent stimulus factor for host-immune response by the production of IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , PGE₂, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13. **2)** Although CMP was effective in reducing bacteria and endotoxins, it was not able to eliminate them from all root canals analyzed. The ultrasonic activation of EDTA was efficient in reducing even more the endotoxins levels in the root canals of teeth with pulp necrosis and apical periodontitis. **3)** Root canal content from primary endodontic infection showed gelatinolytic activity for MMP-2.

Key Words: Polymerase chain reaction. Endotoxins. Cytokines. Metalloproteases.

RESUMO

O principal fator de virulência das bactérias Gram-negativas é representado pela liberação de seus subprodutos [Lipopolissacarídeos (LPS) – endotoxinas] presentes na membrana externa do envelope celular bacteriano. O acúmulo destes componentes bacterianos no canal radicular e a sua saída para os tecidos periapicais estimula o sistema imune do hospedeiro produzindo uma reação antígeno-anticorpo que gera uma resposta inflamatória a nível periapical. Esta reação é caracterizada pela expressão de mediadores químicos e enzimas, tais como as citocinas pró-inflamatórias e as metaloproteinases (MMPs). Assim, foram objetivos do presente estudo: **1)** avaliar a influência do conteúdo infeccioso diante as diferentes etapas do tratamento endodôntico de dentes com infecção primária, na resposta imune do hospedeiro para a produção de interleucina 1 alfa (IL-1 α), 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandina E₂ (PGE₂), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 correlacionando esses níveis com os sinais e sintomas clínicos (**capítulo 1**); **2)** avaliar o efeito da ativação do EDTA 17% com ultrassom na redução do conteúdo infeccioso de dentes com infecção primária (**capítulo 2**); **3)** investigar os níveis de endotoxinas de dentes com infecção primária, antes e após o preparo químico-mecânico (PQM) e determinar seu potencial antigênico contra fibroblastos 3T3 através da atividade gelatinolítica de MMPs (**capítulo 3**). **Método:** Foram selecionados 24 pacientes com necessidade de intervenção endodôntica por necrose do tecido pulpar e presença de lesão periapical. Amostras do conteúdo do canal radicular foram coletadas antes do PQM (S1), depois do PQM (S2) e depois do uso de EDTA 17% (S3) com e sem ativação com ultrassom (G1 e G2, respectivamente). Amostras para quantificação de citocinas e MMPs foram coletadas passando um cone de papel 2 mm além do ápice radicular depois do PQM. As amostras microbiológicas foram processadas por cultura para contagem de unidades formadoras de colônia (UFC) e identificação. PCR foi realizado utilizando primers espécie-específicos. As amostras de LPS foram analisadas pelo método Limulus Amoebocyte Lysate (LAL). As coletas de citocinas e MMPs foram quantificadas utilizando kits específicos pelo ensaio imunoenzimático de absorção (ELISA). A atividade

gelatinolítica foi avaliada por zimografia. Os níveis de produção das citocinas e MMPs foram correlacionados individualmente com os sinais e sintomas clínicos [dor à percussão (POP), dor à palpação (TOP), presença de exudato (EX)]. O teste de Pearson foi utilizado para avaliar a correlação entre endotoxinas e a produção de citocinas e MMPs. Os testes de Friedman e Wilcoxon compararam os níveis de endotoxina e carga microbiana em cada tempo operatório. Os dados obtidos pela atividade gelatinolítica foram analisados pelos testes de ANOVA e Tuckey. O nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$). **Resultados:** IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , PGE₂, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 foram detectados em todas as amostras. Foi encontrada correlação positiva entre os níveis de endotoxinas e de todas as citocinas e MMPs avaliadas ($p < 0,05$). EX foi correlacionado positivamente com TNF- α , enquanto os níveis de IL-1 β , PGE₂ e MMP-8 foram correlacionados com sintomatologia dolorosa (POP/TOP) ($p < 0,05$). O PQM reduziu significativamente os níveis de endotoxina e da carga bacteriana ($p < 0,05$). Maiores níveis de redução de endotoxinas foram registrados quando a irrigação com EDTA foi ativada com ultrassom (99.92%). Não foram encontradas diferenças significativas na redução da carga bacteriana entre G1(99.98%) e G2 (99.93%) ($p > 0,05$). Foi encontrada correlação entre os níveis de endotoxinas (S1) e a expressão de MMP-2 por fibroblastos. Não foi observada atividade gelatinolítica para MMP-9. **Conclusão: 1)** O conteúdo infeccioso/endotóxico é um potente estímulo para a resposta imune do hospedeiro na produção de IL-1 α , IL-1 β , TNF α , PGE₂, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13. **2)** O PQM consegue reduzir significativamente a carga microbiana e os níveis de endotoxinas. Adicionalmente, a ativação do EDTA com ultrassom promove uma redução maior dos níveis residuais de endotoxinas. **3)** O conteúdo infeccioso/endotóxico é um potente estímulo para a expressão gênica de MMP-2 por fibroblastos 3T3.

Palavras-Chave: Reação em cadeia da polimerase. Endotoxinas. Citocinas. Metaloproteases.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	xiii
AGRADECIMENTOS	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xxvii
INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1: Primarily root canal infectious contents X host-immune response in apical periodontitis disease by pro-inflammatory cytokines and MMPs secretion	9
CAPÍTULO 2: EDTA ultrasonic activation on endotoxins and cultivable bacteria removal	23
CAPÍTULO 3: Root canal content from primary endodontic infection and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells	35
CONSIDERAÇÕES GERAIS	51
CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	59
APÊNDICE 1	69
APÊNDICE 2	70

APÊNDICE 3	71
APÊNDICE 4	72
APÊNDICE 5	74
APÊNDICE 6	75
APÊNDICE 7	77
APÊNDICE 8	88
ANEXO 1	103
ANEXO 2	104

Dedico este trabalho...

A minha mãe **Charito**, que sempre me incentivou na procura dos meus sonhos; muitas vezes eu sem entender, e você fez o balanço perfeito para que esses sonhos não me tirem dos trilhos certos...

... com cada queda você sempre me ajudou a levantar e me mostrou que quando uma porta se fecha não é só uma janela que se abre pois teus braços nunca se fecharam...

... você me fez entender que poderia crescer e alcançar esses sonhos sempre que eu acreditasse em mim, do jeito que você sempre acreditou...

... se existe alguma coisa nessa vida da qual possa me sentir orgulhoso é de ser teu filho e gostaria ter mais de uma vida para te retribuir todo o que você me entrega...

... te amo mamá!

Aos meus irmãos **Milagros** e **Mo**, vocês são a minha inspiração e adoração total...

... **Mo**, fica claro que eu sou dentista por você, apesar da mãe ter ficado bravinha por eu desistir da medicina. Mas ver você me fez correr também atrás desse sonho, e o tempo me mostrou que a escolha foi certa... e a mãe entendeu!

... você é para mim o melhor dentista que existe. A sua competência e profissionalismo é minha inspiração...

... você é meu grande exemplo de vida e fortaleza. Sei que você sempre torce por mim e hoje essa vitória é também tua.

... **Mili**, a minha irmãzinha adorada!

... hoje você é uma mulher maravilhosa que eu admiro. Tenho certeza que a vida somente pode ter separado para você sucesso e satisfação pessoal e profissional. Tudo isso pela grande determinação e esforço que você põe em cada coisa que se propõe a fazer..

... você sempre me apoio incondicionalmente e sei do quanto você torce por mim...

... acredite que não existe tempo nem distancia que possa fazer a gente se afastar.

A meu pai **Eulogio** (*in memoriam*)

... embora a falta física que você faz seja imensurável, eu sinto você do meu lado todos os dias, a cada momento, e sei que hoje não é diferente e tenho você aqui...

... hoje você comemora comigo, te amo viejo!

A minha **Mechita** (*in memoriam*), você nunca gostou ser chamada “abuela” e não vai ser hoje que eu cometeria esse “pecado”...

... grande cúmplice mas sem deixar de ter a palavra crítica sempre acertada, e sobretudo sempre cheia de amor para dar a todos os que te rodeavam e admiravam

... sempre em nossos corações Mechita linda!

Agradeço...

Á **Deus**, pela vida, por cada segundo desta caminhada e pela maravilhosa família que elegeu para mim.

Eu queria escrever esta folha te agradecendo **Deus** por todo o tempo vivido durante o doutorado, mas no final percebi que esses agradecimentos não são diferentes dos que queria te agradecer pela vida mesma...

... obrigado por todas as pessoas que colocou no meu caminho... aprendi muito com cada uma...

... pela tua proteção... que sempre precisei e continuo precisando...

... pela fortaleza nos momentos difíceis...

... pela tua presença quando a solidão me fez duvidar...

... pelas alegrias... que foram muitas!

... pelas conquistas próprias e alheias...

... obrigado Deus por me permitir estar aqui hoje e poder olhar para minha mãe sabendo que ela está feliz. Obrigado por trazer minha mãe, minha irmã e meu cunhado para estarem presentes neste dia e porque sei que meu pai também estará conosco.

Agradeço...

À minha orientadora **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pela orientação deste trabalho, pelo exemplo ímpar de dedicação e competência em tudo o que faz...

... obrigado por ter acreditado no meu potencial...

... pelas suas palavras de estímulo...

... pela cobrança sempre acertada, e porque cada cobrança sempre vinha com um ensinamento, profissional e de vida.

Sem haver tido a oportunidade de conhecê-la pessoalmente, eu já admirava a senhora pelo seu trabalho, e o fato de ser seu orientado foi uma oportunidade pela qual estarei sempre agradecido...

... hoje conheço não somente a grande profissional, e sim também a grande pessoa que você é...

... obrigado por ter permitido conhecer sua bela família... e até cozinhar na sua casa!

... meu eterno agradecimento por tudo!

Agradeço...

Ao **Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho**, por todo o incentivo e oportunidade oferecidos na evolução da minha prática clínica, por todos os ensinamentos e as inúmeras vezes que me permitiu compartilhar com grandes profissionais da endodontia. A você minha gratidão e admiração como profissional e como pessoa.

À **Yileng Tay**, por ter sido peça importante na minha vida, por ter sido responsável direta dessa aventura chamada “Brasil”. Obrigado pelo apoio incondicional até nas horas mais difíceis e pelo incentivo constante na realização deste sonho. Não existem palavras que possam expressar toda minha gratidão a você.

“O agradecimento é a memória do coração”

(Lao Tsé)

A meus tios, tias, primos e primas por cada um dos, embora poucos, mas muito significativos momentos que pudemos compartilhar durante estes anos. Obrigado por cada palavra de apoio e por que a cada ano voltei sempre recarregado para continuar esta caminhada.

Agradeço...

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na pessoa do magnífico reitor **Prof. Dr. José Tadeu Jorge**.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade de Campinas (FOP-UNICAMP), na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**; à coordenadora dos Programas de Pós-Graduação da FOP-UNICAMP, **Profa. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia**; ao coordenador do curso de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da FOP-UNICAMP, **Prof. Dr. Márcio de Moraes**; ao **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, responsável pela área de Endodontia da FOP-UNICAMP.

Aos professores da área de Endodontia **Prof. Dr. Alexandre Augusto Zaia**, **Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, **Prof. Dr. Caio Cezar Randi Ferraz**, **Prof. Dr. Francisco José de Souza-Filho** e **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** e seu **Programa de Estudantes-Convênio de Pós-Graduação (PEC-PG)**, pela concessão da bolsa de estudo durante os meses de março a setembro de 2010.

À **Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**, pela concessão da bolsa de estudo e recursos oferecidos durante a execução dessa pesquisa (Processos nº2010/13498-9 e 2010/17877-4).

Aos professores da banca de qualificação **Prof. Dr. José Flávio Affonso de Almeida**, **Prof. Dr. Rafael Nobrega Stipp** e **Prof. Dr. Frederico Canato Martinho**, pela colaboração com as sugestões e aportes feitos para a melhoria deste trabalho.

Agradeço...

A todos os colegas da área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) que me acompanharam nessa caminhada, aos mais “antigos” que já estão na frente, aos que continuam e aos mais novos recrutados em 2013, todos sem dúvida fazem parte desta história, e para eles meu eterno agradecimento pelo aprendizado e convívio.

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de alguém sem nenhuma razão”

(Chico Xavier)

Adriana de Jesus Soares, Aline Gomes, Ana Carolina Caiado, Ana Carolina Correia, Ana Carolina Mascarenhas, Ana Carolina Pimentel, Andrea Pereira, Aniele Lacerda, Ariane Marinho, Carlos Augusto Pantoja, Carlos Meloni, Carlos Vieira Júnior, Carolina Santos, Cimara Barroso, Cláudia Suzuki, Daniela Miyagaki, Danna Moreira, Douglas Cecchin, Eliilton Pinheiro Júnior, Emmanuel Silva, Érika Clavijo, Ezilmara de Sousa, Fabrício da Silva, Felipe Anacleto, Fernanda Lins, Fernanda Signoretti, Francisco Montagner, Frederico Manhães, Frederico Martinho, Gabriel Rocha Campos, Giselle Abi Rached, Jefferson Marion, Joelson Brum, Juliana Melo, Juliana Nagata, Karine Schell Nicastro, Letícia Nóbrega, Maíra do Prado, Marcos Endo, Marcos Frozoni, Maria Rachel Monteiro, Mario Zuolo, Marlos Ribeiro, Nilton Vivacqua Gomes, Ricardo Ferreira, Shaiana Kawagoe, Tereza Pedrosa, Thaís Accorsi Mendonça, Thaís Mageste, Tiago Farias, Tiago Rosa e Wanderson Chiesa.

Agradeço...

A meu grande amigo e parceiro **Emmanuel Silva**, meu irmão em Piracicaba, em Niterói, em Lima e onde quer que a vida nos leve. Problemas podem se tornar oportunidades quando as pessoas certas se juntam. Obrigado pelas inúmeras vezes que desses problemas a gente conseguiu fazer uma festa, e às vezes até artigos. Obrigado por todo teu apoio e amizade Manu.

A minha querida amiga **Thais Mageste**, grande parceira nessa aventura. A gente passou por muitas coisas juntos e entre momentos difíceis, e outros com certeza muito mais agradáveis, conseguimos fortalecer uma bela amizade. Tenho a certeza que a pós graduação não teria sido a mesma sem você, obrigado pelo carinho, paciência, companheirismo e amizade sincera.

A meu grande amigo **Jefferson Marion**, o mais enfático dos meus amigos e também uma grande fonte de inspiração. Apesar da distância, cada um dos momentos compartilhados foi realmente de amizade verdadeira e enfática. Obrigado pela confiança e a oportunidade de poder conhecer a sua Faculdade assim como de poder coorientar teus alunos. Tenho a certeza que vamos ter muitos mais momentos enfáticos nesta travessia. Obrigado por todo teu apoio Jeff.

Ao **Tiago Rosa**, meu grande amigo Hawaii. Você fez parte importante dessa caminhada e a tua disposição para auxiliar faz de você uma pessoa muito querida, enrolada, mas muito querida. Saiba que fez muita falta nesses últimos meses, mas que sempre esteve presente na lembrança de todos os que tiveram a sorte de contar com tua amizade.

À **Amanda Falcão**, quem diria? Quem diria que a gente se encontraria? Quem diria que a partir das coincidências e dos momentos de estresse, poderíamos hoje rir e estarmos juntos? Obrigado por todo o apoio, cumplicidade e parceria. Você é o estímulo e inspiração constante na minha vida.

Aos meus queridos amigos **Anielita Lacerda, Cau Pantoja, Dani Miyagaki, Fernanda “SukiLins” Lins, Ju Nagata, Máira do Prado e Tereza Pedrosa**, pelo companheirismo e apoio ao longo destes anos. Tive a sorte de poder contar com cada um de vocês e espero ter retribuído de alguma maneira o muito que vocês me deram.

Aos recrutas 2013, **Andrea Pereira, Ana Carolina Correia, Felipe Anacleto e Marlos Ribeiro**, que rapidamente fizeram e continuam fazendo parte importante nessa aventura. Espero que nem o tempo nem a distância impeçam que a gente continue compartilhando novas e animadas histórias.

Aos meus co-orientandos de Iniciação Científica, **Enrique Durand e Zarina dos Santos**, obrigado pela confiança e pela grande experiência de trabalhar com vocês. Tenham a certeza que aprendi muito com vocês.

Aos meus co-orientandos na realização do Trabalho de Conclusão de Curso, os “paraguas” **David Torres e Enrique Durand**, e os caboverdianos **Staline Fatuda e Zarina dos Santos**. Acredito que não seja ao acaso que a Professora Brenda juntou esses estrangeiros. Agradeço imensamente a oportunidade e confiança de vocês.

Aos meus co-orientandos do Programa de Iniciação Científica Júnior (PIC-Jr) **Ana Rodrigues, Daniel Braga, Karolina Aguiar, Tatiane Lacerda e Paôla Mira**. Obrigado pelo trabalho, esforço e dedicação que cada um de vocês colocou nas nossas atividades. Saibam que trabalhar com vocês foi uma das experiências mais gratificantes nessa minha passagem pela FOP-UNICAMP e tenho certeza que daqui a pouco tempo vou chamar de colega a maioria de vocês. Sucesso sempre PICs!

Aos meus compatriotas, **Carlos Carranza** (Anatomia), **César Pomacóndor** (Materiais), em especial aos parceiros **Alfonso Sánchez** (Prótese), **Giancarlo De La Torre** (Prótese), **Jonny Burga** (Farmacologia) e **Victor Muñoz** (Prótese). Obrigado pelos memoráveis momentos de “peruanidad”.

A todos os colegas das diferentes áreas da pós-graduação, que de alguma ou outra maneira foram cúmplices do vivido nesses anos. Para todos vocês, minha grande e sincera gratidão.

Aos funcionários da área de Endodontia da FOP-UNICAMP, **Ana Cristina Godoy, Maicon Passini e Maria Helídia Pereira** e aos ex-funcionários **Daiane Scutton, Geovânia Caldas Almeida e Wanderly Almeida** pela disposição e auxílio em todos os momentos em que foi solicitado.

Ao funcionário do Centro de Microscopia e Imagens da FOP-UNICAMP, **Adriano Luis Martins**, pela sempre atenta disposição para o treinamento no manuseio tanto do microscópio eletrônico de varredura (MEV) como do microtomógrafo.

Aos pacientes que participaram e colaboraram neste trabalho, e a todos os que
contribuíram direta ou indiretamente para sua realização...

... muito obrigado!

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BPPN – Bacilos produtores de pigmento negro

Ca(OH)₂ – Hidróxido de cálcio

CHX – Clorexidina / Chlorhexidine

CMP – Chemo-mechanical preparation

EDTA – Ácido diaminotetracético / Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA - Ensaio imunoenzimático de absorção / Enzyme-linked immunosorbent assay

ICM – Intracanal medication

IL-1 α – Interleucina 1 alfa / Interleukin 1 alpha

IL-1 β - Interleucina 1 beta / Interleukin 1 beta

LAL – Lisado de Amebócito Limulus / Limulus Amebocyte Lysate

LPS – Lipopolissacarídeos

MIC – Medicação intracanal

MMP – Metaloproteinase da Matriz / Matrix metalloproteinase

PCR – Reação em cadeia de polymerase / Polymerase chain reaction

PGE₂ - Prostaglandina E₂ / Prostaglandin E₂

PQM – Preparo químico-mecânico

SS – Solução salina / Saline solution

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa / Tumor necrosis factor alpha

INTRODUÇÃO

As bactérias e seus subprodutos desempenham um papel etiológico primário no desenvolvimento e na perpetuação das doenças periradiculares (Kakehashi et al. 1965). A maioria das bactérias capazes de infectar os canais radiculares é oriunda da cavidade oral, sendo sua sobrevivência intra-radicular e suas propriedades patogênicas influenciadas por uma combinação de fatores, incluindo: interação sinérgica entre espécies, capacidade de interferir e evadir a resposta do hospedeiro, a liberação de Lipopolissacarídeos (LPS, endotoxinas) e a síntese de enzimas danosas aos tecidos do hospedeiro (Gomes et al. 1994a, Nair 2004, Martinho & Gomes 2008).

As infecções endodônticas primárias são polimicrobianas dominadas por bactérias anaeróbias estritas (Gomes et al. 1994a, 1994b, Siqueira et al. 2001, Jacinto et al. 2003, Gomes et al. 2004, Vianna et al. 2008, Estrela et al. 2010). Bacilos Gram-negativos anaeróbios estritos, particularmente espécies dos gêneros *Porphyromonas*, *Prevotella* e *Fusobacterium* estão envolvidas com sintomatologia clínica, e têm um papel importante na etiopatogênese das lesões inflamatórias periapicais (Griffie et al. 1980, Yoshida et al. 1987, Gomes et al. 1994a, 1996, Baumgartner et al. 1999, Siqueira et al. 2001, Jacinto et al. 2003, Sakamoto et al. 2006, Martinho & Gomes 2008).

O envolvimento das bactérias Gram-negativas, principalmente das espécies anaeróbias, em processos inflamatórios pulpares e periapicais parece estar relacionado com a presença de LPS, um dos constituintes do envelope celular bacteriano, estando presente na superfície da membrana externa da parede celular (Rietschel & Brade, 1992). Eles são liberados somente durante a divisão e lise celular ou ainda quando a célula é quimicamente tratada para remover o lipopolissacarídeo (Fabricius et al. 1982), podendo invadir os tecidos periapicais (Rietschel & Brade 1992) e agir como um potente estímulo para a resposta imune do hospedeiro na liberação de mediadores químicos da inflamação (Martinho et al. 2010a). Mesmo em concentrações baixas, o LPS bacteriano consegue ativar a

resposta inata do hospedeiro (Beutler, 2000, Martinho et al. 2012) gerando danos teciduais e destruição óssea (Darveau, 2000).

Quimicamente, endotoxinas são lipopolissacarídeos (Ohno & Morrison 1989), que consistem de uma porção “lípid A”, “core oligossacarídeo” (polissacarídeos) e “antígeno O”. A porção “lípid A” exerce a maior parte das atividades endotóxicas, a qual é referida como princípio endotóxico do LPS (Dixon & Darveau, 2005). A mudança em menor ou maior proporção da porção “lípid A” pode produzir efeitos distintos e diversos na modulação da resposta imune (Dixon & Darveau, 2005), podendo apresentar maior ou menor atividade endotóxica contra o organismo. Estudos revelam que a porção “lípid A” pode variar de espécie para espécie, de acordo com o número de grupos fosfatos, a quantidade e a posição dos ácidos graxos na molécula (Bainbridge et al. 2002, Darveau et al. 2004). O LPS que tem sido mais estudado pertence a *Escherichia coli*, o qual é capaz de iniciar diversas respostas biológicas, tais como: ativação do sistema complemento, indução de febre, ativação de macrófagos, citotoxicidade e reabsorção óssea (Davis et al. 1973, Martinho et al. 2010a, 2011).

Jacinto et al. (2005) quantificaram os níveis de endotoxinas presentes em canais radiculares infectados e os correlacionaram, juntamente com a presença de bactérias específicas, com os sinais e sintomas clínicos de origem endodôntica. Outros estudos também demonstraram uma correlação positiva entre os altos níveis de LPS e a sintomatologia clínica (Martinho et al. 2010a). As endotoxinas não agem diretamente sobre as células, mas através da ativação do sistema imune, sendo responsáveis pela ativação do sistema complemento, alterações estruturais, funcionais e metabólicas em diversos órgãos e células. A ativação de diferentes células do sistema imune resulta na liberação de múltiplos mediadores da inflamação. A consequente atração de osteoclastos, assim como o aumento das substâncias vasoativas e de neurotransmissores nas terminações nervosas da lesão periapical poderia resultar na potencialização da sintomatologia clínica (Nissan et al. 1995, Nakane et al. 1995, Silva et al. 2002, Martinho 2011).

A destruição tecidual característica da lesão periapical pode resultar tanto direta ou indiretamente (resposta imune) dos efeitos dos subprodutos bacterianos ou dos componentes bacterianos ou de ambos sob os tecidos periapicais (Mattison et al. 1987, Martinho et al. 2011a, Martinho et al. 2012). Sendo assim o acúmulo de componentes bacterianos, entre eles as endotoxinas, na região do periapical, podem estimular a liberação de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases da matriz (MMPs) por células imunocompetentes, como neutrófilos e monócitos, macrófagos e fibroblastos (Wilson et al. 1996, Martinho et al. 2011a, Martinho et al. 2012).

