

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FRANCINE CESARIO

**Evaluation of physico-chemical and biological properties of calcium
hydroxide associations**

**Avaliação de propriedades físico-químicas e biológicas de
associações ao hidróxido de cálcio**

BAURU
2019

FRANCINE CESARIO

**Evaluation of physico-chemical and biological properties of calcium
hydroxide associations**

**Avaliação de propriedades físico-químicas e biológicas de
associações ao hidróxido de cálcio**

Tese constituída por artigos apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências no Programa de Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Endodontia.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan

Versão Corrigida

BAURU

2019

Cesario, Francine

Evaluation of physico-chemical and biological properties of calcium hydroxide associations / Francine Cesario – Bauru, 2019.

73p. : il. ; 31cm.

Tese (Doutorado/Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan

Nota: A versão original desta tese encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para sua idealização, realização e finalização, seja física ou moralmente. Sem vocês não seria possível.

“Nenhum homem é uma ilha...” - John Donne

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, pela minha família e amigos, por guiar meus passos, mostrando a luz nos momentos de dificuldade e pela força para superar os obstáculos.

“Entregue seu caminho ao senhor, nele confie e ele agirá. Salmo 37 (36),5”.

À minha Mãe, **Izilda**, a pessoa que mais admiro no mundo. Exemplo de dedicação, coragem, força e amor. Agradeço por todas as vezes em que sem hesitar sacrificou os seus sonhos para que eu possa realizar os meus, por estar ao meu lado e sempre me apoiar em toda e qualquer situação. Você é meu exemplo de vida, de mulher, mãe, esposa! EU TE AMO. **“Enquanto houver você do outro lado, desse aqui eu consigo me orientar”**

Ao meu Pai **Edvaldo** (*in memoriam*), que construiu base principal da nossa família, saudades eternas! Te amo.

Ao meu irmão, **Fábio** obrigada por fazerem parte da minha vida.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Rodrigo Ricci Vivan**, meu maior exemplo durante a graduação, por seu profissionalismo, empenho e dedicação à profissão e aos alunos, motivo por eu ter escolhido a endodontia como especialidade e o que acabou me levando a fazer a pós-graduação. Agradeço por ter me ensinado os primeiros passos na endodontia e na ciência através da iniciação científica, pela continuação desses ensinamentos até aqui e pelo incentivo a sempre buscar a ser mais e melhor em tudo o que faço. Minha gratidão e reconhecimento. Obrigada por tudo.

Ao **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**, por todos os ensinamentos durante a pesquisa, por sempre estar à disposição para tirar dúvidas, pela realização da análise estatística.

Aos Professores do departamento de endodontia da FOB/USP, **Marco Antonio Hungaro Duarte, Flaviana Bombarda de Andrade, Ivaldo Gomes de Moraes (*In memorian*), Clóvis Monteiro Bramante, Roberto Brandão Garcia e Norberti Bernardineli** por todo carinho, atenção, paciência e por todos os valiosos ensinamentos transmitidos durante a nossa convivência. Tenho uma imensa admiração, carinho e respeito.

Aos funcionários da Endodontia, **Suely Regina Bettio e Edimauro de Andrade**, por estar sempre dispostos a me ajudar, pela boa convivência por todos esses anos, muito obrigado pelo carinho.

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Weckwerth**, obrigado por dispor as cepas bacterianas e pela ajuda com as minhas dúvidas na parte microbiológica do trabalho.

Ao **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, pela disposição e ajuda durante a realização desta pesquisa no CIP.

À colega do CIP, **Cintia Tokuhara**, pelo auxílio para realização de parte dessa pesquisa, em ajudar a manusear os equipamentos e pela boa convivência.

À especialista em laboratório do centro integrado em pesquisa da FOB-USP, **Márcia Sirlene Zardin Graeff**, pela ajuda no Microscópio Confocal de Varredura a Laser. Obrigada pela paciência, em sempre estar disposta em me atender. Você foi fundamental para a realização deste trabalho.

À técnica de laboratório **Larissa Tercilia Grizzo** do departamento de bioquímica da FOB/USP, que realizou a leitura na liberação do cálcio. Você também fundamental para realização desta pesquisa.

Ao funcionário do CIP, **Marcelo Miranda Ribeiro Lopes** pela disponibilidade e inestimável ajuda a todo momento.