Estudos têm demonstrado que o preparo químico-mecânico não é capaz de eliminar completamente endotoxinas dos canais radiculares, mesmo após uma completa desinfecção (Vianna et al. 2007, Martinho & Gomes 2008). Ainda que o preparo químico-mecânico reduza 99% da carga microbiana dos canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical, a redução de endotoxinas ocorre entre 60-90% (Martinho & Gomes 2008, Martinho et al. 2010a, 2010b, 2011a, 2012, Xavier et al. 2013, Sousa et al. 2014).

Durante a terapia endodôntica várias substâncias químicas têm sido testadas, na eliminação e/ou inativação de endotoxinas (Tanomaru et al. 2003, Niwa et al. 1969, Buttler & Crawford 1982, Buck et al. 2001, Oliveira et al. 2007, Vianna et al. 2007, Martinho & Gomes 2008). Entretanto, o hipoclorito de sódio (NaOCl) - devido às suas propriedades antimicrobianas e ao seu potencial de dissolução de tecido orgânico (Byström & Sundqvist 1983, Siqueira et al. 1998, Estrela et al. 2007), e a clorexidina (CLX) – devido principalmente à sua atividade antimicrobiana (Gomes et al. 2001), baixa toxicidade (Onçag et al. 2003) e substantividade em tecido dentinário (Dametto et al. 2005) - são as substâncias químicas auxiliares mais utilizadas na terapia endodôntica (Martinho 2011).

O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) tem sido utilizado na terapêutica endodôntica desde 1957, quando Ostby o indicou para a instrumentação de canais atrésicos. A solução apresenta ação quelante (Heling et al. 1965, Seidberg & Schelder 1974, Kennedy et al. 1986, Sen et al. 1995, Kuga et

al. 1999, Yamashita et al. 2003), biocompatibilidade aos tecidos periapicais (Ostby, 1957, Segura et al. 1997) e capacidade de limpeza (Baker et al. 1975, McComb e Smith 1975, McComb et al. 1976, Brancini et al. 1983, Goldberg et al. 1986, Çalt & Serper 2000, Spanó et al. 2009, Herrera et al. 2013).

A associação de EDTA 17% ao NaOCl (McGurkin-Smith et al. 2005, Young et al. 2007, Ozdemir et al. 2010), tem se mostrado eficaz, visto que NaOCl isolado não é capaz de remover matéria inorgânica, papel que o EDTA desempenha com êxito, enquanto NaOCl remove matéria orgânica, aumentando assim a capacidade de limpeza do canal radicular, principalmente quanto à remoção de debris e *smear layer*. Além disso, associação de EDTA aos protocolos de PQM com NaOCl tem demonstrado efetividade na redução do conteúdo microbiano e de endotoxinas dos canais radiculares infectados *in vivo* (Ozdemir et al. 2007, Martinho et al. 2010a, 2010b).

A associação de EDTA 17% à clorexidina não promove alteração morfológica na estrutura dentinária quando visualizada por meio de microscopia de polarização, assim, essa associação não interfere na qualidade do substrato dentinário e não prejudica a adaptação do cimento obturador à dentina radicular (Moreira et al. 2009). Além disso, irrigação com EDTA permite maior remoção de *smear layer* quando a clorexidina é utilizada no PQM (Menezes et al. 2002).

A utilização do ultrassom na irrigação com EDTA potencializa a atividade quelante desta substância, melhorando a remoção de *smear layer* e do conteúdo microbiano dos canais radiculares (Van der Sluis et al. 2005). Por outro lado, o EDTA tem se mostrado eficaz na redução do conteúdo endotóxico dos canais radiculares (Martinho et al. 2010a, 2010b, 2011a, 2011b), abrindo assim a possibilidade de que concentrações baixas de LPS possam ser eliminadas nas etapas seguintes à instrumentação.

Desde 2005, trabalhos clínicos realizados na área de Endodontia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP-UNICAMP) quantificaram clinicamente endotoxinas presentes em dentes com infecções endodônticas

primárias (Jacinto et al. 2005, Vianna et al. 2007, Martinho & Gomes 2008; Gomes et al., 2009, Martinho et al. 2010a, 2010b, 2011a, 2011b, 2012, Sousa et al. 2014) e em infecções secundárias (Endo et al. 2012, Gomes et al. 2012). Tais estudos inicialmente apenas quantificaram os níveis de endotoxinas (Jacinto et al. 2005), procurando depois avaliar o efeito do preparo químico-mecânico com diferentes substâncias químicas auxiliares (e.g. NaOCl 2,5% e clorexidina gel 2%) na redução bacteriana e dos níveis de endotoxinas (Vianna et al. 2007, Martinho & Gomes 2008, Gomes et al. 2009, Martinho et al. 2010a, 2010b, 2011a, 2011b, 2012, Endo et al. 2012, Gomes et al. 2012, Sousa et al. 2014).

Vianna et al. (2007) determinaram os níveis e endotoxinas e de bactérias cultiváveis em 24 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical antes (C1) e após a instrumentação manual com clorexidina gel 2% (C2), após soro fisiológico (C3) e 7 dias após o uso das medicações hidróxido de cálcio, clorexidina gel e sua associação (C4). Todos os canais foram instrumentados 1 mm aquém do ápice. Endotoxinas e bactérias foram detectadas em 100% dos canais avaliados. Após o PQM a redução de endotoxinas foi de 55,6% e de bactérias 99,96%. Após 7 dias de medicação a concentração de endotoxinas reduziu em apenas 1,4% comparada com C2, e bactérias residuais foram encontradas em 13 casos (54,1%).

Martinho & Gomes (2008) quantificaram a presença de endotoxinas em 24 canais radiculares de dentes com necrose pulpar e presença de lesão periapical antes (C1) e após a instrumentação manual 1 mm aquém do ápice com NaOCl 2,5% (C2). Endotoxina foi quantificada através do método de LAL. LPS foi detectado em 100% dos canais radiculares estudados em C1 (mediana: 139 EU/mL). Após o preparo químico-mecânico com NaOCl 2,5% e instrumentação manual, endotoxina foi reduzida em 59,99% (mediana: 72,50 EU/mL). Os resultados mostraram que o NaOCl 2,5% foi efetivo na redução de endotoxinas dos canais radiculares. Associação positiva foi encontrada entre níveis elevados de endotoxina e presença de sintomatologia.

Gomes et al. (2009) compararam a efetividade do preparo químico-mecânico com limas manuais utilizando o NaOCl 2,5% e clorexidina gel 2% na remoção de endotoxina de canais radiculares de dentes com necrose pulpar e lesão periapical. Endotoxina foi detectada em 100% dos canais radiculares analisados: NaOCl 2,5% (mediana: 272 EU/mL), clorexidina gel 2% (152,46 EU/mL). Níveis de endotoxinas foram reduzidos para 86 EU/mL (NaOCl 2,5%) e 85 EU/mL (clorexidina gel 2%). Percentual de remoção de endotoxinas foi maior com o uso de NaOCl 2,5% ($p < 0,05$). Os autores concluíram que nenhuma das substâncias químicas auxiliares testadas foi capaz de eliminar endotoxinas dos canais radiculares.

Posteriormente, com a popularização da instrumentação com sistemas rotatórios, estudos foram feitos utilizando limas rotatórias de níquel titânio Mtwo[®] para a instrumentação dos canais radiculares em toda a sua extensão (Martinho et al. 2010a, 2010b, 2011a, 2011b, 2012). Particularmente o trabalho de Martinho et al. (2010b) mostrou uma redução de 98,06% das endotoxinas após o PQM com NaOCl 2,5% e irrigação passiva com EDTA 17%. Possivelmente a limpeza do canal radicular em toda sua extensão utilizando limas rotatórias *versus* instrumentação com limas manuais 1 mm aquém do ápice utilizado nos estudos prévios (Martinho & Gomes 2008, Gomes et al. 2009) pode ter contribuído ainda mais para a melhor desinfecção dos canais radiculares ($\approx 59\% \times 98,06\%$).

Como ainda não tinha sido avaliada clinicamente a efetividade do PQM utilizando clorexidina gel 2% associada à ativação do EDTA, procurou-se no presente trabalho avaliar tal efeito. Por outro lado, os resultados de Martinho et al (2010b) indicaram que o EDTA poderia ter uma ação na remoção das endotoxinas, pois atua nas camadas mais profundas ($\approx 130\mu\text{m}$) da dentina infectada, que não é envolvida pelo PQM. Além disso, é um agente quelante forte que pode reagir com o Ca^{++} presente na molécula de lípidio A (o centro bioativo de endotoxina) afetando assim a sua estrutura. Como a utilização do ultrassom na irrigação com EDTA potencializa a atividade quelante desta substância, melhorando a remoção de *smear layer* e do conteúdo microbiano dos canais

radiculares (Van der Sluis et al. 2005), pensou-se então a avaliar o efeito da ativação do EDTA na redução do conteúdo microbiológico/endotóxico.

Tendo quantificado endotoxinas presentes nos canais radiculares, torna-se importante entender o real potencial inflamatório desta molécula na infecção endodôntica, assim como a determinação do potencial antigênico residual presente nos canais radiculares após preparo químico-mecânico. O padrão de resposta imune/inflamatória gerada frente aos microrganismos da infecção endodôntica é determinado pela rede de citocinas estabelecidas, que, por sua vez, depende da complexidade das vias celulares ativadas diante determinado estímulo externo. Neste sentido, o conhecimento do conteúdo infeccioso presente nos canais radiculares, assim como, a estratégia do tratamento endodôntico em sua eliminação, são importantes para contribuir com o sucesso da terapia endodôntica (Martinho 2011).

Citocinas pró-inflamatórias correspondem a um extenso grupo de moléculas proteicas envolvidas na emissão de sinais entre as células durante o desencadeamento das respostas imunes. Apesar de sua grande maioria ser produzida por células do sistema imune, muitas delas também originam de células que não são do sistema imune, agindo no sistema não-imune também. Têm função autócrina agindo na própria célula produtora, parácrina atuando em células próximas, e endócrina, quando sua ação é à distância. Atuam em concentrações baixíssimas e sua síntese habitualmente ocorre após estimulação antigênica (Varella & Forte, 2001; Fukushima et al., 2010).

Citocinas tais como IL-1 β e TNF- α , produzidas primeiramente pelos macrófagos, podem iniciar uma cascata da inflamação resultando em destruição tecidual (Hong et al. 2004, Martinho et al. 2011a, Martinho et al. 2012). Estudos têm demonstrado a expressão de mRNA de diversos mediadores da inflamação a partir de amostras de fluido intersticial de lesões periapicais (De Brito et al. 2012, Tavares et al. 2012, 2013).

MMPs são importantes enzimas metalo-dependentes e as maiores responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular, agindo no desenvolvimento, modelagem e destruição dos tecidos orais (Hayakawa 1998, Hannas et al. 2007, Page-McCaw et al. 2007, Paula-Silva et al. 2010). As MMPs são as maiores responsáveis pela degradação do colágeno durante a destruição dos tecidos periodontais (Birkedal-Hansen et al. 1993, Van der Zee et al. 1996, Chang et al. 2002, Nishikawa et al. 2002, Rossa-Junior et al. 2005, Paula-Silva et al. 2010). Altos níveis de MMPs nos tecidos periodontais promovem o desequilíbrio entre a produção e degradação do colágeno, causando perda da inserção dental (Hernandez et al. 2006, Sorsa et al. 2006). MMP-2 e MMP-9, conhecidas como gelatinasas, têm sido descritas na presença de cistos e granulomas periapicais (Lin et al. 1997, Shin et al. 2002, Paula-Silva et al. 2010).

Pouco se conhece a respeito das interações entre as diferentes MMPs e a repercussão destas sobre os tecidos periapicais. Contudo, perguntas surgem quanto ao efeito citotóxico do conteúdo infeccioso dos canais radiculares, principalmente da carga de LPS e seu potencial antigênico na perpetuação do processo inflamatório periapical, assim como dos diferentes padrões de interação entre os mediadores da inflamação e as MMPs.

Esta pesquisa foi dividida em 3 capítulos, tendo como principais objetivos: **1)** avaliar a influência do conteúdo infeccioso diante as diferentes etapas do tratamento endodôntico de dentes com infecção primária, na resposta imune do hospedeiro para a produção de interleucina 1 alfa (IL-1 α), 1 beta (IL-1 β), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), prostaglandina E₂ (PGE₂), MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e MMP-13 correlacionando esses níveis com os sinais e sintomas clínicos (**capítulo 1**); **2)** avaliar o efeito da ativação do EDTA 17% com ultrassom na redução do conteúdo infeccioso de dentes com infecção primária (**capítulo 2**); **3)** investigar os níveis de endotoxinas de dentes com infecção primária, antes e após PQM e determinar seu potencial antigênico contra fibroblastos 3T3 através da atividade gelatinolítica de MMPs (**capítulo 3**).

CAPÍTULO 1 – Primarily root canal infectious contents X host-immune response in apical periodontitis disease by pro-inflammatory cytokines and MMPs secretion

ABSTRACT

Introduction: The aim of this study was to evaluate the influence of primarily root canal infectious contents (bacterial and endotoxin content) on host-immune response by interleukin (IL)-1 α , IL-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α), prostaglandin E₂ (PGE₂), matrix metalloproteinases (MMP) -2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13 production and to correlate their levels with clinical features.

Methods: Root canal content samples were taken from 24 primarily infected root canals with apical periodontitis by using sterile/apyrogenic paper points. PCR technique (16S rRNA) was used for the detection of the target bacteria, and Limulus Amebocyte Lysate (LAL) assay for endotoxin measurement. Cytokines and MMPs levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) from samples that were taken passing 2 mm through the root apex with paper points. **Results:** Bacterial DNA and endotoxins were recovered from all root canal samples. *Porphyromonas gingivalis* was the most frequently bacterial species detected (17/24). A positive association was found between *P. endodontalis* and *F. nucleatum* ($P < .05$), and *P. gingivalis* and *P. micra* ($P < .05$). IL-1 α , IL-1 β , TNF- α and PGE₂, as well as, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13 were detected in all samples. A correlation between endotoxin levels with cytokines and MMPs production was found ($P < .05$). Root canal exudation was positively correlated with high levels of TNF- α , and symptomatic teeth were correlated with IL-1 β , PGE₂ and MMP-8 ($P < .05$). **Conclusions:** Primarily root canal infection content is a potent stimulus factor for host-immune response by the production of IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , PGE₂, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13.

Key Words

Endotoxin, cytokine, secretion, root canal infection, metalloproteinases

Lipopolysaccharides (LPSs, known as endotoxins) present on the outer layers of Gram-negative bacterial envelope (1), and released during bacteria disintegration, multiplication, and death (2), can egress into periradicular tissues (1), acting as one of the most potent stimuli for immunocompetent cells in the release of inflammatory mediators (3).

Several studies have reported the influence of infected root canal content in cytokines release (4-9). These inflammatory mediators, such as interleukin (IL)-1 β , tumor necrosis factor α (TNF- α), and prostaglandin E₂ (PGE₂) have been detected in periapical tissues and root canal exudates (10-14). IL-1 β has been correlated with clinical signs/symptoms and greater bone resorption (6); TNF- α stimulates the production of collagenase, PGE₂ and bone resorption-related factors (15); PGE₂ have been reported in painful/asymptomatic human dental pulps (12, 16). Moreover, IL-1 α , IL-1 β , and TNF- α were reported to be capable of inducing and regulating matrix metalloproteinases (MMPs) expression (17,18).

MMPs are zinc and calcium-requiring enzymes capable of degrading almost all extracellular matrix (ECM) and basement membrane components in normal tissue remodelling, and especially in tissue destructive diseases, including apical periodontitis (19, 20). Fibrillar collagens are the major components of periodontal ECM and during pathologic conditions, they are cleaved into smaller fragments by collagenases (MMPs -1, -8, and -13) and further degraded by active gelatinases (MMPs -2 and -9) and other non-specific tissue proteinases (21).

Thus, the aim of this study was to evaluate the influence of bacterial and endotoxin content from primarily infected root canals on host-immune response by IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , PGE₂, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13 production and to correlate their levels with clinical features.

Methods

Patient Selection

Twenty-four patients needing endodontic treatment who attended the Piracicaba Dental School, Piracicaba, Brazil, were included in this study. Samples were collected from 24 root canals with pulp necrosis, all showing radiographic

evidence of apical periodontitis. The age of the patients ranged from 22–74 years. Nineteen single-root teeth and 5 multi-rooted teeth were investigated. The selected teeth showed the absence of periodontal disease. A detailed dental history was obtained from each patient. Those who had received antibiotic treatment during the last 3 months or who had any general disease were excluded. The Human Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School approved the protocol (132/2010) describing the sample collection for this investigation, and all volunteer patients signed an informed consent form.

Clinical and Sampling Procedures

For all cases, pain on palpation (POP), tenderness to percussion (TTP) and presence of exudate (EX) were recorded. All materials used in this study were heat sterilized at 200°C for 4 hours, thus becoming apyrogenic.

The teeth were isolated with a rubber dam, with crown and surrounding structures being disinfected with 30% H₂O₂ for 30s followed by 2.5% NaOCl for a further 30s. Subsequently, 5% sodium thiosulphate was used to inactivate NaOCl. The sterility of the external surfaces of the crown was checked by taking a swab sample from the crown surface and streaking it on blood agar plates, which were incubated aerobically and anaerobically.

A two-stage access cavity preparation was made without the use of water spray but under manual irrigation with sterile/apyrogenic saline solution and by using sterile/apyrogenic high-speed diamond burs. The first stage was performed to promote a major removal of contaminants. In the second stage, before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected according to the protocol described previously. A new sterile and apyrogenic bur was used, followed by irrigation of the root canal access with sterile saline solution. The endotoxin sample was taken at this time (ES) by introducing sterile pyrogen-free paper points (size #15; Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the full length of the canal (determined radiographically) and retained in position during 60 seconds. Immediately, the paper point was placed on a pyrogen-free glass and frozen at –80°C for future limulus amebocyte lysate (LAL) assay. The procedure was

repeated with three sterile paper points to obtain the microbiologic sample (MS). The paper points were pooled in a sterile tube containing 1 mL VMGA III (Viability Medium Goteborg Agar) transport medium, being immediately processed for DNA extraction to detect the target bacteria by molecular method (16S rRNA).

Next, the cervical and middle thirds of the root canals were prepared with the crown-down technique by using Gates Glidden burs in the sequence size #5, #4, #3 and #2 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). A K-file #10 (VDW, Munich, Germany) was used to obtain the full length of the root canal, using an apex locator (VDW Gold; VDW, Munich, Germany). Next, root canals were instrumented using the Mtwo rotary nickel-titanium system (VDW, Munich, Germany) until 40/0.4 file. During instrumentation root canals were filled with 1 mL of 2% chlorhexidine gel (CHX) (Endogel; Itapetinga, SP, Brazil) using a syringe (27-gauge needle) before the use of each instrument and immediately rinsed afterwards with 5 mL of saline solution. CHX was inactivated with 5 mL of 5% Tween-80 and 0.07% (w/v) lecithin solution during 1-minute period, which was removed with 5 mL of saline solution. Then, cytokine (CS) and MMP samples (MMPS) were collected introducing a size #35 paper point (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the root canal, passing 1 mm through the root apex, for 1 min. The paper points were stored at -80°C for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) analyses, as described later.

Bacterial Detection (Polymerase Chain Reaction 16S rRNA)

The reference bacteria strains used in this study were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC) and are listed as follows: *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Porphyromonas endodontalis* (ATCC 35406), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) and *Parvimonas micra* (ATCC 33270).

DNA Extraction. Microbial DNA was extracted from 24 MS as well as from ATCC bacteria, and purified with QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration (absorbance

at 260 nm) was determined by using a spectrophotometer (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE).

Polymerase Chain Reaction Assay. The polymerase chain reaction (PCR) reaction was performed in a thermocycler (MyCycler; Bio-Rad, Hercules, CA) at a total volume of 25 μL containing 2.5 μL 10 \times Taq buffer (1 \times) (MBI Fermentas, Mundolsheim, France), 0.5 μL dNTP mix (25 $\mu\text{mol/L}$ of each deoxyribonucleoside triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, and dTTP; MBI Fermentas, Hanover, MD), 1.25 μL 25 mmol/L MgCl_2 , 0.25 μL forward and reversal universal primers (0.2 $\mu\text{mol/L}$) (Invitrogen, Eugene, OR), 1.5 μL sample DNA (1 $\mu\text{g}/50 \mu\text{L}$), 1.5 μL Taq DNA polymerase (1 unit) (MBI Fermentas), and 17.25 μL nuclease-free water. Primer forward and reverse sequences as well as PCR cycling parameters are listed in Table 1.

Determination of Endotoxin Concentration (Turbidimetric Test and LAL assay)

The Turbidimetric Test/LAL assay (BioWhittaker, Inc, Walkersville, MD) using the LAL technique was used to measure endotoxin concentrations within the root canals. First, as a parameter for calculation of the amount of endotoxins in root canal samples, a standard curve was plotted by using endotoxins supplied in the kit with a known concentration (100 EU/mL) and their dilutions at the following final concentrations (ie, 0.01, 0.10, 1, and 10 EU/mL) according to the manufacturer's instructions.

Test Procedure. All reactions were accomplished in duplicate to validate the test and performed as described previously (22). Briefly, a 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA) was used for ES analyses. ES were suspended in 1 mL LAL water, vortexed and serial diluted to 10^{-1} . Immediately, 100 μL of the blank was added according to the standard endotoxin solutions at concentrations of 0.01, 0.10, 1, and 10 EU/mL, with 100 μL of the ES. The absorbencies of endotoxin were measured individually by means of an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (Ultramark; Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) at 340 nm. Because the mean absorbance value of the standards was directly proportional to the

concentration of endotoxins present in the samples, the endotoxin concentration was determined from the standard curve.

Measurements of Cytokines and MMPs Levels

For the measurement of cytokines (IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , PGE₂) and MMPs (MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13) levels, specific Quantikine ELISA kits (R&D Systems, Minnesota, USA) were used.

CS/MMPS were suspended in 1 mL LAL water and vortexed for 1 min. A monoclonal antibody specific for each cytokine/MMP were pre-coated onto a 96-well microplate. Standards and CS/MMPS were pipetted into the wells and any specific-kit cytokine/MMP present was bound by the immobilized antibody. After washing any unbound substances, an enzyme-linked polyclonal antibody, specific for each cytokine/MMP, was added to the wells. Following a wash to remove any unbound antibody-enzyme reagent, a substrate solution was added to the wells and color developed in proportion to the amount of specific –cytokine/MMP bounded in the initial step, following manufacturer instructions. The color development was stopped and the intensity of the color determined using a microplate reader, set at 540 nm. The cytokine/MMP concentration in each sample was determined from the standard curve.

Statistical Analysis

The Pearson coefficient was used to correlate the amount of endotoxins with cytokine and MMP levels. Clinical data were set as dependent variables and correlated by individual correlation with each cytokine and MMP level. Data were analysed using the SPSS package for Windows, version 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) with significance levels always set at 5% (P < .05).

Results

Bacteria and Endotoxin Detection

The ubiquitous-universal primer indicated the presence bacterial DNA in 100% of the MS (24/24). At least 1 target Gram-negative species was detected in

all 24 microbiological samples investigated. *Porphyromonas gingivalis* was the most frequently bacterial species detected (17/24). *Parvimonas micra*, present in 15/24 samples, was associated with at least one Gram-negative target bacterial species. A combination of two or more gram-negative target species was detected in 12 of 24 root canals. A positive association was found between *P. endodontalis* and *F. nucleatum* ($P < .05$), and *P. gingivalis* and *P. micra* ($P < .05$).

Endotoxin was detected in 100% of the root canals investigated (24/24), with a median value of 21.83 EU/mL (range, 0.10-104.00 EU/mL). A correlation between the levels of endotoxins with cytokines and MMPs production was found ($P < .05$).

Cytokine and MMP Production

IL-1 α , IL-1 β , TNF- α and PGE₂, as well as, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13 were detected in all periapical samples. The median values recorded for each cytokine and MMP is the following: IL-1 α (19.21 pg/mL), IL-1 β (100.39 pg/mL), TNF- α (24.88 pg/mL), PGE₂ (87.13 pg/mL), MMP-2 (815.00 pg/mL), MMP-3 (132.00 pg/mL), MMP-8 (70.50 pg/mL), MMP-9 (29.50 pg/mL), MMP-13 (47.52 pg/mL). Individual correlations between each cytokine/MMP and clinical signs/symptoms are shown in Table 2. The EX was positively correlated with high levels of TNF- α , and symptomatic teeth were correlated with IL-1 β , PGE₂ and MMP-8 ($P < .05$).

Discussion

In the present study, the ubiquitous-universal primer and the LAL assay indicated, respectively, that bacteria and endotoxins were presented in 100% of the root canal samples. Therefore, the infectious disease involved in apical periodontitis is the result of the interplay between bacteria, microbial virulence, and host defense, and this complex interaction is associated with clinical signs/symptoms.

Our results indicated a positive association between *P. endodontalis* and *F. nucleatum*. Such a finding indicates that a combination of 2 or more Gram-negative

bacterial species with different toxicity (24) plays a role in endodontic primary infection, turning such content far more complex to be interpreted by the host-immune response. Moreover, the association of *P. micra* (Gram-positive bacteria) with *P. gingivalis* (Gram-negative bacteria), turns the endodontic contents even more immunogenic (24) as the peptidoglycan, present in a significant amount in the Gram-positive bacterial cells, plays a synergistic effect on LPS antigenic activity (25) of the Gram-negative species. Yoshioka et al. (26) reported that LPS can bind to *P. micra* cells conferring to this Gram-positive microorganism the capacity to induce a strong TNF- α response in macrophage-like cells.

Previous *in vitro* investigations have stimulated macrophages cells with primary endodontic infectious contents, in order to determine the antigenic activity of the endodontic contents by production of IL-1 β , TNF- α and PGE₂ (6, 7). However, it has long been known that not only macrophage cell is in the onset of apical periodontitis disease. Of a relevance, in order to avoid such limitation, this study investigated the inflammatory biomarkers sampled straight from the interstitial fluid present in apical inflammatory process.

In the present study a positive correlation between the levels of endotoxin with cytokines and MMPs production was found, supporting that root canal content from primary endodontic infections can stimulate a host-immune response to produce a wide variety of pro-inflammatory cytokines and MMPs that are implicated in apical periodontitis development and perpetuation. This positive association is in agreement with previous studies that have shown an important relationship between infectious root canal content and immune/inflammatory response by cytokines (8, 9, 27) and MMPs (20, 28, 29) expression.

The recovery of IL-1 β and TNF- α secreted-cytokines in apical periodontitis is in consonance with previous studies that reported mRNA expression in interstitial fluid samples from apical periodontitis disease (27). However, not all mRNA gene expression will be converted in the form of protein during transcription and transduction process. A positive correlation was found between EX and TNF- α , and between symptomatic teeth (POP and/or TPP) and IL-1 β , PGE₂ and MMP-8, in agreement with previous studies that have showed the relationship between

different cytokines (6) and MMPs (29) with clinical signs and symptoms. Theoretically, endodontic procedures will reduce the antigenic activity of the root canal content allowing symptoms remission.

The results of the present study revealed that primary root canal infection content is a potent stimulus factor for host-immune response by the production of IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , PGE₂, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13. Further investigations are necessary to understand the real interaction between the different inflammation mediators and MMPs networks in the development and evolution of periapical disease and clinical signs/symptoms remission after endodontic procedures.

References

1. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scient Am* 1992;267:54–61.
2. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982;90:200–6.
3. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here? *Acta Odontol Scand* 2001;59:167–73.
4. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod* 2010;36:1766-9.
5. Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 2011;37:163-7.
6. 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;38:740-5.

7. 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;38:1053-7.
8. Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, de Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, Vieira LQ. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:344-53.
9. Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J* 2012;45:354-62.
10. Artese L, Piattelli A, Quaranta M, Colasante A, Musani P. Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod* 1991;17:483-7.
11. Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 1991;17:12-4.
12. McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland L. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *J Endod* 1991;17:97-100.
13. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:334-6.
14. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin 1b in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 1994;20:225-7.
15. Boyce BF, Li P, Yao Z, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005;54:127-31.
16. Cohen JS, Reader A, Fertel R, Beck M, Meyers WJ. A radioimmunoassay determination of the concentrations of prostaglandins E2 and F2 alpha in painful and asymptomatic human dental pulps. *J Endod* 1985;11:330-5.
17. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64(5 Suppl):474-84.

18. Shin SJ, Lee JI, Baek SH, Lim SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod* 2002;28:313-5.
19. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol* 2009, 54:764-771.
20. Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL: Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod* 2011, 36:231-237.
21. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, Gamonal J. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res* 2005, 40:199-207.
22. 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;34:268–72.
23. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291–301.
24. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BP. Antigenicity of primary endodontic infection against macrophages by the levels of PGE(2) production. *J Endod* 2011;37:602-7.
25. Jiang J, Zuo J, Hurst IR, et al. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:738–43.
26. Yoshioka M, Grenier D, Mayrand D. Binding of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides to *Peptostreptococcus micros* stimulates tumor necrosis factor alpha production by macrophage-like cells. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:118–21.
27. 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;38:481-5.

28. 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;39:444-8.
29. Shin SJ, Lee W, Lee JI, Baek SH, Kum KY, Shon WJ, Bae KS. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:548-54.
30. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Teles FR, Teles RP, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1368-71.
31. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Oliveira RR, Maciel KF, Vieira LQ, Sobrinho AP. The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. *J Endod* 2013;39:889-92.

Tables

TABLE 1. PCR Primer Pairs and Cycling Parameters Used for Detection of Bacteria Species in Primary Root Canal Infection with Apical Periodontitis

Target bacteria	Primer pairs (5`-3`)	Amplicon size	Cycles	
<i>Universal (16s rDNA)</i>	F: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T R: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG TT	466 bp	95°C/10 min, 40 cycles 95°C/10 min, 60°C/10 s, 72°C/25 s	Siqueira et al. J Endod 2001; 27(3):164-7
<i>Porphyromonas gingivalis</i>	F: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG R: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404 bp	95°C/2 min, 36 cycles 94°C/30 s, 60°C/1 min, 72°C/2 min, 72°C/2 min.	Siqueira et al. J Endod 2001; 27(3):164-7
<i>Porphyromonas endodontalis</i>	F: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC R: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672 bp	95°C/2 min, 36 cycles 94°C/30 s, 58°C/1 min, 72°C/2 min, 72°C/10 min.	Siqueira et al. J Endod 2001; 27(3):164-7
<i>Parvimonas micra</i>	F: AGA GTT TGA TCG TGG CTC AG R: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	207 bp	95°C/2 min, 36 cycles 94°C/30 s, 60°C/1 min, 72°C/2 min, 72°C/2 min.	Conrads et al. Clin Infect Diss 1997; 25:S94-7
<i>Prevotella intermedia</i>	F: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG R: TCA ACA TCT CTG TAT CTG TAT CCT GCG T	575 bp	95°C/2 min, 36 cycles 94°C/30 s, 58°C/1 min, 72°C/2 min, 72°C/10 min.	Siqueira et al. J Endod 2001; 27(3):164-7
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	F: AGT AGC ACA AGG GAG ATG TAT G R: CAA GAA CTA CAA TAG AAC CTG A	645 bp	95°C/5 min, 30 cycles 94°C/30 s, 50°C/30 s, 72°C/30 s, 72°C/5 min.	Avila-Campos et al. J Period 1999; 70:1202-8

TABLE 2. Individual Correlation between Different Cytokines/MMPs and Clinical Features.

Parameter	EX	POP	TTP
IL-1α	0.0656 <i>P</i> = .7606	0.0903 <i>P</i> = .0840	0.0304 <i>P</i> = .7721
IL-1β	-0.177 <i>P</i> = .0831	0.2932* <i>P</i> = .0361	0.2114* <i>P</i> = .0129
TNF-α	0.1776* <i>P</i> = .0161	0.3392 <i>P</i> = .5290	-0.0737 <i>P</i> = .2183
PGE₂	0.3085 <i>P</i> = .1136	0.4254* <i>P</i> = .0281	0.1425* <i>P</i> = .0429
MMP-2	-0.8435 <i>P</i> = .0683	-1.4385 <i>P</i> = .0882	-0.0536 <i>P</i> = .2994
MMP-3	0.8466 <i>P</i> = .2263	1.6911 <i>P</i> = .2196	-0.3466 <i>P</i> = .0733
MMP-8	0.0854 <i>P</i> = .2644	0.1067* <i>P</i> = .0329	0.0585 <i>P</i> = .0882
MMP-9	0.2042 <i>P</i> = .2144	0.3972 <i>P</i> = .5847	0.0453 <i>P</i> = .0699
MMP-13	0.2051 <i>P</i> = .3439	0.4894 <i>P</i> = .1944	0.0921 <i>P</i> = .0801

**P* < .05

CAPÍTULO 2 – EDTA ultrasonic activation on endotoxins and cultivable bacteria removal

ABSTRACT

Introduction: This clinical study was conducted to investigate the influence of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ultrasonic activation after chemo-mechanical preparation (CMP) on eliminating/reducing oral bacterial lipopolysaccharide (LPS, known as endotoxins) and cultivable bacteria in teeth with pulp necrosis and apical periodontitis. **Methods:** Samples were taken from 24 root canals at different clinical times: S1- before CMP; S2- after CMP; S3- after EDTA: G1- with ultrasonic activation (n=12) and G2- without ultrasonic activation (n=12). Culture techniques were used to determine the number of colony-forming units (CFU). Limulus Amebocyte Lysate (LAL) was used to measure endotoxin. Friedman's and Wilcoxon tests was used to compare the amount of bacteria and endotoxin contents at each clinical time ($P < .05$). **Results:** Endotoxins and cultivable bacteria were recovered in 100% of the initial samples (S1). CMP were effective in reducing endotoxins and bacterial load (all $P < .05$). Higher values of endotoxin reduction were achieved when EDTA received ultrasonic activation [G1, 0.01 EU/mL (range 0.01 – 0.75)] compared with the no-activation group [G2, 0.13 EU/mL (range 0.01 – 8.34)] ($P < .05$). No differences were found in the bacterial load reduction after EDTA when comparing G1 (99.98%) and G2 (99.93%) ($P > .05$). **Conclusions:** Although CMP was effective in reducing bacteria and endotoxins, it was not able to eliminate them from all root canals analyzed. The ultrasonic activation of EDTA was efficient in reducing even more the endotoxins levels in the root canals of teeth with pulp necrosis and apical periodontitis.

Key Words: Endotoxin, root canal infection, EDTA, ultrasonic.

Introduction

Gram-negative bacteria byproducts [Lipopolysaccharides (LPS - endotoxins)] can egress into periradicular tissues (1), acting as one of the most potent stimuli for immunocompetent cells in the release of chemical inflammatory mediators. These bacterial components evoke an intense inflammatory response (2) and mediate activation of destructive enzymes, which leads to severe tissue destruction in periapical tissues, known as apical periodontitis (3-8).

To achieve an optimal disinfection of the root canal system, endodontic treatment should not only rely on eliminating microorganisms and substrates (9) but also on reducing/eliminating LPS to levels compatibles with periradicular tissue healing.

EDTA is widely used in clinical practice because it has the property of removing the contaminated smear layer. It acts on the deep layers (~130 mm) of contaminated dentin not achieved by the chemomechanical preparation (10) and has a chelating action (30) on Ca⁺⁺ present in the lipid A portion of the endotoxin molecules (31). Therefore, we hypothesized that a significant improvement in the removal of endotoxins could be achieved after ultrasonic activation of EDTA.

This clinical study was conducted to investigate the influence of 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ultrasonic activation after chemo-mechanical preparation (CMP) on eliminating/reducing oral bacterial LPS and cultivable bacteria in teeth with pulp necrosis and apical periodontitis.

Methods

Patient Selection

Twenty-four patients needing endodontic treatment who attended the Piracicaba Dental School, Piracicaba, Brazil, were included in this study. Samples were collected from 24 root canals with pulp necrosis and radiographically visible apical periodontitis. Those who had received antibiotic treatment during the last 3 months or who had any general disease or periodontal disease were excluded. This study

was approved for the Human Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental (protocol 132/2010) and all volunteer patients signed a free informed consent form.

Clinical and Sampling Procedures

All materials used in this study were heat sterilized at 200°C for 4 hours, thus becoming sterile/apyrogenic. The teeth were isolated with a rubber dam, with crown and surrounding structures being disinfected with 30% H₂O₂ for 30s followed by 2.5% NaOCl for a further 30s. Subsequently, 5% sodium thiosulphate was used to inactivate NaOCl.

A two-stage access cavity preparation was made without the use of water spray but under manual irrigation with sterile saline solution (SS) and using high-speed diamond burs. In this stage it was promoted the major removal of contaminants. In the second stage, before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected according to the protocol described previously. New sterile/apyrogenic burs were used for root canal access. The endotoxin sample was taken at this time (S1) by introducing sterile pyrogen-free paper points (size #15; Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the full length of the canal (determined radiographically) and retained in position during 1 min. Immediately, the paper point was placed on a pyrogen-free glass and frozen at -80°C for future limulus amebocyte lysate (LAL) assay. The procedure was repeated with five sterile paper points to obtain the initial microbiological sample. The paper points were pooled in a sterile tube containing 1 mL VMGA III (Viability Medium Goteborg Agar) transport medium for microbial cultivation.

Then, the cervical and middle thirds of the root canals were prepared with the crown-down technique by using Gates Glidden burs in the sequence size #5, #4, #3 and #2 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). A K-file #10 (VDW, Munich, Germany) was used to obtain the full length of the root canal, using an apex locator (VDW Gold; VDW, Munich, Germany). Next, root canals were instrumented using the Mtwo rotary nickel-titanium system (VDW, Munich, Germany) until 40/0.4 file. During instrumentation root canals were filled with 1 mL

of 2% chlorhexidine gel (CHX) (Endogel; Itapetininga, SP, Brazil) using a syringe (27-gauge needle) before the use of each instrument and immediately rinsed afterwards with 5 mL of SS. A solution containing 5% Tween-80 and 0.07% (w/v) lecithin was used to inactivate CHX (5 mL/1 min), which was removed with 5 mL of SS. Then, the second endotoxin (S2) and microbiological samples were collected.

Afterwards, irrigation with 17% EDTA was performed, as follows: G1- root canal was flooded with 1 mL of EDTA and immediately activated for 1 min using an ultrasonic tip (25/.04, Helse Indústria e Comércio Ltda. SP, Brazil) that was inserted 2 mm below the root canal length and power setting at 30%; then, EDTA was aspirated and renewed, repeating this twice. G2- root canal was flooded with 1 mL of EDTA/1 min; then, EDTA was aspirated and renewed, repeating this twice. Finally root canals were irrigated with 5 mL of saline solution. A new endotoxin (S3) and microbiological sample were collected at this time.

Microbiological assessment – CFU counts

Inside the anaerobic chamber (Don Whitley Scientific, Bradford, UK), in an atmosphere of 10% H₂, 10% CO₂, and 80% N₂, the transport medium was shaken thoroughly in a mixer for 60 s (Vortex, Marconi, Piracicaba, SP, Brazil). Serial 10-fold dilutions (100 µL of the sample) were made up to 1 : 10⁴ in tubes containing Fastidious Anaerobe Broth (LabM, Bury, UK). First, 50 µL of each dilution was inoculated on Fastidious Anaerobe Agar (Lab M, Bury, UK) supplemented with 5% defibrinated sheep blood, 5 mg/L hemin, and 1 mg/L menadione. Plates were incubated anaerobically at 37°C/7 days. After incubation, the total CFU were counted using a stereomicroscope at 16x magnification (Zeiss, Oberkoren, Germany).

Determination of Endotoxin Concentration (Turbidimetric Test and LAL assay)

The Turbidimetric Test/LAL assay (BioWhitaker, Inc, Walkersville, MD) using the LAL technique was used to measure endotoxin concentrations within the root canals. First, as a parameter for calculation of the amount of endotoxins in root

canal samples, a standard curve was plotted by using endotoxins supplied in the kit with a known concentration (100 EU/mL) and their dilutions at the following final concentrations (ie, 0.01, 0.10, 1, and 10 EU/mL) according to the manufacturer's instructions.

Test Procedure. All reactions were accomplished in duplicate to validate the test. A 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA) was used in a heating block at 37°C and maintained at this temperature throughout the assay. Initially, the endotoxin samples were suspended in 1 mL LAL water supplied with the kit and agitated in vortex for 60 seconds and serial diluted to 10⁻¹. Immediately, 100 µL of the blank was added according to the standard endotoxin solutions at concentrations of 0.01, 0.10, 1, and 10 EU/mL, with 100 µL of the samples being added to a 96-well microplate in duplicate. The test procedure was performed following the manufacturer's instructions. The absorbencies of endotoxin were measured individually by means of an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (Ultramark; Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA) at 340 nm. Because the mean absorbance value of the standards was directly proportional to the concentration of endotoxins present in the samples, the endotoxin concentration was determined from the standard curve.

Statistical Analysis

Friedman's and Wilcoxon tests were used to compare the amount of bacteria and endotoxin contents at each clinical time (S1, S2 and S3). Data were analyzed using BioStat 5.0 (Belém, Pará, Brazil) with significance levels always set at 5% (P<.05).

Results

Overview of microbial detection by culture analysis

Bacteria were found in all initial microbiological samples (24/24). In S1 the CFU count median was 1.2 x 10⁷ (ranged from 2 x 10³ to 4 x 10⁷). Significant median percentage values of bacterial reduction were achieved after CMP (G1, 99.88%; G2, 99.86%) compared with the baseline samples (P <.05). No statistically

significant difference was found between the median values of bacterial reduction found in S3 compared with S2, independent of the group. The median percentage values of bacterial load final reduction found in G1 and G2 were 99.98% and 99.93%, respectively.

Quantification of Endotoxin Concentration

Endotoxins were recovered in 100% of the initial samples (S1). Individual median and range of values of endotoxins at different sampling times, as well as statistical significance at each sample time are shown in Table 1. CMP (S2) were effective in reducing endotoxins compared with S1 ($P < .05$) for G1 (92.95%) and G2 (94.28%). The median percentage values of endotoxins reduction found after irrigation with EDTA (S3) in G1 and G2 were 99.92% and 99.95%, respectively. Higher values of endotoxin reduction were achieved when EDTA received ultrasonic activation [G1, 0.02 EU/mL (range 0.01 – 0.75)] compared with no-activation group [G2, 0.13 EU/mL (range 0.01 – 8.34)] ($P < .05$).

Discussion

CFU counting is a reliable method for evaluating the potential of the antimicrobial agents to kill microorganisms. However, it is important to highlight that negative samples do not necessarily mean that the bacteria were absent, as they could be below the levels of detection (11). This fact might be a result of limitations of the sampling procedure, the culture techniques, and the presence of as yet uncultivated bacteria (11). Despite these limitations and from a clinical point of view, it seems that these low levels of bacteria are compatible with periradicular tissue healing, since negative cultures are reported to be correlated with favorable treatment outcome (12, 13).

In the present study, all initial samples (S1) were positive for the presence of bacteria, and the number of CFU values per canal ranged from 2×10^3 to 4×10^7 , which agree with previous studies (14-18). Our results indicated a substantial bacterial load reduction (G1, 99.88%; G2, 99.86%) after CMP with CHX (S2). These results are in agreement with previous studies, where irrespective of the

irrigant, a high reduction of bacterial load was achieved by mechanical action of the instruments against dentin walls and the flow and backflow of the irrigants (19). After irrigation with EDTA (S3), the bacterial load reduction found in G1 and G2 were 99.98% and 99.93%, respectively.

Endotoxins were detected in 100% of the initial samples (S1) collected from primarily infected root canals, which is in agreement with previous studies (3, 4, 14, 19, 20). Endotoxin removal during endodontic therapy seems to be important for the elimination of exudation in the periapical area as well as for the healing process of the apical periodontitis. After CMP (S2), the endotoxin reduction was 92.95% for G1 and 95.06% for G2 compared with S1 in each group. However, the greatest reduction was obtained after irrigation with EDTA (S3, G1: 99.92% and G2 99.56%). Although the threshold levels of endotoxin required in the root canals to damage the periapical tissues still have to be determined, it has long been known that minimal amounts of endotoxins are capable of inducing or maintaining an inflammatory process (18, 21). Thus, every subsequent procedures performed during endodontic treatment to obtain endotoxin-free root canals should be considered.

EDTA dramatically increases the rate of LPS-lipoprotein binding, presumably by increasing the disaggregation of LPS (22). LPS that is bound to lipoprotein does not bind to immune-host cells and is 100- to 1,000-fold less active than free LPS to induce pro-inflammatory cytokines expression (23). Our results indicated that higher values of endotoxin reduction were achieved when EDTA received ultrasonic activation compared with the no-activation group. These results could be explained by the intense flow of EDTA that ultrasonic activation creates against root canal walls and into those areas not reachable by root canal instrumentation, acting on remaining endotoxins left behind, and contributing to a successful disinfection of the root canal system.

Although CMP was effective in reducing bacteria and endotoxins, it was not able to eliminate them from all root canals analyzed. The ultrasonic activation of

EDTA was efficient in reducing even more the endotoxins levels in the root canals of teeth with pulp necrosis and apical periodontitis.

References

1. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scient Am* 1992;267:54–61.
2. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here?. *Acta Odontol Scand* 2001;59:167–73.
3. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC et al. Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod* 2010;36:1766-9.
4. Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 2011;37:163-7.
5. 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;38:740-5.
6. 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;38:1053-7.
7. Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, de Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, Vieira LQ. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:344-53.
8. Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J* 2012;45:354-62.
9. Silva LAB, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *J Endod* 2002;28:94–8.

10. Berutti E, Marini R, Angeretti A. Penetration ability of different irrigants into dentinal tubules. *J Endod* 1997;23:725–7.
11. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, Feres M, Gomes BP. Comparative analysis of endodontic pathogens using checkerboard hybridization in relation to culture. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:282-90.
12. Sjogren U, Figdor D, Persson S, Sundqvist G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:297–306.
13. Waltimo T, Trope M, Haapasalo M, Ørstavik D. Clinical efficacy of treatment procedures in endodontic infection control and one year follow-up of periapical healing. *J Endod* 2005;31:863–6.
14. 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;34:268–72.
15. Vianna ME, Horz HP, Conrads G, et al. Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2007;22:411–8.
16. Siqueira JF Jr, Rocas IN, Paiva SS, et al. Bacteriologic investigation of the effects of sodium hypochlorite and chlorhexidine during the endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:122–30.
17. Siqueira JF Jr, Paiva SS, Rocas IN. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. *J Endod* 2007;33:541–7.
18. Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod* 2013;39:959-64.
19. Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME. Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *J Endod* 2009;35:1350-3.

20. Gomes BPFA, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1082–6.
21. Wilson M, Reddi K, Henderson B. Cytokine-inducing components of periodontopathogenic bacteria. *J Periodontal Res* 1996;31:393–407.
22. Warren HS, Knights CV, Siber GR. Neutralization and lipoprotein binding of lipopolysaccharides in tolerant rabbit serum. *J Infect Dis* 1986;154:784–91.
23. Cavaillon JM, Fitting C, Haeffner-Cavaillon N, Kirsch SJ, Warren HS. Cytokine response by monocytes and macrophages to free and lipoprotein-bound lipopolysaccharide. *Infect Immun*;1990;58:2325–82.

TABLE

TABLE 1. Median values of endotoxins (EU/mL) and statistical significance*.

	S1		S2		S3	
	G1	G2	G1	G2	G1	G2
Median	25.68 ^a	29.75 ^a	1.81 ^b	1.47 ^b	0.02 ^c	0.13 ^b
Range	1.19 - 104.00	0.20 - 79.80	0.02 - 23.50	0.02 - 5.54	0.01 - 0.75	0.01 - 8.34

S1- before chemomechanical preparation (CMP); S2- after CMP; S3- after EDTA.

G1- EDTA ultrasonic activation; G2- without EDTA ultrasonic activation.

*Different letters indicate statistical significance at the same clinical time (P < .05)

CAPÍTULO 3 – Root canal content from primary endodontic infection and up-regulation of gelatinases in fibroblast cells

ABSTRACT

Aim To investigate endotoxin levels from primary endodontic infection before and after chemomechanical preparation (CMP), and determine their antigenicity against 3T3 fibroblasts through gelatinolytic activity of matrix metalloproteinases (MMPs).