À amiga **Rafaela Fernandes Zancan**, agradeço não só por toda a ajuda durante a realização desse trabalho, que foi fundamental, mas por sua amizade sincera dentro e fora da faculdade, por todas as conversas e trocas de experiências. Espero sempre ter sua amizade!

À amiga **Talita Tartari**, por sempre me ouvir, por todos os conselhos, por todas as dúvidas que me ajudou a sanar! Te admiro muito, espero levar sua amizade para sempre!

Aos amigos que pós-graduação me deu **Mariana Borges, Denise Oda, Lyz Cristina Furquim Canali, Clarissa Rodrigues Teles, Bruno Martini Guimarães, Ericson Janólio de Camargo, Victor de Moraes Cruz, Raquel Midená**, agradeço todas as trocas de conhecimentos e boa convivência.

Aos meus colegas **Murilo Alcalde e Renan Furlan** que sempre estiveram dispostos a me ajudar e me ajudaram diversas vezes, dentro e fora da instituição.

Aos meus colegas **da pós-graduação** do departamento de Endodontia, agradeço por todos os bons momentos compartilhados, convivência agradável e conhecimentos que dividimos, desejo um caminho de saúde, felicidade e sucesso à todos.

Aos meus amigos **Aline Alves e Diego Magalhães**, meus irmãos por escolha, só tenho a agradecer por tudo que fizeram e fazem por mim e pela amizade sincera, amo vocês!

“Quem diz que não acredita em alma gêmea ainda não encontrou o amigo certo. Não há nenhuma prova de que duas pessoas são completamente iguais ou complementares além de uma amizade verdadeira. Mas não me refiro a qualquer tipo de amigos. Estou falando daqueles que leem pensamentos, que adivinham antes da gente falar, que topam qualquer aventura, que choram as nossas dores e comemoram, mais que nós mesmos, as nossas vitórias. Se tudo isso não servir de comprovação para a existência de “almas gêmeas”, me perdoa – eu também não acredito nelas. “

À minha amiga **Flavia Faria**, companheira de graduação para à vida, agradeço por tantos momentos que dividimos, de alegria e tristeza. Obrigada por ser minha parceira e por sempre estar ao meu lado em todas as situações.

As minhas amigas **Mariana Ferro, Fernanda Carvalho, Ana Luiza Miranda, Luana Campos, Amanda Camilo, Bruna Rapini, Julia Marques, Letícia Campos** e ao meu amigo **Iago Ladeira**, agradeço a amizade e companheirismo de sempre!! Amo vocês! “Um dos maiores prazeres concedidos aos homens sobre a terra é de reencontrar corações que simpatizam com o seu”.

Ao meu namorado **Rafael**, obrigada por tudo, desde o primeiro dia que eu te “reencontrei”. Tudo tem o tempo certo pra acontecer e nada acontece fora do tempo determinado por Deus.

Assim também agradeço a todos que direta ou indiretamente ajudaram para realização desse trabalho, muito obrigado! Que Deus os abençoe.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa do diretor **Prof. Dr. Carlos Ferreira dos Santos** e do vice-diretor **Prof. Dr. Guilherme dos Reis Pereira Janson**.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, na pessoa da Presidente **Prof. Dra. Izabel Regina Fischer Rubira de Bullen**.

Ao curso de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de Concentração em Endodontia da Faculdade de Odontologia de Bauru – USP na pessoa de **Prof.Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte**.

Ao Centro Integrado de Pesquisa (CIP), na pessoa de **Prof. Dr. Rodrigo Cardoso de Oliveira**, Coordenador por permitir o uso das dependências do laboratório para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À Disciplina de Endodontia, do Departamento de Dentística, Endodontia e Materiais odontológicos, na pessoa do **Prof. Dr. Marco Antonio Hungaro Duarte** por permitir o uso das dependências e laboratório para o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela concessão da bolsa de doutorado.

***“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas, mas ao tocar uma
alma humana, seja apenas outra alma humana”***

Carl Jung.