Methodology Twenty-four root canals with primary endodontic infection and apical periodontitis were selected. Samples were collected by using paper points before (S1) and after chemomechanical preparation (CMP) (S2). Limulus amoebocyte lysate assay was used for endotoxin measurement. Fibroblasts were stimulated with root canal contents during 24 h. Supernatants of cell cultures stimulated with root canal contents were collected after 24 h to determine the levels of MMP-2 and MMP-9 gelatinolytic activity by using the zymography technique. Friedman and Wilcoxon tests were used to compare the amount of endotoxin before (S1) and after CMP (S2) ($P < 0.05$). Data obtained from gelatinolytic activity were analysed using Anova and Tukey's tests ($P < 0.05$).

Results Endotoxin was recovered in 100% of the samples. There was a significant reduction of the endotoxin levels after CMP ($P < 0.05$). A correlation was found between the levels of endotoxins and MMP-2 expression ($P < 0.05$). Root canal contents of initial samples (S1) significantly induced greater MMP-2 expression by fibroblasts when compared to S2 and non-stimulated group ($P < 0.05$). No gelatinolytic activity of MMP-9 was observed in S1, S2 and control group.

Conclusions Our results suggest that root canal content from primary endodontic infection showed gelatinolytic activity for MMP-2. Moreover, CMP was effective in reducing endotoxin levels and their antigenicity against fibroblasts on gelatinolytic activity.

Keywords: Root canal infection, gelatinases, endotoxin.

INTRODUCTION

Root canal content of primary endodontic infections showed strong correlation between oral bacteria lipopolysaccharide (LPS/endotoxin) and apical periodontitis (Jacinto *et al.* 2005, Vianna *et al.* 2007, Martinho & Gomes 2008, Gomes *et al.* 2009, 2012, Xavier *et al.* 2013, Sousa *et al.* 2014). LPS released during bacterial disintegration, multiplication, and death (Fabricius *et al.* 1982) can egress into periradicular tissue (Rietschel & Brade 1992), being potent stimuli against different cells (Dahlén 1980, Horiba *et al.* 1989, Hanazawa *et al.* 1991, Ko & Lim 2002, Hong *et al.* 2004) and leading to periapical inflammatory responses and bone destruction (Horiba *et al.* 1989, Takahashi 1998).

Matrix metalloproteinases (MMPs) constitute a family of zinc and calcium-dependent endopeptidases that are involved in the breakdown of the extracellular matrix and in the processing of a variety of biological molecules (Page-McCaw *et al.* 2007). They play an important role in many physiological such as embryonic development and tissue remodeling (Page-McCaw *et al.* 2007, Gill & Parks 2008). MMPs also participate in pathological processes, including inflammation, tumor growth and cancer (Birkedal-Hansen *et al.* 1993, Rydlova *et al.* 2008).

MMP-2 (gelatinase A) and MMP-9 (gelatinase B) are of particular interest because there is evidence that these MMPs play an important role in the pathogenesis of pulp, periodontal and periapical tissue destruction (Shin *et al.* 2002, Tsai *et al.* 2005). They are responsible for the degradation of the gelatin (denatured collagen) and type IV collagen, the major component of basement membranes (Collier *et al.* 2011). MMP-2 can also degrade collagens V, VII and X, decorin, elastin and fibronectin (Collier *et al.* 2011).

Since there are no reports evaluating the gelatinolytic activity induced by root canal content, the aim of this study was to investigate the endotoxin levels from primary endodontic infection and to determine their antigenicity against 3T3 fibroblasts through gelatinolytic activity of MMPs.

MATERIALS AND METHODS

Patient Selection

Twenty-four patients, presenting with dental pulp necrosis and radiographic evidence of apical periodontitis that were referred to the Piracicaba Dental School (Piracicaba, SP, Brazil), were selected for this study. None of them had received antibiotic treatment during the last 3 months or had any general disease. A detailed dental history was obtained from each patient. The Human Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School approved the protocol (132/2010) describing the sample collection for this investigation, and all volunteer patients signed an informed consent form.

Clinical and Sampling Procedures

All materials used in this study were heat sterilized at 200°C for 4 hours, thus becoming apyrogenic. Samples were collected from 24 root canals. The teeth were isolated with a rubber dam, with crown and surrounding structures being disinfected with 30% H₂O₂ for 30s followed by 2.5% NaOCl for a further 30s. Subsequently, 5% sodium thiosulphate was used to inactivate NaOCl. The sterility of the external surfaces of the crown was checked by taking a swab sample from the crown surface and streaking it on blood agar plates, which were incubated aerobically and anaerobically.

A two-stage access cavity preparation was made without the use of water spray but under manual irrigation with sterile/apyrogenic saline solution and by using sterile/apyrogenic high-speed diamond burs. The first stage was performed to promote a major removal of contaminants. In the second stage, before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected according to the protocol described previously. A new sterile and apyrogenic bur was used, followed by irrigation of the root canal access with sterile saline solution. The endotoxin sample was taken at this time (S1) by introducing sterile pyrogen-free paper points (size #15; Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the full length of the canal (determined radiographically) and retained in position during 60 seconds.

Immediately, the paper point was placed on a pyrogen-free glass and frozen at -80°C for future limulus amoebocyte lysate (LAL) assay and cell culture stimulation.

Next, the cervical and middle thirds of the root canals were prepared with the crown-down technique by using Gates Glidden burs in the sequence size #5, #4, #3 and #2 (Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland). A K-file #10 (VDW, Munich, Germany) was used to obtain the full length of the root canal, using an apex locator (VDW Gold; VDW, Munich, Germany). Next, root canals were instrumented using the Mtwo rotary nickel-titanium system (VDW, Munich, Germany) until 40/0.4 file. During instrumentation root canals were filled with 1 mL of 2% chlorhexidine gel (CHX) (Endogel; Itapetinga, SP, Brazil) using a syringe (27-gauge needle) before the use of each instrument and immediately rinsed afterwards with 5 mL of saline solution. Three milliliters of 17% EDTA were used after instrumentation followed by 5 mL of saline solution. After the instrumentation, CHX activity was inactivated with 5 mL of a solution containing 5% Tween-80 and 0.07% (w/v) lecithin during 1-minute period, which was removed with 5 mL of saline solution. Next, the second endotoxin sample (S2) was taken as previously described.

Determination of Endotoxin Concentration

The turbidimetric test (pyrogent 5000; BioWhittaker, Inc, Walkersville, MD) was used to measure endotoxin concentrations in the root canals by means of the LAL technique. It is a kinetic, quantitative assay for detection of endotoxin. Activated LAL converts the coagulogen into coagulagin to form turbidity in the sample. A sample is mixed with the reconstituted LAL reagent, placed in photometer, and automatically monitored over time until appearance of turbidity. The time required before the appearance of turbidity (reaction time) is inversely proportional to the amount of endotoxin. In the presence of a large amount of endotoxin, the reaction occurs rapidly; in the presence of a smaller amount of endotoxin, the reaction time is increased. The concentration of endotoxin within unknown samples can be calculated from a standard curve. Its wide range detection sensitivity [0.01–100

endotoxin units (EU/mL)] requires small amounts of dilutions of clinical samples, thus optimizing the laboratory time.

Standard Curve and Spiking Procedure

As a parameter for calculation of the amount of endotoxins existing in root canal samples, a standard curve was plotted by using the endotoxin of known concentration supplied by the kit (100 EU/mL), with its dilutions reaching the following final concentrations (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) according to the manufacturer's instructions.

To avoid inhibition or enhancement of the LAL, a known concentration of *Escherichia coli* endotoxin was added to the clinical samples, as recommended by the manufacturer's instructions (spike procedure). The unspiked samples together with the spiked ones (control) had their endotoxin concentration automatically calculated.

Test Procedure

Initially, no serial dilution of the clinical samples was considered. Thereafter, if the tested samples were found to be inhibitory to the turbidimetric LAL reaction, serial dilutions of the root canal samples would be made. All reactions were performed in duplicate to validate the test. A 96-well microplate (Corning Costar, Cambridge, MA) was used in a heating block at 37°C and maintained at this temperature throughout the assay. First, the endotoxin samplings were suspended in 1 mL of LAL water supplied by the kit and agitated in vortex for 60 seconds. Immediately afterwards, 100 µL of the blank, followed by the same volume of the standard endotoxin solutions (0.01, 0.1, 1, 10 EU/mL) and 100 µL of the samples, were added in duplicate to the 96-well microplate with their respectively positive controls. The test procedure was performed according to the manufacturer's instructions. The absorbance of endotoxins was individually measured by using an enzyme-linked immunosorbent assay plate reader (Ultramark; Bio-Rad Laboratories, Inc, Hercules, CA).

Calculation of Endotoxin Concentration

The microplate reader/WinKQCL Software (BioWittaker, Cambrex Co, Walkersville, MD) monitors the absorbance at 340 nm of each well of the microplate continuously throughout the assay. By using the initial absorbance reading of each well as its own blank, the reader determines the time required for absorbance at 0.03 absorbance units. This time is termed reaction time. The WinKQCL Software automatically performs a log/log linear correlation of the reaction time of each standard with its corresponding endotoxin concentration, and the standard curve parameters are printed. If the absolute value of the correlation coefficient (r) is 0.980, a polynomial model can be used to construct a standard curve and in turn predict endotoxin concentrations of test samples.

Cell Culture and Stimulation

Fibroblasts (3T3) were cultured in 100-mm culture plates by using Dulbecco modified Eagle minimal essential medium supplemented with 100 IU/ mL of penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of streptomycin and 10% heat-inactivated fetal bovine serum, and maintained in a humidified atmosphere at 37°C and 5% CO_2 until 90% confluence. Fibroblasts were released from 100-mm plates with 0.25% trypsin and 0.05% ethylenediaminetetraacetic acid (Gibco) for 5 min, counted in Newbauer chamber, and a total of 3×10^5 fibroblasts were grown for 24 hours in each well of six-well plates, deinduced by incubation for 8 hours in with fresh DMEM without serum, and stimulated with 60 μL of root canal contents during 24 hours. After time-point, the cell culture supernatants were collected and stored at -80°C to be used in the zymography assay.

Zymography assay

The activities of MMP-2 and MMP-9 of the cell culture supernatants were measured by a gelatin zymogram protease assay, as previously described (Silva *et al.* 2012). Aliquots of supernatants (20 μL) were mixed with sample buffer (2% SDS; 125 mmol L^{-1} Tris-HCl pH 6.8 10% glycerol and 0.001% bromophenol blue) and loaded on the gel. Then, prepared samples were subjected to electrophoresis

on 8% SDS polyacrylamide gels containing 0.1% gelatin. Following electrophoresis, the gels were washed twice in 2% Triton X-100 for 30 min at room temperature to remove SDS. The gels were then incubated at 37°C for 18 h in a substrate buffer containing 50 mmol L⁻¹ Tris-HCL and 10 mmol L⁻¹ CaCl₂ at pH 8.0 and stained with 0.5% Coomassie Blue R250 in 50% methanol and 10% glacial acetic acid. Protein standards were run concurrently, and approximate molecular weights were determined by plotting the relative mobilities of known proteins. Gelatinolytic activity was detected as unstained bands against the background of Coomassie blue-stained gelatin. Enzyme activity was assayed by densitometry using a Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis System (Kodak, Rochester, NY, USA), and the intensities of digitalized bands were normalized with regard to an internal standard (FBS) to allow intergel analysis and comparison.

Statistical analysis

The results obtained with the LAL test were statistically analysed by Friedman and Wilcoxon tests comparing the amount of endotoxin before (S1) and after CMP (S2). Triplicate experiments were performed to determinate gelatinolytic activity and data were analysed using one-way analysis of variance and Tukey's test by SPSS package for Windows, version 12.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) with significance levels always set at 5% (P< 0.05).

RESULTS

The LAL assay indicated that endotoxins were present in 100% of the root canal contents investigated (24/24) before (S1) and after CMP (S2), with a median value of 21.83 EU/mL (range, 0.10-104.00 EU/mL) for S1. As a result of CMP, endotoxin content was reduced to a median value of 0.52 EU/mL (range, 0.01-23.50 EU/mL) in S2. There was a significant difference in the median value of endotoxin detected in S1 and S2 (P<0.01). Analyses of the quantitative data revealed that the endotoxin content in S2 was significantly reduced (97.62%) after CMP (P<0.01).

Specific characterization of MMPs in the cell culture supernatants by gelatin zymography demonstrated that all groups induced different expression of MMP-2

(72 kDa) by 3T3 cells (Fig. 1 and 2). Root canal contents of initial samples (S1) induced significantly greater MMP-2 expression by fibroblasts when compared to S2 and control group ($P < 0.05$). No gelatinolytic activity of MMP-9 was observed in the S1, S2 and control group.

DISCUSSION

The quantitative turbidimetric test used in this study for endotoxin measurement has been reported as a precise method for the analysis of endotoxins in root canal infection allowing reproducibility (Martinho *et al.* 2011). Our results showed that endotoxins were present in 100% of the root canal samples from primarily infected root canals; results that are in agreement with previous investigations (Pitts *et al.* 1982, Jacinto *et al.* 2005, Vianna *et al.* 2007, Martinho & Gomes 2008, Gomes *et al.* 2009, Martinho *et al.* 2010, Gomes *et al.* 2012, Martinho *et al.* 2012, Xavier *et al.* 2013).

The auxiliary chemical substances (ACS) used in endodontic practice (NaOCl and CHX) are not effective in eliminating endotoxin from infected root canals (Gomes *et al.* 2009). In this study the ACS used was CHX that achieved a reduction of 97.62% of the initial endotoxin levels. Therefore, endotoxins were still detected in all root canal samples, agreeing with previous reports (Vianna *et al.* 2007, Martinho & Gomes 2008, Gomes *et al.* 2009, Martinho *et al.* 2010, Gomes *et al.* 2012, Martinho *et al.* 2012, Xavier *et al.* 2013).

Endotoxins can egress into periradicular tissues (Rietschel & Brade 1992), being potent stimuli against different cells, such as fibroblasts. Fibroblasts are major constituents of connective tissue, the predominant cell type of periodontal ligament and are the most important collagen producers in this tissue (McCulloch & Bordin 1991, Kumada & Zhang 2010). Fibroblasts secrete MMPs that are capable of initiating the degradation of extracellular matrix macromolecules, and this seems to be a key event for the progression of the inflammatory process. MMP-2 and MMP-9 are of great interest because they are synthesized by fibroblasts and pulp cells and have been implicated in the pathogenesis of periodontitis, oral

carcinogenesis, pulpal and periodontal ligament inflammation (Chang *et al.* 2001, Tsai *et al.* 2005, Fracalossi *et al.* 2010, Accorsi-Mendonça *et al.* 2013).

Collagen is the major insoluble fibrous protein in the extracellular matrix and in connective tissues. Collagen degradation is an important characteristic of apical periodontitis, and MMPs are likely candidates in this process because they are involved in its degradation (Paula-Silva *et al.* 2010).

In the present study, 3T3 cells were found to produce MMP-2 after exposure to root canal content from primary endodontic infection. Root canal contents of initial samples significantly induced greater MMP-2 expression when compared to samples after CMP. These results are explained by the dramatic reduction in the endotoxins levels of this content (97.62%). MMP-2 expression may induce an extracellular matrix proteolysis, and it seems to be a key initiating event for the progression of the inflammatory process (Huang *et al.* 2008).

No gelatinolytic activity of MMP-9 was observed in any sample. Previous studies have shown that MMP-9 can be expressed in small amounts when compared with MMP-2 (Chang *et al.* 2001, Huang *et al.* 2008). This result could also be attributed to a minimum activity, nondetectable as previously described (Silva *et al.* 2012).

Theoretically, the residual endotoxins found in our study after CMP (2.38%), if allowed access to the periradicular tissues after root canal filling, would only temporarily modulate host immune responses by expression of MMPs and other chemical mediators, such as cytokines. MMPs secretion is not a simple pathway and it is known that it is regulated by several gates and that the transcription of the majority of MMP genes is regulated by endogenous growth factors and cytokines (Birkedal-Hansen *et al.* 1993). The transcriptional effects of growth factors and cytokines are mediated through complex signaling pathways (Salo *et al.* 1991, Birkedal-Hansen *et al.* 1993). Interleukin-1 α , interleukin-1 β , and tumor necrosis factor α seem to be capable of inducing MMP expression (Birkedal-Hansen *et al.* 1993, Shin *et al.* 2002). Thus, this makes immune response networks even more complex and further studies are necessary to determinate the real role of MMPs in initiating and sustaining of periapical diseases.

To the best of our knowledge, this is the first attempt to evaluate the effects of root canal content from endodontic infection in order to determine their antigenicity against fibroblasts through gelatinolytic activity of MMPs. Our results suggest that root canal content from primary endodontic infection showed gelatinolytic activity for MMP-2. Moreover, CMP was effective in reducing endotoxin levels and their antigenicity against fibroblasts on gelatinolytic activity.

References

Accorsi-Mendonça T, Silva EJ, Marcaccini AM *et al.* (2013) Evaluation of gelatinases, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, and myeloperoxidase protein in healthy and inflamed human dental pulp tissue. *Journal of Endodontics* **39**, 879-82.

Birkedal-Hansen H (1993) Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction. *Journal of Periodontal Research* **28**, 500–10.

Chang YC, Yang SF, Hsieh YS (2001) Regulation of matrix metalloproteinases-2 production by cytokines and pharmacological agents in human pulp cell cultures. *Journal of Endodontics* **27**, 679–82.

Collier IE, Legant W, Marmer B, Lubman O, Saffarian S, Wakatsuki T, Elson E, Goldberg GI (2011). Diffusion of MMPs on the surface of collagen fibrils: the mobile cell surface-collagen substratum interface. *PLoS One* **6**, e24029.

Dahlén G (1980) Immune response in rats against lipopolysaccharides of *Fusobacterium nucleatum* and *Bacteroides oralis* administered in the root canals. *Journal of Dental Research* **88**,122–9.

Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, Möller AJ (1982) Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scandinavian Journal of Dental Research* **90**, 200–6.

Fracalossi AC, Miranda SR, Oshima CT, Franco M, Ribeiro DA (2010) The role of matrix metalloproteinases 2 and 9 during rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Journal of Molecular Histology* **41**, 19–25.

Gomes BP, Endo MS, Martinho FC (2012) Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *Journal of Endodontics* **38**, 1082–6.

Gomes BP, Martinho FC, Vianna ME (2009) Comparison of 2.5% sodium hypochlorite and 2% chlorhexidine gel on oral bacterial lipopolysaccharide reduction from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* **35**, 1350–3.

Hanazawa S, Sagiya T, Kitami H, Ohta K, Nishikawa H, Kitano S (1991) Monoclonal antibody against *Porphyromonas (Bacteroides) endodontalis* lipopolysaccharide and application of the antibody for direct identification of the species. *Journal of Clinical Microbiology* **29**. 2550–3.

Hong CY, Lin SK, Kok SH, et al. (2004) The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *Journal of Oral Pathology & Medicine* **33**, 162–9.

Horiba N, Maekawa Y, Abe Y, et al. (1989) Cytotoxicity against various cell lines of lipopolysaccharides purified from *Bacteroides*, *Fusobacterium*, and *Veillonella* isolated from infected root canals. *Journal of Endodontics* **15**, 530–4.

Huang F, Yang S, Chang Y (2008) Up-regulation of gelatinases and tissue type plasminogen activator by root canal sealers in human osteoblastic cells. *Journal of Endodontics* **34**, 291–4.

Jacinto RC, Gomes BPFA, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ (2005) Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *Journal of Medical Microbiology* **54**, 777–83.

Ko HJ, Lim SS (2002) Production of macrophage inflammatory protein (MIP)-1alpha and MIP-1beta by human polymorphonuclear neutrophils stimulated with *Porphyromonas endodontalis* lipopolysaccharide. *Journal of Endodontics* **28**, 754–7.

Kumada Y, Zhang S (2010) Significant type I and type III collagen production from human periodontal ligament fibroblasts in 3D peptide scaffolds without extra growth factors. *PLoS One* **5**, e10305.

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

Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC *et al.* (2010) Clinical investigation of the efficacy of chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *Journal of Endodontics* **36**, 1766-9.

Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA *et al.* (2011) Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *Journal of Endodontics* **37**. 163-7.

Martinho FC, Gomes BP (2008) Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. *Journal of Endodontics* **34**, 268–72.

McCulloch CA, Bordin S (1991) Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *Journal of Periodontal Research* **26**, 144–54.

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

Pitts DL, Williams BL, Morton TH (1982) Investigation of the role of endotoxin in periapical inflammation. *Journal of Endodontics* **8**, 10–8.

Rietschel ET, Brade H (1992) Bacterial endotoxins. *Scientific American* **267**, 54–61.

Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H, Larjava H (1991) Transforming growth factor-beta 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes. *The Journal of Biological Chemistry* **266**, 11436–41.

Shin SJ, Lee J, Baek SH, Lim SS (2002) Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *Journal of Endodontics* **28**, 313–315.

Silva E, Accorsi-Mendonça T, Almeida J, Ferraz C, Gomes B, Zaia A (2012) Evaluation of cytotoxicity and up-regulation of gelatinases in human fibroblast cells by four root canal sealers. *International Endodontic Journal* **45**, 49–56.

Sousa EL, Martinho FC, Nascimento GG, Leite FR, Gomes BP (2014) Quantification of Endotoxins in Infected Root Canals and Acute Apical Abscess Exudates: Monitoring the Effectiveness of Root Canal Procedures in the Reduction of Endotoxins. *Journal of Endodontics* **40**, 177-81

Takahashi K (1998) Microbiological, pathological, inflammatory, immunological and molecular biological aspects of periradicular disease. *International Endodontic Journal* **31**, 311–25.

Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC (2005) The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *Journal of Endodontics* **31**, 860–2.

Vianna ME, Hartz H-P, Conrads G, Zaia AA, Souza-Filho FJ, Gomes BPFA (2007) Effect of root canal procedures on endotoxins and endodontic pathogens. *Oral Microbiology and Immunology* **22**, 1–8.

Xavier AC, Martinho FC, Chung A *et al.* (2013) One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *Journal of Endodontics* **39**, 959-64.

Figures and Legends

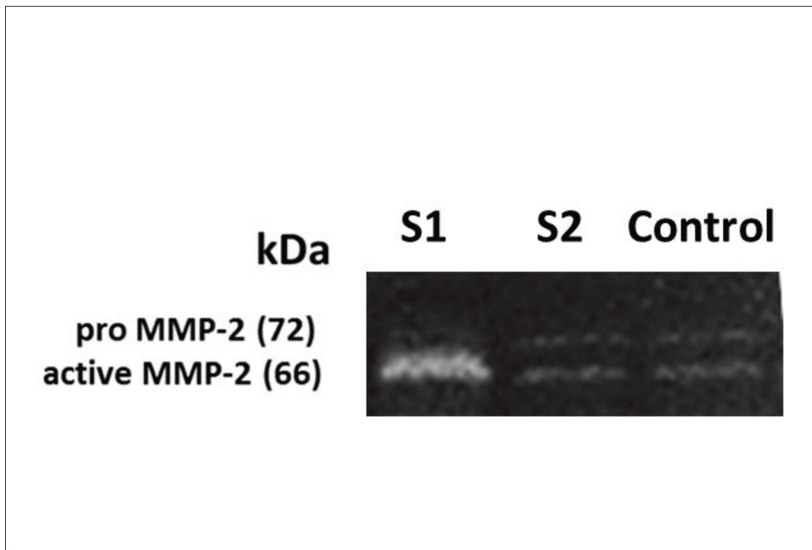


Figure 1 Levels of MMP-2 gelatinolytic activity before (S1) and after CMP (S2) as observed using zymography assay.