RESUMO

“Avaliação de propriedades físico-químicas e biológicas de associações ao hidróxido de cálcio”

O objetivo desse estudo foi avaliar diversas propriedades de pastas que associaram AINEs e antibióticos ao hidróxido de cálcio (CH). Foram analisados cinco grupos, sendo: G1: CH + propilenoglicol; G2: CH + 5% de diclofenaco de sódio + propilenoglicol; G3: CH + 5% de amoxicilina + propilenoglicol; G4: CH + 5% de ibuprofeno + propilenoglicol; e G5: CH + 5% de metronidazol + propilenoglicol. Canais radiculares de dentes de acrílico (n = 10/grupo) foram preenchidos com as pastas, e escaneados por microtomografia computadorizada antes (inicial) e após 7, 15 e 30 dias de imersão em água ultrapura para avaliar a solubilidade das pastas. O pH e a liberação de íons cálcio nessa água foram determinados por meio de um pHmetro e um espectrofotômetro de absorção atômica, respectivamente. Foi induzido um biofilme de *E. Faecalis* e um biofilme misto de *E. faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* em blocos de dentina (n = 4/ biofilme). Os blocos foram então distribuídos e imersos nas pastas experimentais por 7 dias para determinar a ação antimicrobiana. Para avaliar a adesão microbiana, blocos de dentina bovina foram acondicionados em placas de petri e em seguida foram cobertos com as pastas e levados para estufa a 37°C, por 7 dias. Após, foi realizada a contaminação dos espécimes pelo período de uma hora utilizando-se a bactéria *E. faecalis*. Por meio do corante live/dead e de um microscópio confocal de varredura a laser imagens foram capturadas e a porcentagem de células bacterianas viáveis e não viáveis determinada. As pastas foram também inseridas em placas contendo macrófagos aderidos por 24 horas. A análise de produção de óxido nítrico (NO) por essas células foi realizada pela reação de Greiss. Os dados foram comparados estatisticamente ($\alpha < 0.05$). Os resultados mostraram que a maior liberação de íons hidroxila foi observado no período de 30 dias para o grupo G1 (P < 0.05). A liberação de íons cálcio foi maior no grupo G5 no período de 7 dias (P < 0,05). Todos os grupos tiveram perda de massa semelhantes e ação antimicrobiana contra biofilme misto (P > 0,05). No biofilme de *E. faecalis* a maior ação antimicrobiana foi observada no grupo G5 (P < 0,05) seguida do G4 (P < 0,05), assim como para adesão de M.O e liberação de NO. Todos os grupos foram diferentes estatisticamente do controle

positivo em todos os testes ($P < 0.05$). As associações de AINEs com o hidróxido de cálcio não interferiram no pH, liberação de íons cálcio e solubilidade. As associações de AINEs e antibióticos contribuíram para ação antimicrobiana da pasta de hidróxido de cálcio. O uso do metronidazol aumentou a adesão de células bacterianas de *E. faecalis* à dentina e a produção de óxido nítrico por macrófagos.

Palavras-chave: hidróxido de cálcio, diclofenaco de sódio, ibuprofeno, biofilme.

ABSTRACT

"Evaluation of physical-chemical and biological properties of calcium hydroxide associations"

This study aimed to evaluate various properties of pastes that associated NSAIDs and antibiotics with calcium hydroxide (CH). Five groups were analyzed: G1: CH + propylene glycol; G 2: CH + 5% sodium diclofenac + propylene glycol; G3: CH + 5% amoxicillin + propylene glycol; G4: CH + 5% ibuprofen + propylene glycol; and G5: CH + 5% metronidazole + propylene glycol. Root canals of acrylic teeth (n = 10 / group) were filled with the pastes and scanned by computerized microtomography before (initial) and after 7, 15 and 30 days of immersion in ultrapure water to evaluate the solubility of the pastes. The pH and calcium ion release in this water were determined through a pH meter and an atomic absorption spectrophotometer, respectively. An *E. Faecalis* biofilm and a mixed *E. faecalis* and *Pseudomonas aueruginosa* biofilm were induced in dentin blocks (n = 4 / biofilm). The blocks were then distributed and immersed in the experimental pastes for 7 days to determine antimicrobial action. To evaluate microbial adhesion, bovine dentin blocks were placed in petri dishes and then covered with pastes and placed in a greenhouse at 37°C for 7 days. Afterward, the specimens were contaminated for one hour using the bacterium *E. faecalis*. Through the live/dead dye and a confocal laser scanning, microscope images were captured and the percentage of viable and non-viable bacterial cells determined. The pastes were also inserted into plates containing macrophages adhered for 24 hours. The analysis of nitric oxide (NO) production by these cells was performed by Greiss reaction. Data were statistically compared ($\alpha < 0.05$). The results showed that the highest release of hydroxyl ions was observed within 30 days for group G1 ($P < 0.05$). The release of calcium ions was higher in group G5 within 7 days ($P < 0.05$). All groups had a similar mass loss and antimicrobial action against mixed biofilm ($P > 0.05$). In *E. faecalis* biofilm the highest antimicrobial action was observed in group G5 ($P < 0.05$) followed by G4 ($P < 0.05$), as well as for adhesion of M.O and release of NO. All groups were statistically different from the positive control in all tests ($P < 0.05$). Associations of NSAIDs with calcium hydroxide did not interfere with pH, calcium ion release and solubility. Combinations of NSAIDs and antibiotics contributed to the antimicrobial action of

calcium hydroxide paste. The use of metronidazole increased the adhesion of *E. faecalis* bacterial cells to dentin and the production of nitric oxide by macrophages.

Keywords: calcium hydroxide, sodium diclofenac, ibuprofen, biofilm.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE SÍMBOLOS

ATCC	<i>American type culture collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CH	<i>Calcium hydroxyde</i>
CO ₂	<i>Carbon dioxide</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
LPS	<i>Lipopolissararídeo</i>
LTA	<i>Lipoteichoic acid</i>
MDM	<i>Monocyte-derived macrophages</i>
mg	<i>Milligram</i>
mL	<i>Milliliter</i>
mm	<i>Millimeter</i>
nm	<i>Nanometer</i>
NO	<i>Nitric Oxide</i>
P	<i>Probability</i>
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
°C	<i>Degree Celsius</i>
%	<i>Percent</i>
<	<i>Less-than</i>
≥	<i>Greater than or equal to</i>

TABLE OF CONTENTS

1	INTRODUCTION	17
2	ARTICLES	23
2.1	ARTICLE 1	23
2.2	ARTICLE 2	39
3	DISCUSSION	59
4	CONCLUSION	65
	REFERENCES	69

1 INTRODUCTION

1 INTRODUCTION

Calcium hydroxide (CH) is recommended as an intracanal medication for the treatment of apical periodontitis (SIQUEIRA & LOPES 1999). Its mechanism of antimicrobial action is related to the dissociation of calcium and hydroxyl ions, transforming the environment into an alkaline pH inhibiting the enzymatic activities that are essential for microbial survival, ie metabolism, growth and cell division (ESTRELA et al., 1995, SIQUEIRA & LOPES 1999). An important feature of CH is its ability to inactivate bacterial lipopolysaccharides (LPS) found on the outer membrane of gram-negative bacteria, as well as inactivate lipoteichoic acid (LTA) in gram-positive bacteria by attenuating the host response and reducing progress of apical periodontitis (BAIK et al., 2011).

The process of pulpal inflammation, necrosis, and tissue infection gradually progress to the apical region until the periradicular tissues are affected. There is a pattern of microbial colonization in the root canal system, resulting in apical periodontitis, which represents the most frequently diagnosed apical odontogenic disease in human teeth (SCHULZ et al., 2009), where the cause is a combination of strict and facultative anaerobic microbiota. (FUJI et al., 2009).

Some microorganisms are resistant to endodontic therapy and CH, resulting in a persistent infection (SIQUEIRA & LOPES 1999). Environmental changes, such as rising pH, can stimulate genetic cascades that modify the characteristics of the bacterial cell. The formation of biofilms also represents a bacterial adaptation that increases the resistance of microorganisms (SIQUEIRA & RÔÇAS 2008).

Enterococcus faecalis (*E. faecalis*) is one of the microorganisms often found in persistent infections and endodontic therapy failures (PINHEIRO et al., 2003). Studies show that *E. faecalis* can withstand adverse environmental conditions and has great resistance to direct exposure to CH dressing, which could determine the prevalence of this bacterium in persistent periapical lesions (EVANS et al., 2002, CHÁVEZ DE PAZ et al., 2003, MCHUGH et al., 2004, CHÁVEZ DE PAZ et al., 2007).

Pseudomonas aureginosa (*P.aureginosa*) is a gram-negative aerobic bacterium commonly found in hospital infection, resistant to antibiotics and antimicrobials due to the permeability of its lipopolysaccharide membrane (YOON et al., 2002). Its strength and ease in biofilm formation make it a model for gram-negative biofilms, being related to endodontic treatment failures (SIREN., 1997). *E. faecalis* and mixed biofilms (*E. faecalis* and *P.aureginosa*) are resistant to the usual treatment with CH (KLOTZ, RUTTEN, SMITH, BABCOCK, & CUNNINGHAM, 1993; ZANCAN et al., 2016). persistent root canal infection.