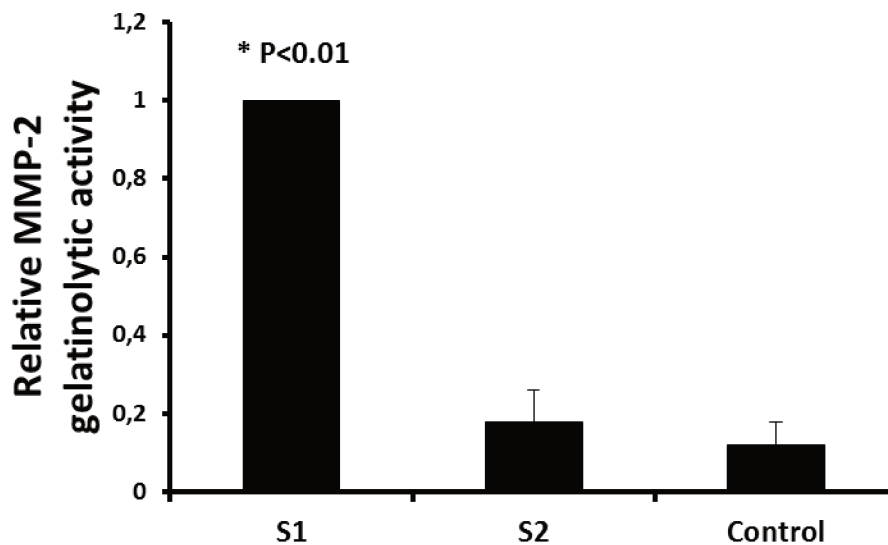


Figure 2 MMP-2 gelatinolytic activity before (S1) and after CMP (S2) analysed by one-way ANOVA and Tukey's test ($P < 0.05$)

CONSIDERAÇÕES GERAIS

A polpa dentária normalmente não contém microrganismos, mas pode tornar-se infectada principalmente através de uma lesão cáriosa, apresentando reações inflamatórias ou degenerativas. Quando uma alteração pulpar está presente e não é tratada, poderá evoluir para a necrose pulpar. Esta consiste na completa suspensão dos processos metabólicos do tecido pulpar, ou seja, falência de todo sistema vascular e nervoso que garante a vitalidade ao dente. Se esta infecção não for tratada, os produtos tóxicos bacterianos e da decomposição tecidual vão agredir os tecidos periapicais, dando início às alterações periapicais. A última, dependendo da severidade, principalmente em casos de abscessos periapicais agudos, pode gerar manifestações sistêmicas tais como aumento da temperatura, mal-estar e leucocitose (Gomes, 1995). Desta forma, o profissional deve ter conhecimento sobre as características histológicas, clínicas e radiográficas destas patologias para poder reconhecê-las e indicar a melhor opção de tratamento (Leonardi et al. 2011).

Os microrganismos presentes em canais radiculares infectados podem ser encontrados em diversos locais dos canais radiculares. Podem estar suspensos no lúmen do canal radicular (forma planctônica), com uma variedade imensa de tipos morfológicos consistindo em cocos, bacilos e formas filamentosas. Além disso, podem estar aderidos às paredes do canal radicular, formando um biofilme (forma séssil). Também podem ser encontrados penetrando nos túbulos dentinários, colonizando canais laterais, secundários e acessórios e formando biofilmes na região extrarradicular. O tempo da infecção é o maior fator influente na composição e localização desta microbiota (Gomes et al. 2013).

No presente estudo foi confirmada a presença bacteriana e de seus subprodutos, como o LPS, em todas as amostras iniciais coletadas de dentes com infecção endodôntica primária, indicando uma forte correlação entre bactérias (Takehashi et al. 1965) e LPS (Rietschel & Brade 1992, Dahlén et al. 1981, Pitts et

al. 1982, Tanomaru et al. 2003; Martinho et al. 2012) com a indução de periodontite apical.

A periodontite apical é o resultado da interação entre a resposta imune do hospedeiro e o conteúdo infeccioso dos canais radiculares (Bergenholtz 1990, Martinho et al. 2012). O conteúdo infeccioso age como uma fonte de espécies patogênicas e fatores de virulência nesta resposta do hospedeiro, estimulando ao sistema imune para secreção de citocinas, mediadores inflamatórios e MMPs que se espalham no tecido apical, criando e mantendo uma carga inflamatória crônica (Bainbridge et al. 2002, Paula-Silva et al. 2010, Martinho et al. 2012).

Estudos prévios relataram a capacidade antigênica desse conteúdo infeccioso (Ribeiro Sobrinho et al. 2002, Maciel et al. 2011, de Brito et al. 2012, Tavares et al. 2012, 2013) pela expressão de citocinas e mediadores inflamatórios. Em nossos resultados, quando analisada a relação dos níveis de endotoxinas com determinada citocina foi encontrada uma correlação positiva entre os níveis de LPS e a presença de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e PGE₂, em concordância com Martinho et al. (2012). Foi encontrada também uma correlação positiva entre os níveis de IL-1 β e PGE₂ e sintomatologia clínica, assim como os níveis de TNF- α e a presença de exsudato, em concordância com estudos prévios (Gomes et al. 2009, Martinho et al. 2010b, Martinho et al. 2012).

Diversos estudos têm mostrado a importância das MMPs durante o desenvolvimento, modelagem e destruição dos tecidos orais (Hayakawa 1998, Hannas et al. 2007, Page-McCaw et al. 2007, Paula-Silva et al. 2010). Quando analisada a relação dos níveis de endotoxinas com a presença das MMPs foi encontrada uma correlação positiva para todas as MMPs avaliadas (MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e MMP-13). Foi encontrada também uma correlação positiva entre os níveis de MMP-8 e MMP-9 com a presença de sintomatologia dolorosa. Por outro lado, Thompson et al. (2012) relataram a capacidade do EDTA

para inativar as MMPs, o que reforça a hipótese de que a ativação com ultrassom do mesmo poderia resultar numa potencialização deste efeito inibitório nas MMPs.

Os fibroblastos têm a capacidade de produzir MMPs, as mesmas que iniciam a degradação das macromoléculas da matriz extracelular. Nesse processo as MMP-2 e MMP-9 têm grande importância, sendo sintetizadas principalmente por fibroblastos e sendo protagonistas diretas dos processos patológicos periapicais (Chang et al. 2001, Tsai et al. 2005, Fracalossi et al. 2010, Accorsi-Mendonça et al. 2013). Em nossos resultados, quando analisada a capacidade antigênica do conteúdo infeccioso presente inicialmente nos canais radiculares sobre fibroblastos, pela expressão de MMP-2 e MMP-9, os resultados mostraram uma alta atividade gelatinolítica para MMP-2. Porém, não foi observada a expressão de MMP-9, o que vai ao encontro com os resultados de estudos prévios (Chang et al. 2001, Huang et al. 2008, Silva et al. 2012) que relatam uma baixa expressão e atividade não detectável da MMP-9 quando comparada a MMP-2. Quando estimulados os fibroblastos pelo conteúdo infeccioso coletado após o PQM, a expressão de MMP-2 foi reduzida significativamente a níveis semelhantes ao grupo controle (células não estimuladas), enfatizando a importância da desinfecção alcançada pelo PQM na redução da inflamação periapical.

No presente estudo foi investigado o padrão de resposta imune/inflamatória gerada frente aos microrganismos e endotoxinas e como o tratamento endodôntico poderia influenciar positivamente na redução da inflamação periapical. O acúmulo de componentes bacterianos, entre eles as endotoxinas, na região do periapical, pode estimular uma resposta antígeno-anticorpo no sistema imune do hospedeiro com a expressão de mediadores químicos e enzimas que regulam o processo inflamatório e a consequente destruição tecidual.

No intuito de reduzir esse fator de agressão ao hospedeiro, diversos protocolos de instrumentação/irrigação e de uso de substância químicas auxiliares têm sido propostos, a maioria utilizando o NaOCl como irrigante (Tanomaru et al.

2003, Niwa et al. 1969, Buttler & Crawford 1982, Buck et al. 2001, Oliveira et al. 2007, Martinho & Gomes 2008).

A CHX tem se mostrado como uma substância química com capacidade de desinfetar os canais radiculares e reduzir o LPS a níveis semelhantes aos obtidos pelo NaOCl, quando foi utilizada a instrumentação manual (Gomes et al 2009). Entretanto, ainda não tinha sido avaliada clinicamente a efetividade do PQM utilizando-se de instrumentos rotatórios e de clorexidina gel 2% como substância química auxiliar. Nossos resultados mostraram que a redução do conteúdo endotóxico foi maior (92.95%) que a alcançada por instrumentos manuais (55,6%) (Vianna et al 2007, Gomes et al. 2009).

Entretanto, nem a CHX nem o NaOCl foi capaz de eliminar completamente o conteúdo endotóxico dos canais radiculares. Desta forma, torna-se necessário o estabelecimento de protocolos de instrumentação e irrigação eficientes que consigam atuar onde as substâncias químicas não tem ação, principalmente sobre os biofilmes bacterianos, cuja remoção ocorre principalmente pela ação mecânica dos instrumentos endodônticos.

Estudos *in vitro* avaliando métodos suplementares de desinfecção, como irrigação ultrassônica/ sônica, laser e terapia fotodinâmica, têm apresentado bons resultados quanto à eficácia antimicrobiana dos mesmos. Entretanto, tornam-se necessários estudos *in vivo* para comprovar a superioridade desses métodos em relação aos convencionais em promover desinfecção dos canais radiculares. No presente estudo foi observado que após o término do PQM, a irrigação final com o EDTA 17% ativado com ultrassom reduziu ainda mais os níveis de LPS (99,92%), quando comparado com o protocolo sem ativação ultrassônica (99,56%). Este fato é de grande importância para a Endodontia que visa uma máxima eliminação dos microrganismos, e seus subprodutos, dos canais radiculares para permitir a redução da indução de citocinas pró-inflamatórias e metaloproteinases, criando-se condições para o reparo periapical. Para este fim, os seguintes princípios foram observados durante o tratamento endodôntico:

- a) Medidas de controle de infecção para evitar a introdução de contaminantes externos ao sistema de canais radiculares.
- b) Canais instrumentados em toda sua extensão para evitar a permanência de microrganismos no terço apical dos canais e consequente modulação da resposta imune do hospedeiro.
- c) Patência apical para evitar acúmulo de debris contaminados nesta região.
- d) Utilização de limas rotatórias de NiTi cuja cinemática permite uma maior expulsão de debris, os quais foram removidos através da irrigação/aspiração.
- e) Emprego de uma substância química auxiliar (CHX gel 2%) com uma ampla ação antimicrobiana, substantividade e baixa citotoxicidade.
- f) Irrigação abundante com soro fisiológico para remoção de debris e resíduos químicos em todas as etapas da instrumentação/irrigação.
- g) Utilização de EDTA como agente irrigante final ativado com ultrassom. Isto para potencializar a sua atividade quelante, melhorar a remoção de *smear layer* e do conteúdo microbiano dos canais radiculares e principalmente otimizar sua ação na remoção das endotoxinas, pois atua nas camadas mais profunda da dentina infectada, que não é envolvida pelo PQM. Além disso, é um agente quelante forte que pode reagir com o Ca^{++} presente na molécula de lípidio A (o centro bioativo de endotoxina) afetando assim a sua estrutura.

Para manter o estado de limpeza dos canais conseguido após a instrumentação, estes foram obturados hermeticamente, proporcionando um selamento apical por meio de cimento endodôntico. Para evitar uma microinfiltração coronária que permitiria a entrada de novos microrganismos no interior do canal radicular, além da entrada de nutrientes, que poderia levar à proliferação dos microrganismos remanescentes no interior dos túbulos dentinários, os dentes foram restaurados com resina composta ao término do tratamento endodôntico (Gomes et al. 2013).

Observando todos estes princípios, espera-se que o conteúdo microbiano/endotóxico restante seja compatível com o hospedeiro já que apesar da redução drástica do conteúdo endotóxico dos canais radiculares, não houve eliminação total do mesmo.

Estudos em andamento que fazem parte deste trabalho estão avaliando também a influência da medicação intracanal (MIC) na redução do conteúdo residual após o uso do EDTA. Isto no intuito de verificar a sua real importância na complementação da desinfecção do sistema de canais radiculares, assim como de sua possível influência na neutralização das enzimas e MMPs responsáveis na perpetuação da lesão periapical.

Dessa forma, tornam-se necessários estudos que avaliem a importância desse conteúdo residual após obturação dos canais radiculares na perpetuação da doença periapical e que avaliem também as diferentes vias de transcrição dos mediadores inflamatórios. Tais pesquisas são importantes para definir protocolos de terapia endodôntica mais eficazes, e que visem não apenas o controle da infecção, mas também o controle da inflamação dos tecidos periapicais, assim como do processo de reabsorção óssea.

CONCLUSÃO

De acordo com as metodologias propostas no presente estudo, foi possível concluir que nas infecções endodônticas primárias com lesão periapical:

1. O conteúdo infeccioso/endotóxico é um potente estímulo para a resposta imune do hospedeiro na produção de IL-1 α , IL-1 β , TNF α , PGE2, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 and MMP-13 (capítulo 1).
2. O PQM consegue reduzir significativamente a carga microbiana e os níveis de endotoxinas. Adicionalmente, a ativação do EDTA com ultrassom promove uma redução maior dos níveis residuais de bactérias e endotoxinas (capítulo 2).
3. O conteúdo infeccioso/endotóxico de dentes com infecção endodôntica primária é um potente estímulo para a expressão gênica de MMP-2 por fibroblastos 3T3. (capítulo3).

REFERÊNCIAS*

1. 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;39:444-8.
2. Al-Qutub MN, Braham PH, Karimi-Naser LM, Liu X, Genco CA, Darveau RP. Hemin-dependent modulation of the lipid A structure of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *Infect Immun* 2006;74:4474-85.
3. Artese L, Piattelli A, Quaranta M, Colasante A, Musani P. Immunoreactivity for interleukin 1-beta and tumor necrosis factor-alpha and ultrastructural features of monocytes/macrophages in periapical granulomas. *J Endod* 1991;17:483-7.
4. Bainbridge BW, Coats SR, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide displays functionally diverse interactions with the innate host defense system. *Ann Periodontol* 2002;7:29-37.
5. Barkhordar RA, Hussain MZ, Hayashi C. Detection of interleukin-1 beta in human periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:334-6.
6. Baumgartner JC, Watkins BJ, Bae K-S, Xia T. Association of black pigmented bacteria with endodontic infections, *J Endod* 1999; 25:413-5.
7. Bennett KW, Eley A. Fusobacteria: new taxonomy and related diseases. *J Med Microbiol.* 1993;39:246-54.
8. Berg JO, Nord CE. A method for isolation of anaerobic bacteria from endodontic specimens. *Scand J Dent Res* 1973;81:163-6.
9. Beutler B. Endotoxin, toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity. *Curr Opin Microbiol* 2000;3;23-8.
10. Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993;4:197-250.
11. Birkedal-Hansen H. Role of matrix metalloproteinases in human periodontal diseases. *J Periodontol* 1993;64(5 Suppl):474-84.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

12. Boyce BF, Li P, Yao Z, et al. TNF-alpha and pathologic bone resorption. *Keio J Med* 2005;54:127–31.
13. Caviedes-Bucheli J, Azuero-Holguin MM, Gutierrez-Sanchez L, Higuerey-Bermudez F, Pereira-Nava V, Lombana N, Munoz HR. The effect of three different rotary instrumentation systems on substance P and calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *J Endod* 2010;36:1938-42.
14. Caviedes-Bucheli J, Moreno JO, Carreño CP, Delgado R, Garcia DJ, Solano J, Diaz E, Munoz HR. The effect of single-file reciprocating systems on Substance P and Calcitonin gene-related peptide expression in human periodontal ligament. *Int Endod J* 2013;46:419-26.
15. Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY, Hsieh YS. Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodontal Res* 2002;37:196–203.
16. Cohen JS, Reader A, Fertel R, Beck M, Meyers WJ. A radioimmunoassay determination of the concentrations of prostaglandins E2 and F2 alpha in painful and asymptomatic human dental pulps. *J Endod* 1985;11:330–5.
17. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, Granjeiro JM. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol* 2009, 54:764-771.
18. Darveau RP, Pham TT, Lemley K, Reife RA, Bainbridge BW, Coats SR, Howald WN, Way SS, Hajjar AM. Porphyromonas gingivalis lipopolysaccharide contains multiple lipid A species that functionally interact with both toll-like receptors 2 and 4. *Infect Immun* 2004;72:5041-51.
19. Darveau, RP. Oral innate host defense responses: interactions with microbial communities and their role in the development of disease. 2000;169-218.
20. 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;38:481-5.

21. Dehus O, Hartung T, Hermann C. Endotoxin evaluation of eleven lipopolysaccharides by whole blood assay does not always correlate with Limulus amoebocyte lysate assay. *J Endotoxin Res* 2006;12:171-80.
22. Dixon DR, Darveau RP. Lipopolysaccharide heterogeneity: innate host responses to bacterial modification of lipid a structure. *J Dent Res* 2005;84:584-95.
23. Duerden BI. Virulence factors in anaerobes. *Clin Infect Dis* 1994;18:S253-9.
24. Estrela CR, Pimenta FC, Alencar AH, Ruiz LF, Estrela C. Detection of selected bacterial species in intraoral sites of patients with chronic periodontitis using multiplex polymerase chain reaction. *J Appl Oral Sci* 2010;18:426-31.
25. Estrela C, Estrela CR, Decurcio DA, Hollanda AC, Silva JA. Antimicrobial efficacy of ozonated water, gaseous ozone, sodium hypochlorite and chlorhexidine in infected human root canals. *Int Endod J* 2007;40:85-93.
26. Fabricius L, Dahlén G, Holm SE, et al. Influence of combinations of oral bacteria on periapical tissues of monkeys. *Scand J Dent Res* 1982;90:200–6.
27. Fukushima A, Kajiya H, Izumi T, Ahigeyama C, Okabe K, Anan H. Pro-inflammatory cytokines induce suppressor of cytokine signaling-3 human periodontal ligament cells. *J Endod.* 2010; 36: 1004-8.
28. Gomes BP, Endo MS, Martinho FC. Comparison of endotoxin levels found in primary and secondary endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1082-6.
29. Gomes, B.P.F.A.; Montagner, Martinho FC. Aspectos microbiológicos das infecções endodônticas: conceitos e aplicações. In: *Microbiologia / Imunologia Geral e Odontológica*. Moysés ST, Kriger L, Moysés S (eds), São Paulo: Artes Médicas.2013
30. Gomes BP, Pinheiro ET, Gade-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.

31. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of endodontic symptoms and signs with particular combinations of specific bacteria. *Int Endod J* 1996;29:69-75.
32. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Association of specific bacteria with some endodontic signs and symptoms. *Int Endod J* 1994a;27:291-8.
33. Gomes BPFA, Drucker DB, Lilley JD. Negative and positive associations between bacterial species in root canals. *Microbios* 1994b;80:231-43.
34. Griffiee M.B., Patterson S.S., Miller C.H., Kafrawy A.H. and Newton C.W. The relationship of *Bacteroides melaninogenicus* to symptoms associated with pulpal necrosis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1980;50:457-61.
35. Hannas AR, Pereira JC, Granjeiro JM, Tjaderhane L. The role of matrix metalloproteinases in the oral environment. *Acta Odontol Scand* 2007;65:1–13.
36. Hayakawa T. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in development and disease of oral tissues. *Dent in Japan* 1998;34:167–77.
37. Hernandez M, Valenzuela MA, Lopez-Otin C, et al. Matrix metalloproteinase-13 is highly expressed in destructive periodontal disease activity. *J Periodontol* 2006;77:1863–70.
38. Herrera DR, Santos ZT, Tay LY, Silva EJ, Loguercio AD, Gomes BP. Efficacy of different final irrigant activation protocols on smear layer removal by EDTA and citric acid. *Microsc Res Tech* 2013;76:364-9
39. Jacinto RC, Gomes BP, Ferraz CC, Zaia AA, Filho FJ. Microbiological analysis of infected root canals from symptomatic and asymptomatic teeth with periapical periodontitis and the antimicrobial susceptibility of some isolated anaerobic bacteria. *Oral Microbiol Immunol* 2003.18:285-92.
40. Jacinto RC, Gomes BP, Shah HN, Ferraz CC, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Quantification of endotoxins in necrotic root canals from symptomatic and asymptomatic teeth. *J Med Microbiol* 2005;54:777-83.

41. Jiang J, Zuo J, Hurst IR, et al. The synergistic effect of peptidoglycan and lipopolysaccharide on osteoclast formation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:738–43.
42. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.
43. Lim GC, Torabinejad M, Kettering J, Linkhardt TA, Finkelman RD. Interleukin 1b in symptomatic and asymptomatic human periradicular lesions. *J Endod* 1994;20:225–7.
44. Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *Int Endod J* 2012;45:354-62.
45. Martinho FC. Estudo microbiológico e de endotoxinas de canais radiculares com infecções endodônticas primárias e avaliação da antigenicidade do conteúdo infeccioso contra macrófagos na produção de citocinas pró-inflamatórias [tese]. Piracicaba: Universidade Estadual de Campinas/Faculdade de Odontologia; 2011.
46. 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*. 2010a;36:1467-74.
47. 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*. 2011a;37(5):602-7.
48. 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;38:740-5.
49. Martinho FC, Chiesa WM, Marinho AC, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ, Gomes BP. Clinical investigation of the efficacy of

- chemomechanical preparation with rotary nickel-titanium files for removal of endotoxin from primarily infected root canals. *J Endod*. 2010b;36:1766-9.
50. Martinho FC, Chiesa WM, Zaia AA et al. Comparison of endotoxin levels in previous studies on primary endodontic infections. *J Endod* 2011b;37:163-7.
51. 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;34:268-72.
52. Mattison GD, Haddix JE, Kehoe JC, Progulski-Fox A. The effect of *Eikenella corrodens* endotoxin on periapical bone. *J Endod* 1987;13:559-65.
53. McNicholas S, Torabinejad M, Blankenship J, Bakland L. The concentration of prostaglandin E2 in human periradicular lesions. *J Endod* 1991;17:97-100.
54. Montagner F, Gomes BP, Kumar PS. Molecular fingerprinting reveals the presence of unique communities associated with paired samples of root canals and acute apical abscesses. *J Endod* 2010;36:1475-9.
55. Nair PN. Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;15:348-81.
56. Nishikawa M, Yamaguchi Y, Yoshitake K, Saeki Y. Effects of TNF-alpha and prostaglandin E2 on the expression of MMPs in human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodontal Res* 2002;37:167-76.
57. Ohno N, Morrison DC. Lipopolysaccharide interaction with lysozyme. *J Biol Chem* 1989;264:4434-41.
58. 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;38:1053-7.
59. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:221-33.
60. Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod* 2010;36:231-7.

61. Petsch D, Anspach FB. Endotoxin removal from protein solutions. *J Biotechnol* 2000;76:97-119.
62. Pozo P, Valenzuela MA, Melej C, Zaldivar M, Puente J, Martinez B, Gamonal J. Longitudinal analysis of metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and clinical parameters in gingival crevicular fluid from periodontitis-affected patients. *J Periodontal Res* 2005, 40:199-207.
63. Raetz CRH. Biochemistry of endotoxins. *Ann Rev Biochem* 1990;59:129–70.
64. Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, de Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, Vieira LQ. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral Microbiol Immunol* 2002;17:344-53.
65. Rietschel ET, Brade H. Bacterial endotoxins. *Scient Am* 1992;267:54–61.
66. Rossa-Junior C, Liu M, Patil C, Kirkwood KL. MKK3/6-p38 MAPK negatively regulates murine MMP-13 gene expression induced by IL-1beta and TNF-alpha in immortalized periodontal ligament fibroblasts. *Matrix Biol* 2005;24:478–88.
67. Safavi KE, Rossomando EF. Tumor necrosis factor identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis. *J Endod* 1991;17:12–4.
68. Sakamoto M, Rocas IN, Siqueira JF Jr, Benno Y. Molecular analysis of bacteria in asymptomatic and symptomatic endodontic infections. *Oral Microbiol Immunol* 2006;21:112-22.
69. Santos AL, Siqueira JF Jr, Rôças IN, Jesus EC, Rosado AS, Tiedje JM. Comparing the bacterial diversity of acute and chronic dental root canal infections. *PLoS One* 2011;6:e28088.
70. Seymour GJ, Gemmell E. Cytokines in periodontal disease: where to from here?. *Acta Odontol Scand* 2001;59:167–73.
71. Shin SJ, Lee J, Baek SH, Lin SS. Tissue levels of matrix metalloproteinases in pulps and periapical lesions. *J Endod* 2002;28:313–5.
72. Shin SJ, Lee W, Lee JI, Baek SH, Kum KY, Shon WJ, Bae KS. Matrix metalloproteinase-8 and substance P levels in gingival crevicular fluid during

- endodontic treatment of painful, nonvital teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:548-54.
73. Siqueira JF Jr, Rocas IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008;34:1291–301.
74. Siqueira Jr JF, Roças IN, Oliveira JCM, Santos KRN. Molecular detection of black-pigmented bacteria in infections of endodontic origin. *J Endod* 2001;27:563-66. .
75. Sorsa T, Tjaderhane L, Kontinen YT, et al. Matrix metalloproteinases: contribution to pathogenesis, diagnosis and treatment of periodontal inflammation. *Ann Med* 2006;38:306–21.
76. Sousa EL, Gomes BP, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC. Microbiological profile and antimicrobial susceptibility pattern of infected root canals associated with periapical abscesses. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:573-80.
77. Spanó JC, Silva RG, Guedes DF, Sousa-Neto MD, Estrela C, Pécora JD. Atomic absorption spectrometry and scanning electron microscopy evaluation of concentration of calcium ions and smear layer removal with root canal chelators. *J Endod*. 2009 May;35:727-30.
78. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Oliveira RR, Maciel KF, Vieira LQ, Sobrinho AP. The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. *J Endod* 2013;39:889-92.
79. Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Teles FR, Teles RP, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Effects of calcium hydroxide on cytokine expression in endodontic infections. *J Endod* 2012;38:1368-71.
80. Thompson JM, Agee K, Sidow SJ, McNally K, Lindsey K, Borke J, Elsalanty M, Tay FR, Pashley DH. Inhibition of endogenous dentin matrix metalloproteinases by ethylenediaminetetraacetic acid. *J Endod*. 2012;38:62-5.
81. Vaara M., Nikaido H. Outer membrane organization. In: Rietschel, E.T. (Ed.), *Handbook of Endotoxin*, vol. 1. Elsevier, Amsterdam, 1984;pp.1 – 45.