Contact of intracanal medication, either directly or indirectly, with periapical tissues can stimulate inflammatory cells, especially macrophages (BRACKETT et al., 2009; SOUSA, CALVALCANTI, MARQUES, 2009). These are also prevalent in endodontic infections and are the main cells of the immune system that destroy microorganisms, and are involved in the process of apical healing (LEONARDO, 1997; SOUSA, CALVALCANTI, MARQUES, 2009). Its main activity is phagocytosis, and during this process, they release a large amount of mediators that attract neighboring cells to the affected area to reconstruct it (CONSOLARO, 2009). They present great capacity for synthesis and secretion of intra and extracellular substances, among them intermediate nitrogen compounds, such as nitric oxide (QUEIROZ et al., 2005; CONSOLARO, 2009).

Nitric oxide (NO) is a reactive intermediate species of nitrogen oxide, synthesized by the activity of nitric oxide synthase, an enzyme present in macrophages (BOGDAN et al.,2015). Substances generated from the reaction of NO molecules with themselves or with other molecules, such as reactive oxygen species, act on various microorganisms, including *E. faecalis* (BAIK et al., 2008, PROLO et al., 2014, WEISS & SCHAIBLE 2015). When released in large quantities it can increase cellular metabolism and potentiate the inflammatory process, promoting the progression of periapical lesion (BAIK et al., 2011) and in small amounts, favors the foreign body isolation process (GUTIERREZ, 2006).

Among many ways to analyze the cytotoxicity of a material, NO dosing is being commonly used. (AZAR et al., 2000; SHIMAUCHI et al., 2001; TAKEICHI et al., 1998). This free radical gas participates in several pathological processes, such as

macrophage suppressing activity, inhibition of leukocyte adhesion in the endothelial wall, and cellular apoptosis (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991).

Considering the importance of the biological properties of intracanal medications, since for periapical tissue repair, they must not stimulate an exacerbated inflammatory response. Thus, a study evaluating the cytotoxicity action of the associations in the release of NO by macrophages becomes opportune.

In an attempt to increase the effectiveness of CH, substances with different antimicrobial agents and chemical characteristics have been used in combination with CH to enhance its antimicrobial action. Among them paramonchlorophenol, chlorhexidine, iodoform (ESTRELA et al., 2006; DELGADO et al., 2010; LIMA et al., 2013). More recent studies have shown that some non-steroidal anti-inflammatory drugs have antimicrobial action (FREITAS et al., 2017; CHOCKATTU et al., 2018). Silva et al., 2019 evaluated the cytotoxicity and biocompatibility of CH pastes associated with two types of NSAIDs, sodium diclofenac and ibuprofen in rat cell and subcutaneous culture concluded that the pastes were not cytotoxic and showed biocompatibility.

E. faecalis and mixed biofilms (*E. faecalis* and *P.aureginosa*) are resistant to the usual treatment with CH (KLOTZ, RUTTEN, SMITH, BABCOCK, & CUNNINGHAM, 1993; ZANCAN et al., 2016) persistent root canal infection.

The present study aimed to evaluate the effect of the association of NSAIDs and antibiotics with CH: diclofenac sodium, ibuprofen, amoxicillin and metronidazole, and their pH, calcium ion release, solubility, adhesion by *E. faecalis*, antimicrobial action against *E. faecalis* and *P. aueruginosa* mixed biofilm and *E. faecalis* biofilm and NO release by macrophages.

4 CONCLUSIONS

4 CONCLUSIONS

- All combinations of medications with CH paste did not interfere in the physicochemical properties studied compared to paste without additions;
 - In antimicrobial activity, all anti-inflammatory drugs significantly reduced the number of viable bacteria compared to control and pure paste.
 - On adhesion, specimens in which the CH paste associated with metronidazole was placed increased bacterial cells adhered within one hour of contact. This group was also the one that maintained the highest pH for up to 15 days compared to the others.
 - NO production by stressed macrophages was similar in the anti-inflammatory groups and lower for diclofenac sodium.
-
-

REFERENCES

REFERENCES

Azar NG, Heidari M, Bahrami ZS, Shokri F. In vitro cytotoxicity of a new epoxy resin root canal sealer. *J Endod* 2000; 26:462-5.

Baca P, Junco P, Arias-Moliz MT, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual and antimicrobial activity of final irrigation protocols on *Enterococcus faecalis* biofilm in dentin. *J Endod* 2011;37(3):363-6.

Baik JE, Jang KS, Kang SS, et al. Calcium hydroxide inactivates lipoteichoic acid from *Enterococcus faecalis* through deacylation of the lipid moiety. *J Endod* 2011; 37:191–196.

Baik JE, Ryu YH, Han JY, Im J, Kum KY, Yun CH, Lee K, Han SH. Lipoteichoic acid partially contributes to the inflammatory responses to *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2008;34(8):975-82.

Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol* 2015;36:161–178.

Brackett MG, Marshall A, Lockwood PE, Lewis JB, Messer RLW, Bouillaguet S, et al. Inflammatory suppression by endodontic sealers after aging 12 weeks in vitro. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2009; 91:839-44.

Chance et al , 1987; Chance K, Lin L, Shovlin FE, Skribner J. Clinical trial of intracanal corticosteroid in root canal therapy. *J Endod* 1987;13(9):466-8.

Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J* 2003;36(7):500-8.

Chávez de Paz LE. Redefining the persistent infection in root canals: possible role of biofilm communities. *J Endod* 2007;33: 652–662.

Chockattu SJ, Deepak BS, Goud KM. Comparison of anti-bacterial efficiency of ibuprofen, diclofenac, and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in an endodontic model: An in vitro study. *J Conserv Dent* 2018; 21:80-84.

Consolaro A. Inflamação e reparo: um sílabo para a compreensão clínica e implicações terapêuticas. Maringá: Dental Press; 2009. 352p.

de Freitas RP, Greatti VR, Alcalde MP, et al. Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. *J Endod* 2017; 43:131-134.

Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, et al. Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010; 36:1389-93.

Ehrmann EH, Messer HH, Adams GG. The relationship of intracanal medicaments to postoperative pain in endodontics. *Int Endod J* 2003; 36(12):868-75.

Estrela C, Estrela CR, Hollanda AC, et al. Influence of iodoform on antimicrobial potential of calcium hydroxide. *J Appl Oral Sci* 2006; 14:33-7.

Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *J Appl Oral Sci* 2003; 11:269-82.

Estrela C, Sydney GB, Bammann LL, Felipe Júnior O. Mechanism of action of calcium and hydroxyl ions of calcium hydroxide on tissue and bacteria. *Braz Dent J* 1995;6(2):85-90.

Evans M, Davies JK, Sundqvist G, et al. Mechanisms involved in the resistance of *Enterococcus faecalis* to calcium hydroxide. *Int Endod J* 2002; 35:221-8.

Fujii R, Saito Y, Tokura Y, Nakagawa KI, Okuda K, Ishihara K. Characterization of bacterial flora in persistence apical periodontitis lesions. *Oral Microbiol Immunol* 2009; 24:502-5.

Gutierrez JCR. Avaliação de citotoxicidade de materiais obturadores de canais radiculares: influência na liberação de fator de necrose tumoral- α , interferon- γ e óxido nítrico em cultura de células murinas. [Tese de Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da Unesp, 2006.

Kayaoglu G, Erten H, Ørstavik D. Growth at high pH increases *Enterococcus faecalis* adhesion to collagen. *Int Endod J* 2005; 38(6):389-96.

Kayaoglu G, Ørstavik D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004; 15(5):308-20.

Klotz SA, Rutten MJ, Smith RL, Babcock SR, Cunningham MD. Adherence of *Candida albicans* to immobilized extracellular matrix proteins is mediated by calcium-dependent surface glycoproteins. *Microb Pathog* 1993; 14(2):133-47.

Korhonen R, Lahti A, Kankaanranta H, et al. Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2005; 4:471–479.

Lima RA, Carvalho CB, Ribeiro TR, et al. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol on infected primary molars: a split-mouth randomized clinical trial. *Quintessence Int* 2013; 44:113–22.

Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J* 2001; 34:399-405.

McHugh CP, Zhang P, Michalek S, et al. pH required to kill *Enterococcus faecalis* in vitro. *J Endod* 2004; 30:218–219.

Mizuno M, Banzai Y. Calcium ion release from calcium hydroxide stimulated fibronectin gene expression in dental pulp cells and the differentiation of dental pulp cells to mineralized tissue forming cells by fibronectin. *Int Endod J* 2008; 41(11):933-8.

Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide, physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43:109-42.

Monsarrat P, Arcaute B, Peters OA, Maury E, Telmon N, Georgelin-Gurgel M, Maret D. Interrelationships in the Variability of Root Canal Anatomy among the Permanent Teeth: A Full-Mouth Approach by Cone-Beam CT. *PLoS One* 2016 20;11(10):e0165329.

Moskow A, Morse DR, Krasner P, Furst ML. Intracanal use of a corticosteroid solution as an endodontic anodyne. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; 58(5):600-4.

Nakajo K, Komori R, Ishikawa S, Ueno T, et al. Resistance to acidic and alkaline environments in the endodontic pathogen *Enterococcus faecalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2006; 21:283-8.

Pinheiro ET, Gomes BP, Ferraz CC, et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *Int Endod J*. 2003; 36:1-11.

Pinheiro ET, Penas PP, Endo M, Gomes BP, Mayer MP. Capsule locus polymorphism among distinct lineages of *Enterococcus faecalis* isolated from canals of root-filled teeth with periapical lesions. *J Endod* 2012; 38:58-61.

Prolo C, Alvarez MN, Radi R. Peroxynitrite, a potent macrophage-derived oxidizing cytotoxin to combat invading pathogens. *Biofactors* 2014; 40:215-25.

Queiroz CES, Soares JA, Leonardo RT, Carlos IZ, Dinelli W. Evaluation of cytotoxicity of two endodontic cements in a macrophage culture. *J Appl Oral Sci* 2005; 13:237-42.

Reynolds et al. 2009 Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspids using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J* 2009; 42:84–92.

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

Roche Y, Yoshimori RN. In-vitro activity of spiramycin and metronidazole alone or in combination against clinical isolates from odontogenic abscesses. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40(3):353-7.

Schulz M, von Arx T, Altermatt HJ, Bosshardt D. Histology of periapical lesions obtained during apical surgery. *J Endod* 2009; 35(5):634-42.

Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-kiji M, Shimabukuro Y, Okada H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *J Endod* 2001; 27: 749-52.

Silva GF, Cesário F, Garcia AMR, Weckwerth PH, Duarte MAH, de Oliveira RC, Vivan RR. Effect of association of non-steroidal anti-inflammatory and antibiotic agents with calcium hydroxide pastes on their cytotoxicity and biocompatibility. *Clin Oral Investig*. 2019; 28.

Siqueira JF Jr, Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32:361-9.

Siqueira JF Jr, Rôças IN. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. *J Endod* 2008; 34(11):1291-1301.e3.

Siren EK, Haapasalo MP, Ranta K, et al. Microbiological findings and clinical treatment procedures in endodontic cases selected for microbiological investigation. *Int Endod J* 1997; 30:91–5.

Slots J, Ting M. Systemic antibiotics in the treatment of periodontal disease. *Periodontol* 2002; 28:106-76.

Sousa LR, Cavalcanti BN, Marques MM. Effect of laser phototherapy on the release of TNF- α and MMP-1 by endodontic sealer-stimulated macrophages. *Photomed Laser Surg* 2009; 27:37-42.

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

Takeichi O, Saito I, Hayashi M, Tsurumachi T, Saito T. Production of human-inducible nitric oxide synthase in radicular cysts. *J Endod*. 1998; 24:157-60.

Taneja K, Kumari M. Use of triple antibiotic paste in the treatment of large periradicular lesions. *J Investig Clin Dent* 2012; 3:72–76.

Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, et al. Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003; 36: 733–9.

Waltimo TM, Sen BH, Meurman JH, Ørstavik D, Haapasalo MP. Yeasts in apical periodontitis. *Crit Rev Oral Biol Med* 2003; 14(2):128-37.

Weiss G, Schaible UE. Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria. *Immunol Rev* 2015; 264:182-203.

Windley W, Teixeira F, Levin L, et al. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005; 31:439–443.

Yang J, Zhao Y, Qin M, et al. Pulp revascularization of immature dens invaginatus with periapical periodontitis. *J Endod*. 2013; 39:288–292.

Yoon SS, Hennigan RF, Hilliard GM, et al. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Dev Cell* 2002; 3:593–603.

Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, Duarte MA. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *J Endod* 2016; 42(12):1822-1828.