82. Van der Zee E, Everts V, Beertsen W. Cytokine-induced endogenous procollagenase stored in the extracellular matrix of soft connective tissue results in a burst of collagen breakdown following its activation. *J Periodontol Res* 1996;3:483–8.
83. Varella PPV, Forte WCN (2001) Citocinas: revisão. *Rev Bras Alerg Imun* 2001; 24:146-54.
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;22:411-8.
85. Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA. One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod.* 2013;39:959-64.
86. Yoshida M., Fukushima H., Yamamoto K., Ogawa K., Toda T. and Sagawa H. Correlation between clinical symptoms and microorganisms isolated from root canals with periapical pathosis. *J Endod* 1987;13: 24-8.
87. Yoshioka M, Grenier D, Mayrand D. Binding of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* lipopolysaccharides to *Peptostreptococcus micros* stimulates tumor necrosis factor alpha production by macrophage-like cells. *Oral Microbiol Immunol* 2005;20:118–21.

APÊNDICES

APÊNDICE 1 – Características clínicas do elemento dental nos pacientes que participaram do estudo.

Caso	IDAD E	GÊNERO	DENTE	SENSIBILIDADE*			COROA	PERIOD.	CANAL*	MOBIL.
				T	P	PP				
1	41	M	14	-	+	+	Rest.	Saudável	Seco	Não
2	41	M	15	-	+	+	Rest.	Saudável	Seco	Não
3	52	M	22	-	+	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
4	74	M	14	-	-	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
5	58	M	41	-	+	+	Hígido	Saudável	Seco	Não
6	58	M	43	-	+	+	Hígido	Saudável	Seco	Não
7	51	M	45	-	+	+	Rest.	Saudável	Seco	Não
8	26	M	25	-	-	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
9	57	M	23	-	+	+	Hígido	Saudável	Seco	Não
10	52	H	22	-	+	-	Rest.	Saudável	Seco	Não
11	25	M	12	-	-	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
12	60	H	34	-	+	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
13	47	H	42	-	+	+	Hígido	Saudável	Seco	Não
14	47	H	43	-	+	+	Hígido	Saudável	Seco	Não
15	47	M	24	-	+	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
16	51	M	23	-	+	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
17	22	H	24	-	+	+	Rest.	Saudável	Seco	Não
18	32	M	31	-	+	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
19	32	M	32	-	+	+	Rest.	Saudável	Seco	Não
20	32	M	33	-	+	+	Rest.	Saudável	Seco	Não
21	32	M	41	-	+	+	Rest.	Saudável	Molhado	Não
22	43	M	11	-	+	-	Rest.	Saudável	Seco	Não
23	43	M	12	-	+	+	Hígido	Saudável	Molhado	Não

24	41	M	33	-	-	+	Húmido	Saudável	Seco	Não
----	----	---	----	---	---	---	--------	----------	------	-----

*Canal seco- sem secreção; Canal molhado- todos os canais assim identificados apresentaram secreção inicial serosa.

Sensibilidade: T- térmico; P- palpação; PP; palpação.

APÊNDICE 2 – Isolados bacterianos em canais radiculares por método de cultura bacteriana e identificação bioquímica.

CASO	Bacterias
1	<i>P. gingivalis, P. micra, B. bifidum, P. buccae.</i>
2	<i>P. gingivalis, P. micra, Capnocytophaga spp, Prevotella. spp.</i>
3	<i>P. gingivalis, P. Micra, P. buccae.</i>
4	<i>P. gingivalis, P. micra, P. buccae, P. oralis.</i>
5	<i>P. gingivalis, P. micra, P. endodontalis, Capnocytophaga spp..</i>
6	<i>P. gingivalis, P. micra, P. oralis</i>
7	<i>P. gingivalis, P. micra, P. buccae</i>
8	<i>P. gingivalis, P. micra, P. endodontalis P. acnes.</i>
9	<i>P. micra, P. gingivalis</i>
10	<i>P. gingivalis, B. bifidum, P. buccae.</i>
11	<i>Capnocytophaga spp, Prevotella. spp. B. ureolyticus</i>
12	<i>P. Micra, P. buccae.</i>
13	<i>P. buccae, P. oralis. P. endodontalis</i>
14	<i>P. endodontalis, P. oralis</i>
15	<i>P. gingivalis, P. oralis, P. buccae</i>
16	<i>P. gingivalis, P. micra, P. buccae</i>
17	<i>P. endodontalis, P. micra,</i>
18	<i>P. micra, P. buccae, P. oralis</i>
19	<i>P. micra, P. buccae, P. oralis, . B. ureolyticus</i>
20	<i>P. gingivalis, P. micra, P. endodontalis, P. oralis</i>
21	<i>P. gingivalis, P. micra, P. oralis</i>

22	<i>P. endodontalis</i> , <i>P. Buccae</i> , <i>P. oralis</i> , <i>B. ureolyticus</i>
23	, <i>P. micra</i> , <i>P. endodontalis</i> , <i>P. oralis</i>
24	<i>P. micra</i> , <i>P. oralis</i> .

APÊNDICE 3 – Unidades Formadoras de Colônia / mL (UFC/mL) nas diferentes coletas durante o tratamento endodôntico para os diferentes subgrupos.

COLETA	CASO					
	1	2	3	4	5	6
Inicial	400 X 10 ⁴	240 X 10 ⁴	40 X 10 ²	20 X 10 ²	27 X 10 ²	110 X 10 ²
PQM	0	0	0	0	0	5
EDTA S/U	0	0	2	0	0	0
MIC Ca(OH) ₂	0	0	0	0	0	0

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA S/U- coleta após o uso de EDTA sem ativação com ultrassom; MIC Ca(OH)₂- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂.

COLETA	CASO					
	7	8	9	10	11	12
Inicial	152 X 10 ²	26 X 10 ²	90 X 10 ²	130 X 10 ²	70 X 10 ⁴	330 X 10 ⁴
PQM	12	0	8	0	0	0
EDTA S/U	2	6	0	0	20	6
MIC Ca(OH) ₂ + CHX	0	0	0	0	0	0

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA S/U- coleta após o uso de EDTA sem ativação com ultrassom; MIC Ca(OH)₂ + CHX- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂ e clorexidina.

COLETA	CASO					
	13	14	15	16	17	18
Inicial	80 X 10 ⁴	160 X 10 ²	210 X 10 ²	65 X 10 ²	108 X 10 ²	76 X 10 ²
PQM	0	0	0	0	0	0
EDTA C/U	6	0	0	0	0	0
MIC Ca(OH) ₂	0	0	0	0	0	0

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA C/U- coleta após o uso de EDTA com ativação de ultrassom; MIC Ca(OH)₂- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂.

COLETA	CASO					
	19	20	21	22	23	24
Inicial	50 X 10 ²	110 X 10 ²	60 X 10 ²	112 X 10 ²	72 X 10 ⁴	30 X 10 ²
PQM	12	0	8	0	0	0
EDTA C/U	2	6	0	0	20	6
MIC Ca(OH) ₂ + CHX	0	0	0	0	0	0

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA C/U- coleta após o uso de EDTA com ativação de ultrassom; MIC Ca(OH)₂ + CHX- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂ e clorexidina.

APÊNDICE 4 – Quantificação de endotoxinas (EU/mL) nas diferentes coletas durante o tratamento endodôntico para os diferentes subgrupos.

Caso	Inicial	PQM	EDTA S/U	MIC Ca(OH) ₂
1	26.40	0.16	0.10	0.12
2	23.00	0.16	0.01	0.11
3	79.80	1.77	0.01	0.14
4	0.20	0.10	0.10	0.50
5	42.70	0.40	0.01	0.10
6	5.34	0.19	0.01	0.19

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA S/U- coleta após o uso de EDTA sem ativação com ultrassom; MIC Ca(OH)₂- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂.

Caso	Inicial	PQM	EDTA S/U	MIC Ca(OH) ₂ + CHX
7	47.10	0.09	0.24	0.06
8	45.20	0.34	0.01	0.04
9	25.30	1.18	0.01	0.05
10	1.20	0.18	0.10	0.05
11	167.00	23.50	0.80	0.03
12	111.00	11.40	0.42	0.05

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA S/U- coleta após o uso de EDTA sem ativação com ultrassom; MIC Ca(OH)₂- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂ e clorexidina.

Caso	Inicial	PQM	EDTA C/U	MIC Ca(OH) ₂
13	3.94	0.52	0.05	0.01
14	4.00	0.16	0.01	0.01
15	74.10	0.03	0.02	0.02
16	0.29	0.11	0.07	0.01
17	0.92	0.02	0.10	0.02
18	9.89	1.69	0.22	0.26

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA C/U- coleta após o uso de EDTA com ativação com ultrassom; MIC Ca(OH)₂- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂.

Caso	Inicial	PQM	EDTA C/U	MIC Ca(OH) ₂ + CHX
19	1.09	0.01	0.07	0.29
20	0.37	0.14	0.02	0.20
21	0.28	0.02	0.01	0.15
22	2.56	0.04	0.02	0.01
23	0.10	0.02	0.01	0.01
24	6.43	0.10	0.02	0.02

Inicial- coleta inicial; PQM; coleta após preparo químico-mecânico; EDTA C/U- coleta após o uso de EDTA com ativação com ultrassom; MIC Ca(OH)₂- coleta após 30 dias com medicação intracanal de Ca(OH)₂ e clorexidina.

APÊNDICE 5 – Quantificação das diferentes citocinas (pg/mL) após o preparo químico-mecânico (PQM) nas diferentes coletas durante o tratamento endodôntico para os diferentes subgrupos.

Caso	IL-1 α		TNF- α		PGE ₂		IL-1 β	
	PQM	MIC	PQM	MIC	PQM	MIC	Inicial	MIC
1	33.23	19.60	31.42	6.34	269.07	288.296	267.21	32.45
2	22.44	2.77	41.99	2.76	141.97	23.876	73.74	2.84
3	32.97	4.91	36.82	5.22	64.03	79.783	152.56	23.12
4	62.53	7.21	46.37	7.44	7.70	21.549	198.21	11.93
5	13.23	5.13	36.20	4.98	55.11	143.611	148.32	2.14
6	13.45	8.90	23.43	2.60	113.13	62.102	197.23	18.32
7	31.21	1.23	23.40	3.53	202.67	76.179	122.80	19.22
8	36.98	11.48	37.66	2.79	101.64	87.311	49.21	4.24
9	16.75	6.73	31.42	1.69	165.34	60.938	234.17	2.57
10	34.53	2.18	14.55	3.50	167.85	127.405	68.39	9.23
11	21.43	1.12	31.41	2.14	81.91	334.547	195.27	3.21
12	18.52	6.33	19.56	3.96	92.08	123.982	47.30	4.72
13	17.12	9.54	35.77	2.13	7.70	21.54	97.57	6.92
14	14.65	3.22	23.32	1.62	39.44	11.93	103.73	3.78
15	29.33	8.26	11.65	2.84	234.53	15.32	92.43	9.17
16	11.21	24.21	20.78	1.43	225.10	71.84	128.04	2.90
17	26.74	6.87	31.23	5.14	65.88	222.21	89.23	1.46
18	19.90	2.47	41.24	4.32	82.18	178.97	57.92	2.44
19	12.42	3.96	26.33	1.73	29.92	246.11	67.03	2.22
20	62.57	16.22	19.75	4.34	38.89	111.06	103.21	4.52
21	3.21	4.98	11.74	16.83	32.12	116.65	156.32	16.80
22	9.77	5.52	14.73	24.47	98.45	85.30	74.93	4.35
23	10.89	3.76	11.64	18.88	198.43	27.91	69.46	1.74
24	14.42	5.33	12.54	50.88	71.17	15.32	70.33	6.22

PQM- coleta após o preparo químico-mecânico; MIC- coleta após o uso por 30 dias de medicação intracanal.

APÊNDICE 6 – Quantificação das diferentes metaloproteinases avaliadas (pg/mL) após o preparo químico-mecânico (PQM) e depois do uso de medicação intracanal (MIC).

MMPs										
	MMP-2		MMP-3		MMP-8		MMP-9		MMP-13	
Caso	PQM	MIC	PQM	MIC	PQM	MIC	Inicial	MIC	Inicial	MIC
1	870,00	190,00	158,00	112,00	67,00	14,00	20,00	0,22	47,23	1,52
2	790,00	175,00	173,00	109,00	61,00	13,56	30,00	0,14	67,17	4,78
3	800,00	177,00	234,00	136,00	66,00	14,67	33,00	0,18	50,39	3,07
4	810,00	180,00	146,00	110,00	70,00	15,56	22,00	0,11	100,26	2,71
5	760,00	168,00	130,00	105,00	75,00	26,67	29,00	0,49	54,30	1,76
6	850,00	188,00	138,00	90,00	61,00	19,34	40,00	0,18	49,12	7,08
7	910,00	202,00	129,00	102,00	98,00	21,78	38,00	0,21	55,71	7,46
8	810,00	180,00	145,00	108,00	61,00	11,29	21,00	0,55	55,71	4,01
9	860,00	191,00	161,00	124,00	72,00	18,44	26,00	0,46	48,84	7,69
10	830,00	196,00	128,00	112,00	65,00	19,80	34,00	0,69	42,74	9,26
11	780,00	185,00	119,00	98,00	85,00	16,24	22,00	0,29	46,41	4,00
12	750,00	180,00	117,00	101,00	66,00	12,87	22,00	0,16	58,14	9,61
13	790,00	175,00	112,00	93,00	93,00	17,22	28,00	0,62	43,88	9,48
14	800,00	184,00	134,00	115,00	66,00	14,88	34,00	0,29	69,78	1,12
15	820,00	182,00	122,00	110,00	136,00	23,64	66,00	0,33	51,05	1,15
16	830,00	190,00	148,00	81,00	77,00	12,17	106,00	0,21	47,82	1,88
17	840,00	199,00	121,00	111,00	74,00	14,72	44,00	2,49	41,60	1,22
18	900,00	210,00	136,00	79,00	61,00	13,00	21,00	0,79	40,61	3,28
19	820,00	170,00	127,00	109,00	71,00	18,11	28,00	0,12	42,11	8,73
20	770,00	148,00	111,00	103,00	73,00	14,93	32,00	0,67	46,12	11,27
21	800,00	160,00	160,00	112,00	69,00	11,66	34,00	0,37	43,82	9,72
22	910,00	190,00	123,00	84,00	73,00	16,82	28,00	0,24	41,80	9,84

MMPs										
	MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9	MMP-13		MMP-2	MMP-3	MMP-8	MMP-9
Caso	PQM	MIC	PQM	MIC	PQM	MIC	Inicial	MIC	Inicial	MIC
23	820,00	182,00	139,00	97,00	87,00	19,23	21,00	0,23	43,98	7,90
24	750,00	170,00	121,00	101,00	61,00	13,70	42,00	0,14	40,70	5,47

PQM- coleta após o preparo químico-mecânico; MIC- coleta após o uso por 30 dias de medicação intracanal.

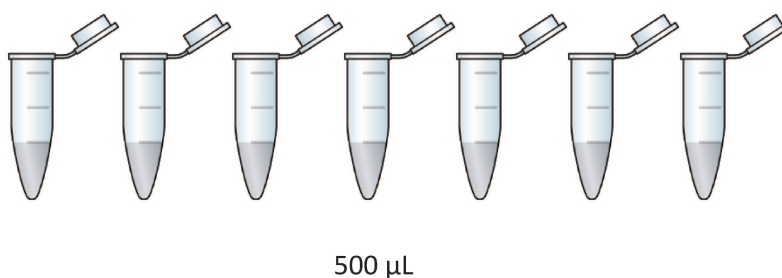
APÊNDICE 7 – Protocolo para o processamento das amostras de citocinas utilizando os Kits de ELISA específicos para amostras humanas da R&D Systems.

IL-1 α (R&D catálogo #DLA50)

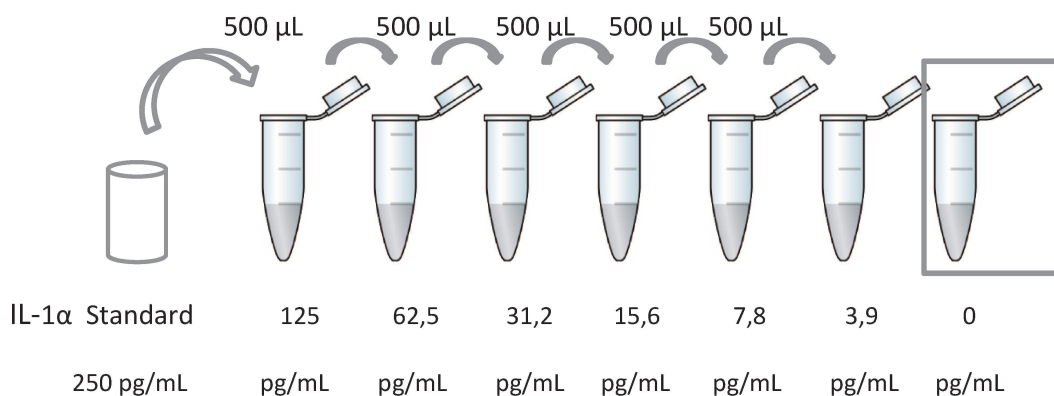
1) Preparo dos reagentes:

A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

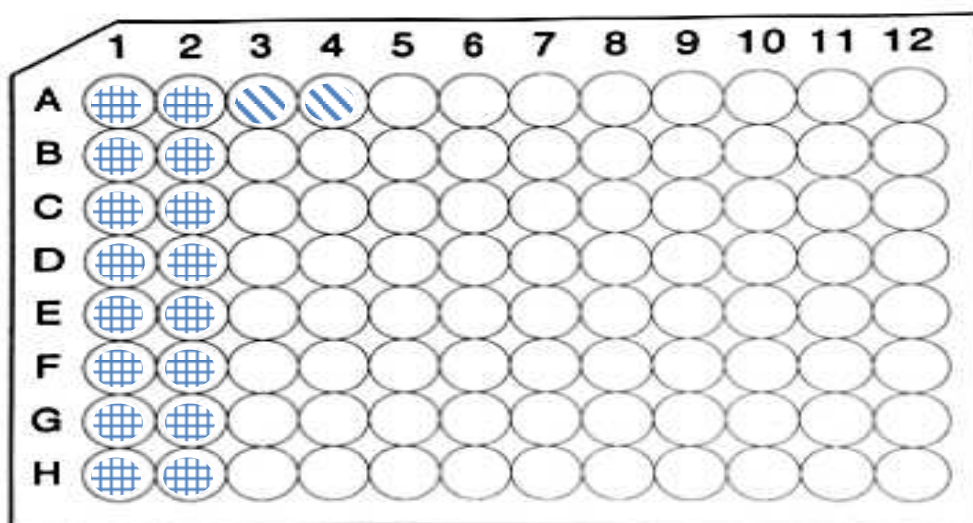
- Reconstituir o “IL-1 α Standard” do kit com 5mL do “Calibrator Diluent RD6C”. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- Colocar 500 μ L do “Calibrator Diluent RD6C” nos 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados.




- A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.




- e) O ultimo endorff /tubo de vidro deve conter apenas 500 μL do " Calibrator Diluent RD5-5". Ele será o zero padrão da curva (Blank, 0 pg/mL)
- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
 - 3) Adicionar 50 μL do "Assay Diluent RD1-83" em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.
 - 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 200 μL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 200 μL do IL-1 α Standard
- B1 e B2 com 200 μL da diluição 125 pg/mL
- C1 e C2 com 200 μL da diluição 62,5 pg/mL
- D1 e D2 com 200 μL da diluição 31,2 pg/mL
- E1 e E2 com 200 μL da diluição 15,6 pg/mL
- F1 e F2 com 200 μL da diluição 7,8 pg/mL
- G1 e G2 com 200 μL da diluição 3,9 pg/mL
- H1 e H2 com 200 μL Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 200 μL de cada amostra.

- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente.

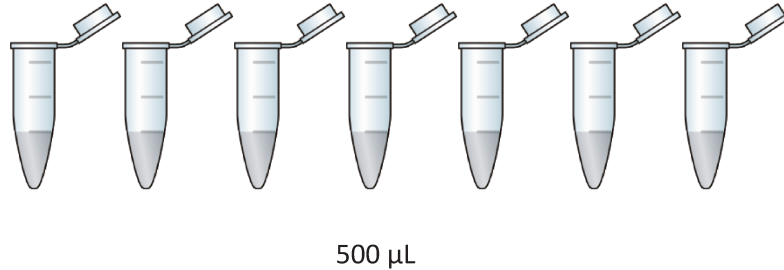
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 3 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.
- 8) Colocar 200 μ L do “IL-1 α Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μ L do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 20 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μ L da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva 4-PL. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

IL-1 β (R&D catálogo #DLB50)

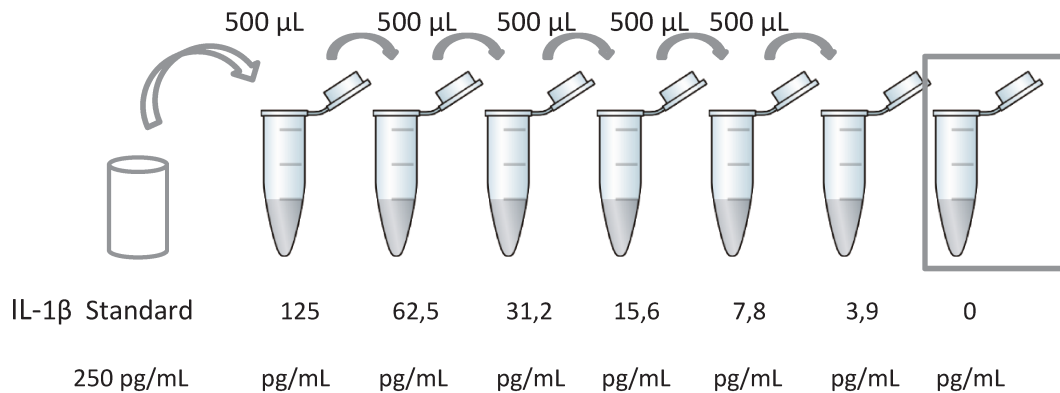
- 1) Preparo dos reagentes:

A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- f) Reconstituir o “IL-1 β Standard” do kit com 5mL do “Calibrator Diluent RD6C”. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- g) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- h) Colocar 500 μ L do “Calibrator Diluent RD6C” nos 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados.

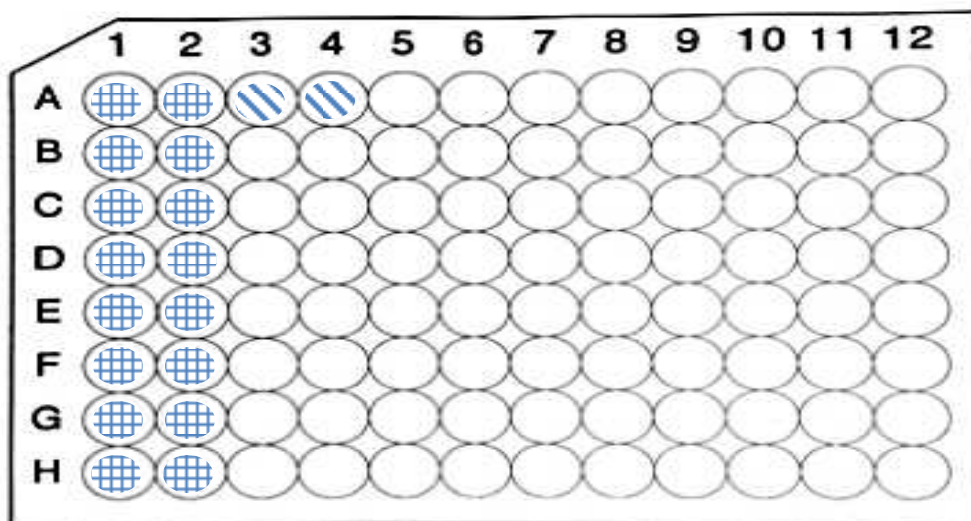



- i) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.




- j) O ultimo ependorff /tubo de vidro deve conter apenas 500 μ L do” Calibrator Diluent RD5-5”. Ele será o zero padrão da curva (Blank, 0 pg/mL)
- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
 - 3) Adicionar 50 μ L do “Assay Diluent RD1-83” em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.

- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 200 μ L para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 200 μ L do IL-1 β Standard
- B1 e B2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- C1 e C2 com 200 μ L da diluição 62,5 pg/mL
- D1 e D2 com 200 μ L da diluição 31,2 pg/mL
- E1 e E2 com 200 μ L da diluição 15,6 pg/mL
- F1 e F2 com 200 μ L da diluição 7,8 pg/mL
- G1 e G2 com 200 μ L da diluição 3,9 pg/mL
- H1 e H2 com 200 μ L Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 200 μ L de cada amostra.

- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente.
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no

item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 3 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.

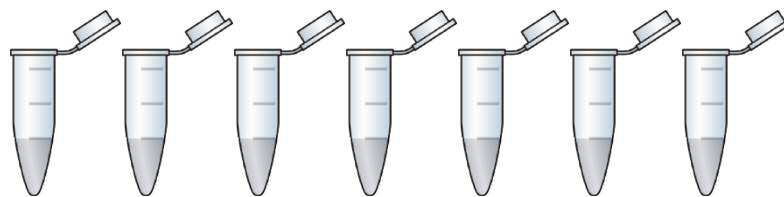
- 8) Colocar 200 μL do “IL-1 β Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 20 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levantar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva 4-PL. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

TNF- α (R&D catálogo #DTA00C)

- 1) Preparo dos reagentes:

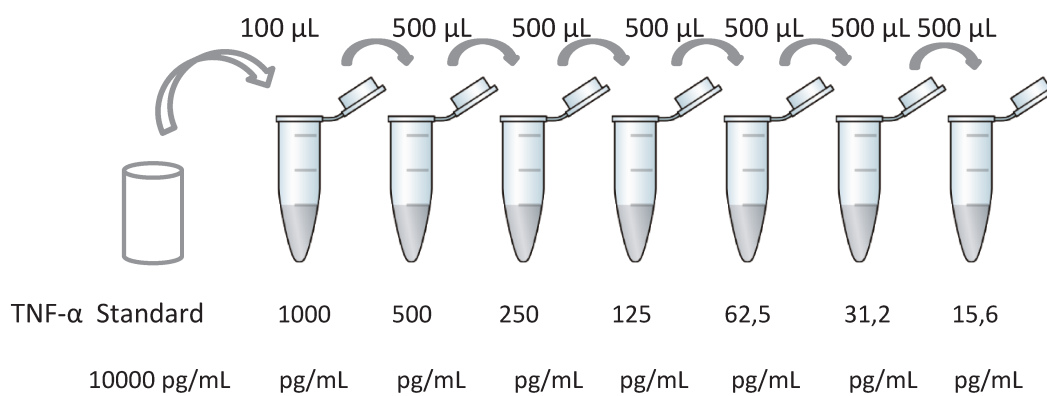
A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- a) Reconstituir o “TNF- α Standard” do kit com 5mL do “Calibrator Diluent RD6C”. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- b) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- c) Colocar 900 μL do “Calibrator Diluent RD6-35” nos 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados.



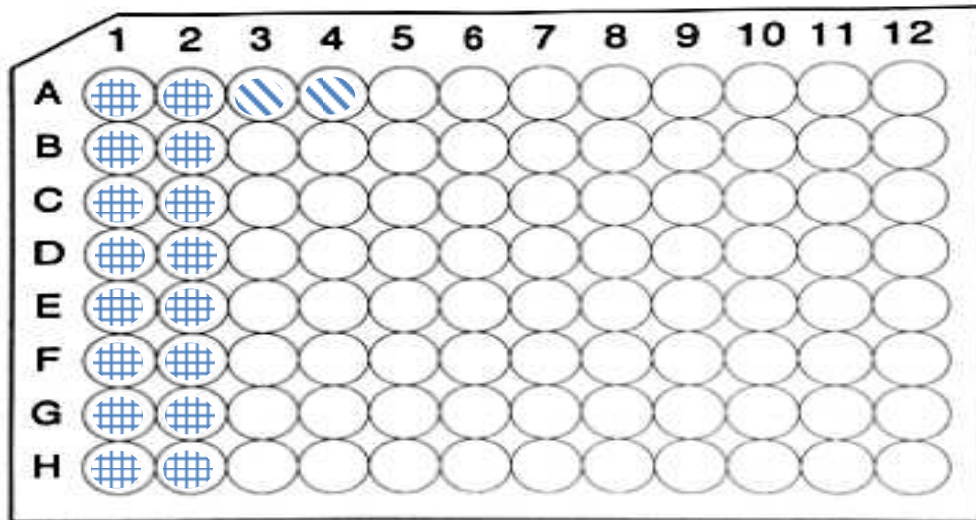
900 µL


- d) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.




- e) Será preciso mais um ependorff /tubo de vidro contendo 900 µL do “Calibrator Diluent RD6-35”. Ele será o zero padrão da curva (Blank, 0 pg/mL). A curva ira até a concentração de 1000 pg/mL.

- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
- 3) Adicionar 50 µL do “Assay Diluent RD1-F” em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.
- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 200 µL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 200 μ L da diluição 1000 pg/mL
- B1 e B2 com 200 μ L da diluição 500 pg/mL
- C1 e C2 com 200 μ L da diluição 250 pg/mL
- D1 e D2 com 200 μ L da diluição 125 pg/mL
- E1 e E2 com 200 μ L da diluição 62,5 pg/mL
- F1 e F2 com 200 μ L da diluição 31,2 pg/mL
- G1 e G2 com 200 μ L da diluição 15,6 pg/mL
- H1 e H2 com 200 μ L Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 200 μ L de cada amostra.

- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente.
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser

realizado 3 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.

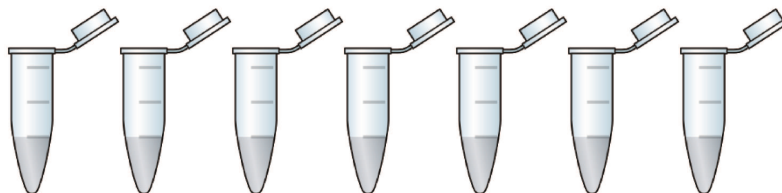
- 8) Colocar 200 μL do “TNF- α Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 20 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva 4-PL. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

PGE₂ (R&D catálogo #KGE004B)

- 1) Preparo dos reagentes:

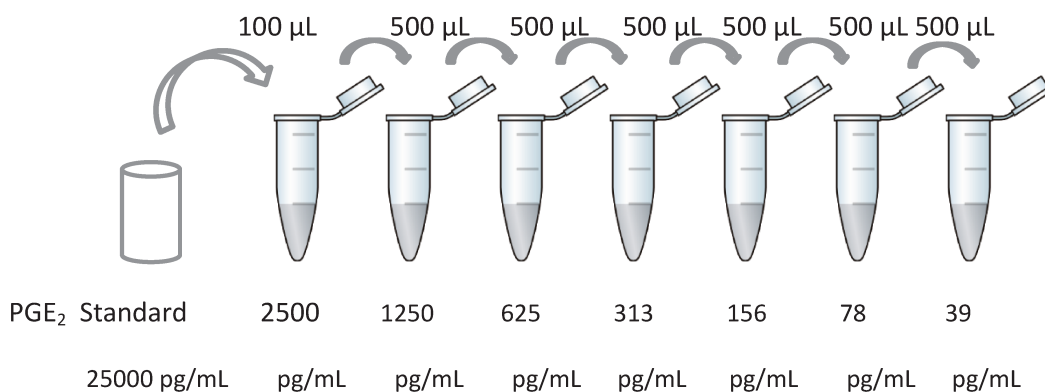
A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- a) Reconstituir o “PGE₂ Standard” do kit com 1mL de água LAL. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- b) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- c) Colocar 900 μL do “Calibrator Diluent RD5-56” nos 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados.



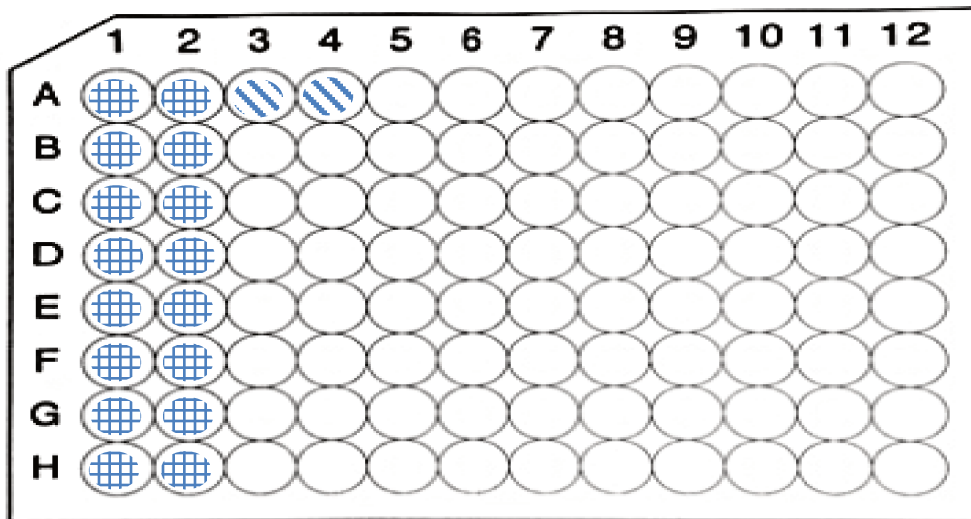
900 μL

d) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.



e) Será preciso mais um ependorff /tubo de vidro contendo 900 µL do “Calibrator Diluent RD5-56”. Ele será o zero padrão da curva (Blank, 0 pg/mL). A curva ira até a concentração de 2500 pg/mL.

- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
- 3) Adicionar 200 µL do “Calibrator Diluent RD5-56” em cada poço da curva.
- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 150 µL para todos os componentes da curva padrão das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:





Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 150 μ L da diluição 2500 pg/mL
- B1 e B2 com 150 μ L da diluição 1250 pg/mL
- C1 e C2 com 150 μ L da diluição 625 pg/mL
- D1 e D2 com 150 μ L da diluição 313 pg/mL
- E1 e E2 com 150 μ L da diluição 156 pg/mL
- F1 e F2 com 150 μ L da diluição 78 pg/mL
- G1 e G2 com 150 μ L da diluição 39 pg/mL
- H1 e H2 com 150 μ L Blank



Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 150 μ L de cada amostra.

- 5) Colocar 50 μ L do Primary Antibody Solution em cada poço das amostras (a cor deve mudar para azul)
- 6) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 1 hr no vortex utilizando o adaptador para microplaca.
- 7) Colocar 50 μ L do “PGE₂ Conjugate” em cada poço da placa (a cor dos poços das amostras deve mudar para roxo). Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 hrs no vortex a temperatura ambiente.
- 8) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 9) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 3 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.

- 11) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 20 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva 4-PL. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

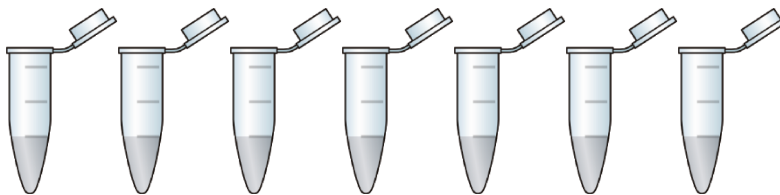
APÊNDICE 8 – Protocolo para o processamento das amostras de metaloproteinasas (MMPs) utilizando os Kits de ELISA específicos para amostras humanas da R&D Systems.

MMP-2 (R&D catálogo #MMP200)

- 1) Preparo dos reagentes:

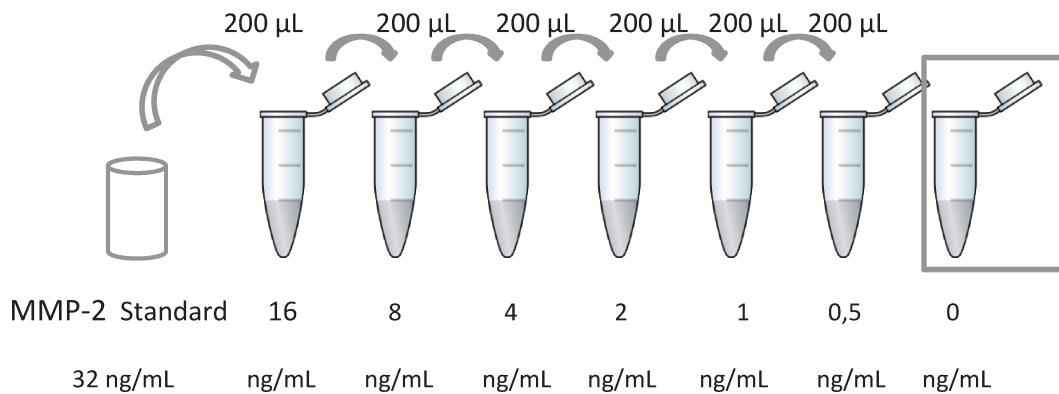
A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- a) Reconstituir o “MMP-2 Standard” do kit com o diluente “Calibrator Diluent RD5P” (1:5). O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- b) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- c) Colocar 200 μL do “Calibrator Diluent RD5P” nos 7 ependorffs /tubos de vidros estéreis previamente separados.



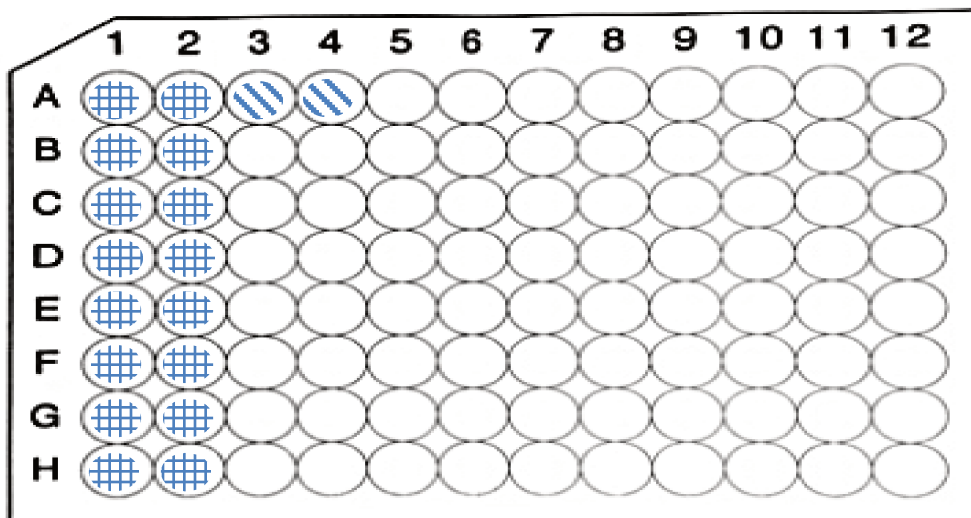
200 μL


- d) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.




e) O ultimo ependorff /tubo de vidro deve conter apenas 500 µL do " Calibrator Diluent RD5P". Ele será o zero padrão da curva (Blank, 0 pg/mL)

- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
- 3) Adicionar 50 µL do "Assay Diluent RD1-116" em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.
- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 50 µL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 50 μ L do MMP-2 Standard
- B1 e B2 com 50 μ L da diluição 16 ng/mL
- C1 e C2 com 50 μ L da diluição 8 ng/mL
- D1 e D2 com 50 μ L da diluição 4 ng/mL
- E1 e E2 com 50 μ L da diluição 2 ng/mL
- F1 e F2 com 50 μ L da diluição 1 ng/mL
- G1 e G2 com 50 μ L da diluição 0,5 ng/mL
- H1 e H2 com 50 μ L Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 50 μ L de cada amostra.

- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente no vortex com o adaptador para microplacas.
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 4 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.
- 8) Colocar 200 μ L do “MMP-2 Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente, sempre no vortex.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μ L do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 20 min a temperatura ambiente.

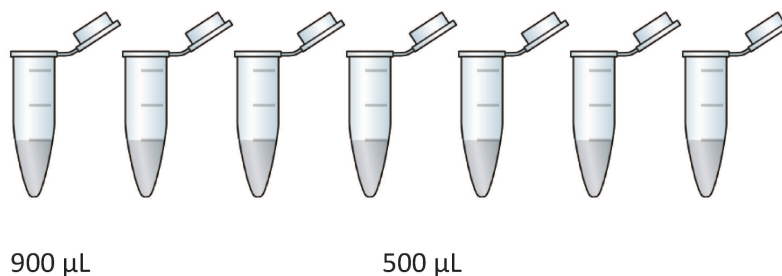
- 12) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva 4-PL. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

MMP-3 (R&D catálogo #DMP300)

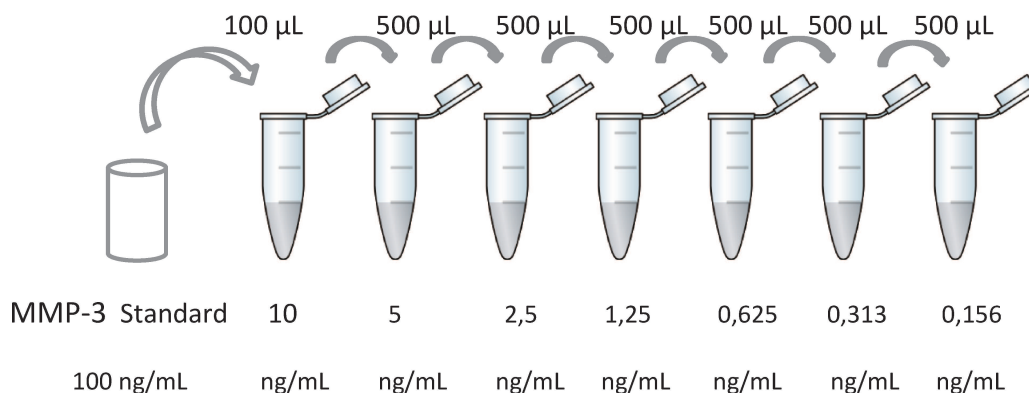
1) Preparo dos reagentes:

A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- a) Reconstituir o “MMP-3 Standard” do kit com 1 mL de água LAL. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- b) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- c) Colocar 900 μL do “Calibrator Diluent RD5-10” no primeiro tubo e 500 μL nos restantes.

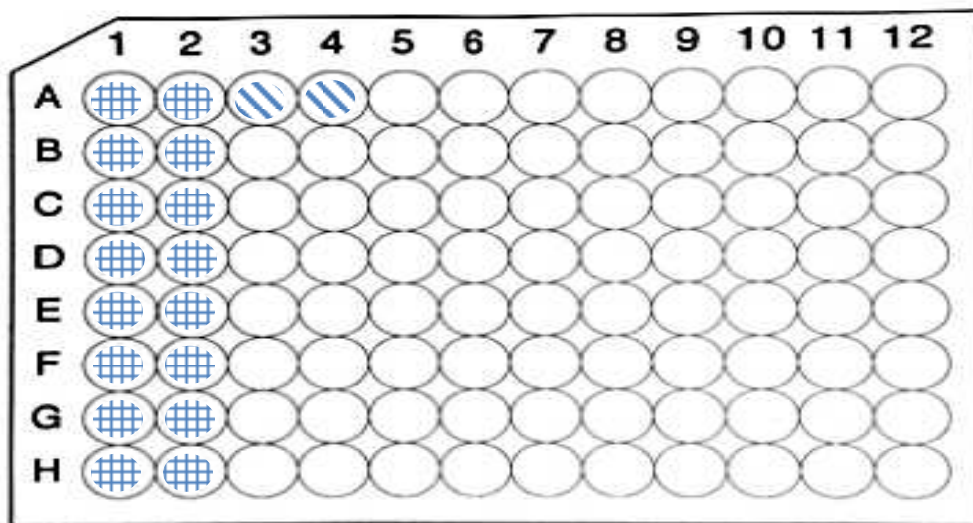



- d) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.




Mais um tubo será utilizado unicamente com o “Calibrator Diluent RD5-10”. Ele será o zero padrão da curva (Blank, 0 ng/mL)

- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
- 3) Adicionar 100 μ L do “Assay Diluent RD1-52” em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.
- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 100 μ L para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 100 μ L da diluição 10 ng/mL
- B1 e B2 com 100 μ L da diluição 5 ng/mL
- C1 e C2 com 100 μ L da diluição 2,5 ng/mL
- D1 e D2 com 100 μ L da diluição 1,25 ng/mL
- E1 e E2 com 100 μ L da diluição 0,625 ng/mL
- F1 e F2 com 100 μ L da diluição 0,313 ng/mL
- G1 e G2 com 100 μ L da diluição 0,156 ng/mL
- H1 e H2 com 100 μ L Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 100 μ L de cada amostra.

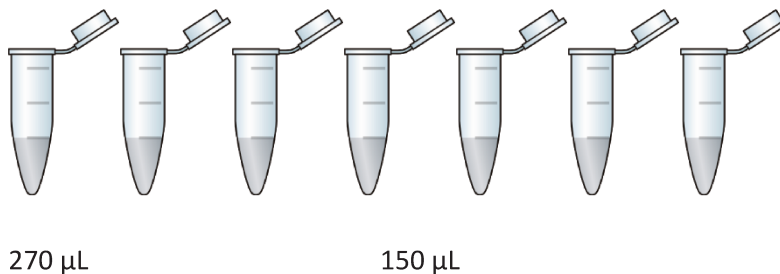
- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente no vortex com o adaptador para microplacas.
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 4 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.
- 8) Colocar 200 μ L do “MMP-3 Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente, sempre no vortex.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μ L do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 30 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μ L da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva log-log. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

MMP-8 (R&D catálogo #DMP800)

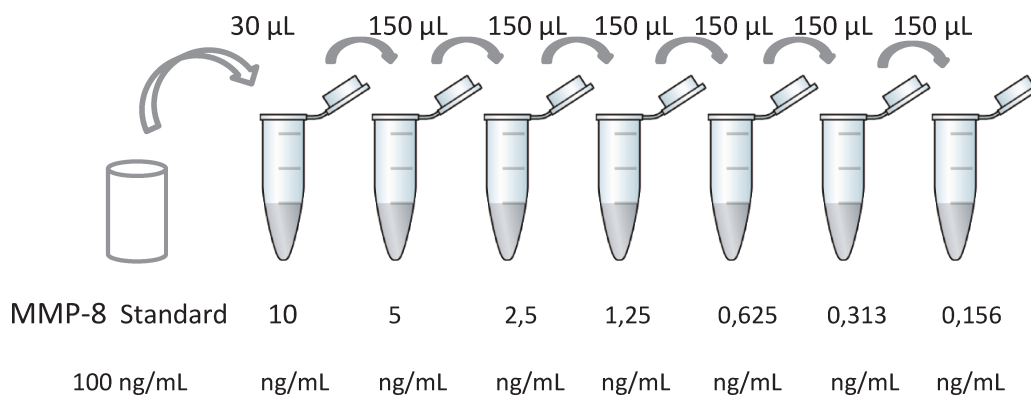
- 1) Preparo dos reagentes:

A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- a) Reconstituir o “MMP-8 Standard” do kit com 1 mL de água LAL. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- b) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- c) Colocar 270 µL do “Calibrator Diluent RD5-10” no primeiro tubo e 150 µL nos restantes.

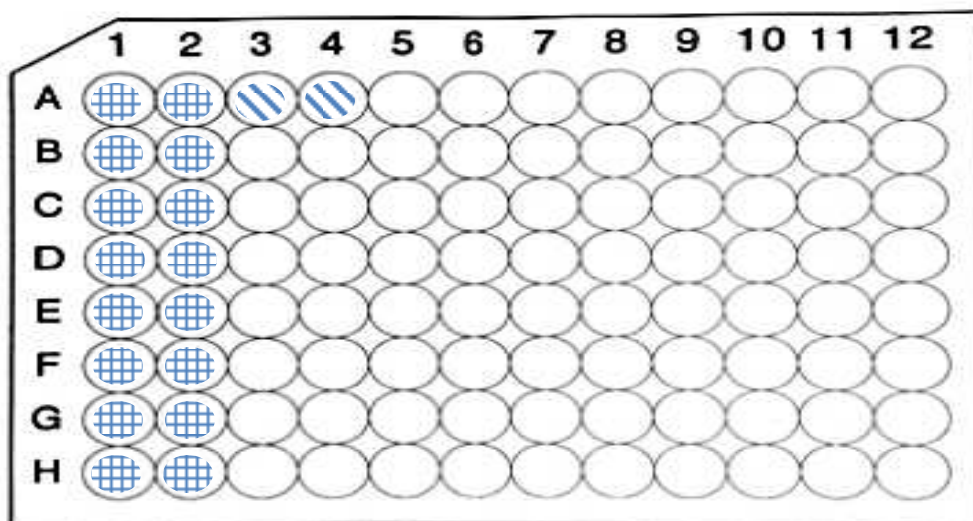



- d) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.




- e) Mais um tubo será utilizado unicamente com o “Calibrator Diluent RD5-10”. Ele será o zero padrão da curva (Blank, 0 ng/mL)
- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
 - 3) Adicionar 150 µL do “Assay Diluent RD1-52” em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.

- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 50 μL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 50 μL da diluição 10 ng/mL
- B1 e B2 com 50 μL da diluição 5 ng/mL
- C1 e C2 com 50 μL da diluição 2,5 ng/mL
- D1 e D2 com 50 μL da diluição 1,25 ng/mL
- E1 e E2 com 50 μL da diluição 0,625 ng/mL
- F1 e F2 com 50 μL da diluição 0,313 ng/mL
- G1 e G2 com 50 μL da diluição 0,156 ng/mL
- H1 e H2 com 50 μL Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 50 μL de cada amostra.

- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente no vortex com o adaptador para microplacas.
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μL da solução preparada no

item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser realizado 4 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.

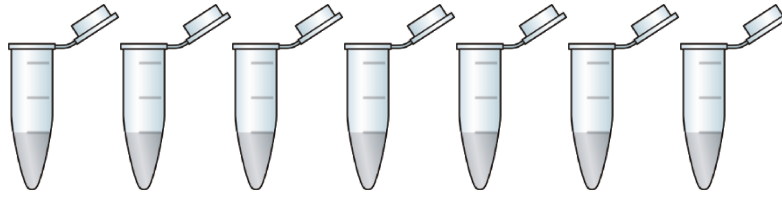
- 8) Colocar 200 μL do “MMP-8 Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente, sempre no vortex.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 30 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva log-log. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

MMP-9 (R&D catálogo #DMP900)

- 1) Preparo dos reagentes:

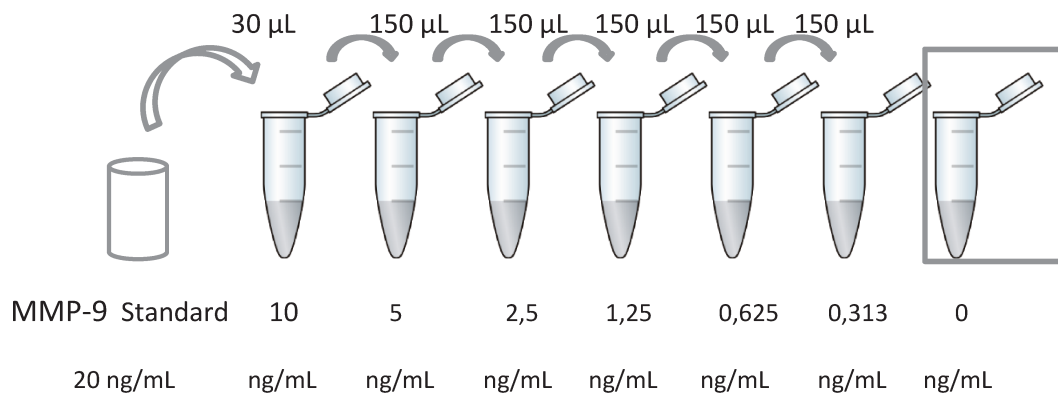
A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

- a) Reconstituir o “MMP-9 Standard” do kit com água LAL segundo concentração indicada no frasco. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- b) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- c) Colocar 500 μL do “Calibrator Diluent RD5-10” em todos os tubos.

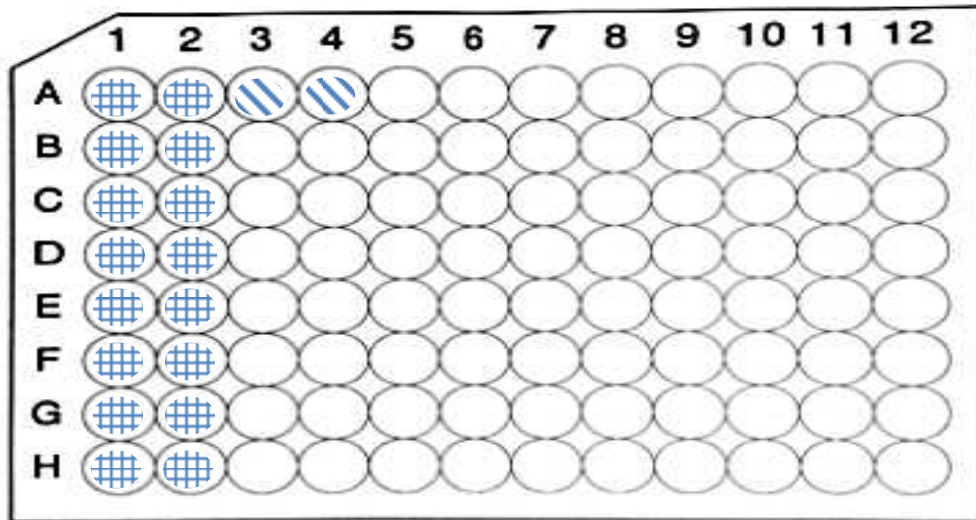


500 μ L

- d) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.



- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
- 3) Adicionar 100 μ L do "Assay Diluent RD1-34" em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.
- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 100 μ L para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 100 μ L do MMP-9 standard
- B1 e B2 com 100 μ L da diluição 10 ng/mL
- C1 e C2 com 100 μ L da diluição 5 ng/mL
- D1 e D2 com 100 μ L da diluição 2,5 ng/mL
- E1 e E2 com 100 μ L da diluição 1,25 ng/mL
- F1 e F2 com 100 μ L da diluição 0,625 ng/mL
- G1 e G2 com 100 μ L da diluição 0,313 ng/mL
- H1 e H2 com 100 μ L Blank

Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 100 μ L de cada amostra.

- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente no vortex com o adaptador para microplacas.
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o "Wash Buffer" do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do "Wash Buffer".
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser

realizado 4 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.

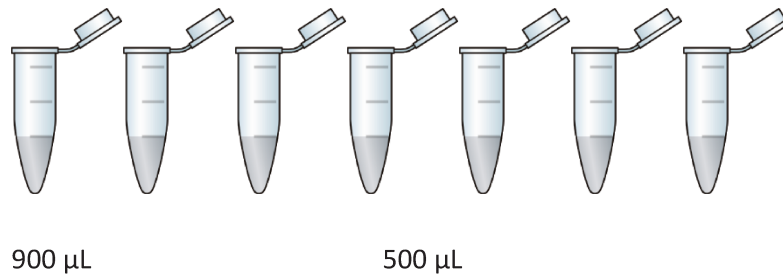
- 8) Colocar 200 μL do “MMP-9 Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente, sempre no vortex.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 30 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva 4-PL. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

MMP-13 (R&D catálogo #DM1300)

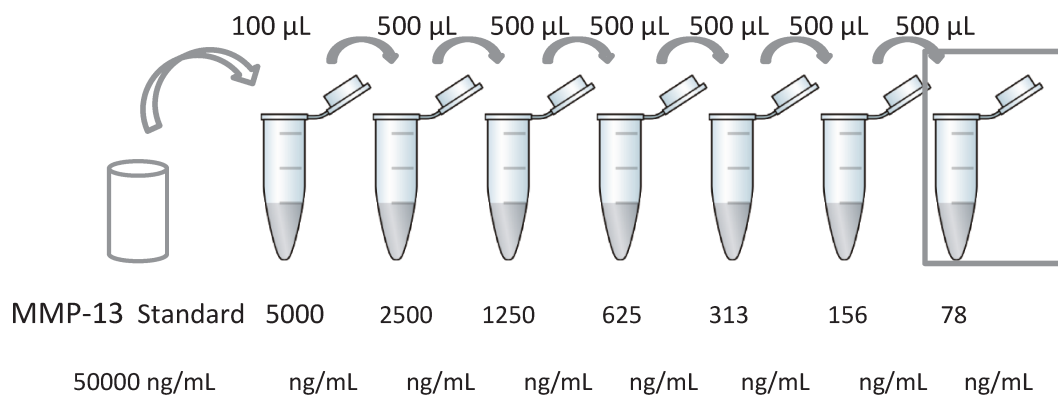
- 1) Preparo dos reagentes:

A primeira coisa que será feita é o preparo da curva padrão.

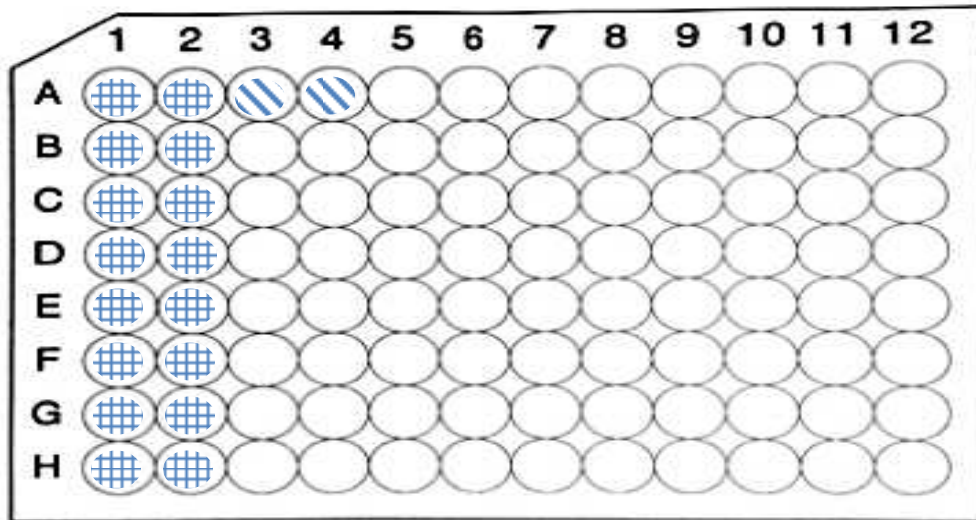
- a) Reconstituir o “MMP-13 Standard” do kit com 1 mL de água LAL. O frasco deverá ser agitado suavemente e permanecer parado por um mínimo de 15 minutos antes de começar as diluições .
- b) Pegar 7 ependorffs ou tubos de vidros estéreis e coloca-los em uma estante.
- c) Colocar 900 μL do “Calibrator Diluent RD5-10” no primeiro tubo e 500 nos restantes.




d) A partir de agora será feita a diluição seriada de acordo com o esquema abaixo. Os tubos devem ser vortexados antes de ser feita a transferência para o tubo seguinte.




- 2) Retirar a placa do envelope e coloca-la dentro do fluxo.
- 3) Adicionar 100 µL do “Assay Diluent RD1-34” em cada poço da placa. Esse componente contém um precipitado e por isso, deve ser bem misturado (vortex) antes e durante o seu uso.
- 4) Vamos agora preencher toda a placa de 96 poços com 50 µL para todos os componentes da curva padrão, do controle e das amostras, de acordo com o diagrama abaixo:



 Essas duas primeiras colunas serão preenchidas com as diluições para montar a curva padrão. Será realizada da seguinte forma:

- A1 e A2 com 50 μ L da diluição 5000 ng/mL
- B1 e B2 com 50 μ L da diluição 2500 ng/mL
- C1 e C2 com 50 μ L da diluição 1250ng/mL
- D1 e D2 com 50 μ L da diluição 625 ng/mL
- E1 e E2 com 50 μ L da diluição 313 ng/mL
- F1 e F2 com 50 μ L da diluição 156 ng/mL
- G1 e G2 com 50 μ L da diluição 78 ng/mL
- H1 e H2 com 50 μ L Blank

 Os poços restantes serão preenchidos, sempre em duplicata, com 50 μ L de cada amostra.


- 5) Cubra a placa com a película protetora (adesivo) e incubar por 2 hrs a temperatura ambiente no vortex com o adaptador para microplacas.
- 6) Preparar o solvente para lavagem da placa. Utilizar o “Wash Buffer” do kit verificando que não existem cristais formados no frasco. Se houver, misture delicadamente até que todos tenham se dissolvido. Em seguida, colocar em um béquer 480 mL de água destilada e misturar com os 20 mL do “Wash Buffer”.
- 7) Após as duas horas, fazer a lavagem da placa da seguinte forma: levar a placa na pia e tirar todo o líquido presente. Depois encher cada poço com 400 μ L da solução preparada no item 6, novamente dispensar todo o conteúdo na placa e em seguida, bater a placa na mesa sobre um papel toalha para remover o excesso. Esse procedimento deve ser


realizado 4 vezes. Ao final, se necessário, remover todas as bolas presentes com pipetas, aspirando o conteúdo.

- 8) Colocar 200 μL do “MMP-13 Conjugate” em cada poço da placa. Cobrir a placa com outro adesivo e incubar por mais 2 horas a temperatura ambiente, sempre no vortex.
- 9) Realizar novamente a lavagem da placa, como descrito no item 7
- 10) Para preparar o próximo reagente, vamos misturar em uma placa de petri os “Color Reagents A e B” obtendo assim o “Substrate Solution”. Eles devem ser misturados juntos e usados em no máximo 15 minutos. Nessa hora, é bom desligar as luzes do laboratório, porque essa mistura reage à luz.
- 11) Adicionar 200 μL do “Substrate Solution” em cada poço da placa e cobrir ela com papel alumínio para proteger da luz e esperar 30 min a temperatura ambiente.
- 12) Adicionar 50 μL da “Stop Solution” em cada poço da placa. Nesse momento a cor dos poços deve mudar de azul para amarelo. Se a cor nos poços não estiver homogênea devemos misturar suavemente o poço com uma ponteira.
- 13) Levar a placa para o leitor de ELISA para avaliar a densidade óptica a 450nm. Deve ser utilizado um parâmetro de curva log-log. A leitura deve ser realizada dentro dos 30 min após ter adicionado a “Stop Solution”.

ANEXOS

ANEXO 1 – Comitê de ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS




CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Análise microbiológica, de endoxinas e de citocinas pró-inflamatórias em infecções endodônticas primárias com presença de lesões periapicais", protocolo nº 132/2010, dos pesquisadores Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e Daniel Rodrigo Herrera Morante, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 03/02/2011.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "**Microbiological analysis and quantification of endotoxins and proinflammatory cytokines from primarily infected root canals with apical periodontitis**", register number 132/2010, of Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes and Daniel Rodrigo Herrera Morante, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 02/03/2011.


Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2 – Termo de consentimento livre e esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

As informações contidas neste prontuário foram fornecidas pela orientadora Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou pelo aluno de doutorado Daniel Rodrigo Herrera Morante, objetivando convidar e formar acordo, por escrito, mediante o qual o indivíduo, parte integrante da pesquisa, autoriza sua participação, com pleno conhecimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá por livre arbítrio e sem qualquer coação.

I. TÍTULO DA PESQUISA

"Análise microbiológica, de endoxinas e de citocinas pró-inflamatórias em infecções endodônticas primárias com presença de lesões periapicais".

II. PROPOSIÇÃO GERAL

O objetivo desta pesquisa é correlacionar o conteúdo microbiano e endotóxico de canais radiculares com necrose pulpar e lesão periapical, com a expressão das citocinas pró-inflamatórias IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e PGE-2.

III. JUSTIFICATIVA

A presente pesquisa justifica-se considerando os seguintes fatores:

- 1- Este projeto faz parte da linha de pesquisa da Área e dos pesquisadores envolvidos no projeto e dará continuidade aos trabalhos já realizados financiados pela FAPESP e CNPq.
- 2- A realização deste projeto será uma continuação da linha de pesquisa da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP, correlacionando agora a microbiota e conteúdo endotóxico com a expressão das citocinas pró-inflamatórias em todas as etapas do tratamento endodôntico.
- 3- É importante entender a relação entre a presença de espécies microbianas específicas e seus subprodutos com a expressão de citocinas pró-inflamatórias, relação que seria a responsável pela instalação e perpetuação das lesões periapicais.

IV. PROCEDIMENTO DO EXPERIMENTO

Entre a população que procure atendimento odontológico na Clínica de Especialização de Endodontia serão selecionados, pelo doutorando Daniel Rodrigo Herrera Morante, 24 indivíduos voluntários, com pelo menos um dente com necessidade de intervenção endodôntica por necrose do tecido pulpar, com presença de lesão periapical. Serão selecionados pacientes de ambos os gêneros com idade entre 18 e 60 anos.

Não serão incluídos pacientes que tiverem tomado antibiótico nos últimos 4 meses, e os casos que não for possível acessar todo o comprimento do canal radicular.

Para cada paciente serão anotados: idade, sexo, estado pulpar, profundidade da bolsa periodontal, mobilidade dental, presença de edema dos tecidos periodontais, história de medicação e os achados radiográficos. Serão anotados os aspectos físicos do canal durante a coleta da amostra, tais como canal seco, presença de exsudado claro, purulento ou hemorrágico. Os aspectos clínicos do dente envolvido, tais como presença ou não de cáries e restaurações serão também anotados. Sendo descartados os casos de antibioticoterapia prévia nos últimos 4 meses, os casos com

canais expostos a cavidade oral, dentes com fístula ou casos em que lesão periapical não seja visível radiograficamente, assim como os casos com doença periodontal avançada.

Será exposto ao paciente que os procedimentos são indolores, pois os tecidos manipulados se encontrarão sob anestesia local. Ainda, os resultados deste exame servirão como um guia para a avaliação microbiológica de dentes que necessitam de tratamento endodôntico.

Tomadas radiográficas serão realizadas semelhante a um tratamento endodôntico, são elas: a. inicial; b. em alguns casos de odontometria em que o localizador apical não exercer sua função; c. prova do cone; d. radiografia de qualidade e e. final. Portanto, os voluntários receberão proteção plumbífera em todos os momentos que adentrarem a sala de radiologia, não causando danos que possam afetar a saúde do paciente.

O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Devidamente informado e concordando com a inclusão do seu nome no banco de dados da pesquisa, será pedido a este paciente que assine o Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

V. DESCONFORTO OU RISCOS ESPERADOS

Não terá nenhum risco de vida ou mudança no seu atendimento convencional, já realizado diariamente nesta Faculdade. O processo é indolor pois a região estará sob anestesia local. Se o indivíduo sentir dor, esta provavelmente não será devido à coleta de amostra e sim a persistência da infecção nos canais radiculares e/ ou nos tecidos periapicais.

Os riscos ou desconfortos causados aos pacientes com a técnica de coleta de amostra com cone de papel absorvente estéril não são significativos. Quando realiza-se a coleta no canal radicular as pontas são introduzidas na medida do comprimento aparente de trabalho, fornecido pela radiografia. O uso da ponta de papel absorvente para secar os canais radiculares faz parte do tratamento e não traz nenhum risco ao paciente. O processo é indolor, pois os tecidos manipulados estarão anestesiados.

Formas de indenização e/ou atendimento diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa

Se o paciente recusar a participar da pesquisa, ou quiser interromper durante a pesquisa, tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Se a manifestação dolorosa ocorrer fora dos dias marcados para a execução do tratamento, o paciente poderá ser atendido no Plantão de Emergência da FOP-UNICAMP, que funciona normalmente de segunda à sexta-feira, de 8:00 às 12:00 h e de 13:30 às 17:30 h e poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis para receber uma assistência imediata através dos telefones: 19 2106 5215 (Laboratório de Endodontia) ou 19 82512660 (Daniel R. Herrera Morante), sem prejuízo ao seu tratamento.

Pesquisas já desenvolvidas no departamento de Endodontia FOP-UNICAMP, mostraram que nenhum dos pacientes participantes relataram algum desconforto relativo à coleta de amostras.

VI. BENEFÍCIOS DO EXPERIMENTO

Não há benefícios diretos pela participação na pesquisa. Os benefícios esperados afetam indiretamente os voluntários, pois estarão relacionados com o desenvolvimento de um tratamento endodôntico mais eficaz e seguro, com o conhecimento dos microrganismos envolvidos nesses casos.

VII. Possibilidades de inclusão em grupo controle ou placebo

Não se aplica inclusão de grupo controle ou placebo.

VIII. Métodos alternativos para obtenção da informação ou tratamento da condição

Não se aplica métodos alternativos.

IX. INFORMAÇÕES

O voluntário tem a garantia de que receberá respostas a qualquer pergunta ou esclarecimento a respeito dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados à pesquisa. Os resultados da pesquisa ficarão à disposição dos sujeitos envolvidos, sendo preservada a identidade dos mesmos.

A pesquisa não acarretará nenhum ônus ao paciente. Não haverá necessidade de deslocamentos ou procedimentos adicionais para coleta de amostra, além das necessárias para o tratamento endodôntico convencional.

X. RETIRADA DO CONSENTIMENTO

O voluntário tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo e assim do grupo de amostra, este não será penalizado e não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

XI. CONSENTIMENTO INFORMADO

Eu, _____
certifico que tenho lido as informações acima e suficientemente esclarecido (a) de todos os itens pela Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes e/ou Daniel Rodrigo Herrera Morante, estou plenamente de acordo com a realização do experimento. Assim, eu autorizo a execução da pesquisa, exposta acima, em mim.

Piracicaba, _____ de _____ de 201 .

Nome: _____

RG: _____

Assinatura:

ATENÇÃO:

Para qualquer informação ou esclarecimento sobre o tratamento, o paciente poderá entrar em contato com os pesquisadores através dos telefones citados acima, e-mail: dani_hm76@hotmail.com e bpgomes@fop.unicamp.br. O paciente tem toda a liberdade de pedir esclarecimentos sobre a metodologia antes e durante a pesquisa, podendo ou não concordar em participar da mesma. Caso recuse, não haverá prejuízo ao seu tratamento, o qual será prosseguido normalmente.

Uma cópia deste termo (TCLE) será entregue ao voluntário, portanto o mesmo terá em mãos telefones e endereços para contato.

Apesar dos resultados clínicos e microbiológicos serem divulgados publicamente para fins acadêmicos e científicos, será preservada a privacidade do indivíduo quanto aos dados confidenciais que possam a ser envolvidos na pesquisa.

A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos como voluntário da pesquisa, escreva para o **Comitê de Ética em Pesquisa da FOP – UNICAMP**, endereçado a Av. Limeira, 901 – Caixa Postal 52, CEP 13414-903, o pelo fone/fax (19) 2106-5349, e-mail cep@fop.unicamp.br, na cidade de Piracicaba/SP.

Pesquisadores: Prof^a. Dr^a. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes bpgomes@fop.unicamp.br fone (19) 2106 5215 e Daniel R. Herrera Morante dani_hm76@hotmail.com fone (19) 82512660. Av. Limeira, 901. Bairro Areão, Piracicaba-SP. Departamento de Odontologia Restauradora, Endodontia. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, FOP-UNICAMP.