

METALOPROTEINASES DA MATRIZ: PAPEL NO DESENVOLVIMENTO DAS LESÕES PERIAPICAIS E MODULAÇÃO APÓS TRATAMENTO ENDODÔNTICO

Matrix metalloproteinases: role in the development of apical periodontitis and modulation after endodontic treatment

 Francisco Wanderley Garcia de Paula e Silva^a,  Maya Fernanda Manfrin Arnez^a,
 Luciano Aparecido de Almeida-Júnior^a,  Marcio Santos de Carvalho^a,  Renato Petille^a,
 Alexandra Mussolino de Queiroz^a,  Léa Assed Bezerra da Silva^a

RESUMO

Introdução: A lesão periapical representa a resposta imunoinflamatória devido ao aumento do número e progressão de micro-organismos advindos dos canais radiculares contaminados em direção aos tecidos apicais e periapicais, resultando em reabsorção óssea. O objetivo desta revisão será abordar a importância das metaloproteínas da matriz no desenvolvimento das lesões periapicais e sua modulação durante a fase de reparação tecidual depois de instituído o tratamento endodôntico. **Revisão da literatura:** A patogênese da lesão periapical envolve a degradação progressiva de diversos componentes da matriz extracelular. Dentre as proteases responsáveis pela degradação destes componentes estão as metaloproteínas da matriz (MMPs). Estas proteases são expressas em resposta a estímulos específicos pelas células residentes do tecido conjuntivo durante o processo de remodelação tecidual e por células inflamatórias que invadem os tecidos durante eventos inflamatórios. As MMPs foram descritas em lesões periapicais experimentais e em humanos e existem evidências de que estas enzimas apresentam padrões de expressões diferentes em granulomas e cistos periapicais. A terapia endodôntica é importante para a redução da inflamação periapical assim como da síntese das MMPs, principalmente quando utilizado um curativo de demora à base de hidróxido de cálcio. **Conclusão:** As lesões periapicais apresentam alta expressão de metaloproteínas da matriz e o tratamento endodôntico em dentes com lesão periapical resulta em menor expressão de MMPs quando comparado às lesões periapicais não tratadas.

Palavras-chaves: Endodontia. Peptídeo hidrolases. Matriz extracelular. Periodontite periapical. Cisto radicular. Granuloma periapical.

ABSTRACT

Introduction: Apical periodontitis represents a local immune response directed against the progression of microorganisms from the dental pulp to the apical foramen and periapical tissues, which results in bone and dental resorption. The aim of this review is to describe the expression of this group of proteases in apical periodontitis and its modulation during the periapical healing phase following root canal treatment.

Literature review: The pathogenesis of apical periodontitis involves degradation of several extracellular matrix components. Matrix metalloproteinases (MMPs) are expressed in response to specific stimuli by resident cells of connective tissue during tissue remodeling and by inflammatory cells that arrive into the surrounding tissues during inflammatory events. MMPs have been reported in apical periodontitis, either experimentally induced or obtained from humans and there is evidence that these enzymes show different expression patterns in granulomas and periapical cysts. Root canal therapy is important for the reduction of periapical inflammation as well as the synthesis of MMPs, especially when using a calcium hydroxide-based dressing. **Conclusion:** Apical periodontitis show high expression of matrix metalloproteinases and root canal treatment results in less expression of MMPs when compared to untreated apical periodontitis.

Keywords: Endodontics. Peptide hydrolases. Extracellular matrix. Periapical periodontitis. Radicular cyst. Periapical granuloma.

^a Departamento de Clínica Infantil, Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

Autor de correspondência: Marcio Santos de Carvalho - E-mail: marsantcar@gmail.com

Data de envio: 01/04/2020 | **Data de aceite:** 25/06/2020

INTRODUÇÃO

A lesão periapical representa a resposta imunoinflamatória localizada devido ao aumento do número e progressão de micro-organismos advindos dos canais radiculares contaminados em direção aos tecidos apicais e periapicais resultando em reabsorção óssea e dentária. A reação inflamatória periapical é composta por um infiltrado inflamatório misto, caracterizado pela presença de neutrófilos, linfócitos T e B, plasmócitos e macrófagos, com maior prevalência de cada tipo celular dependendo do estágio da doença^{1,2}.

A importância dos micro-organismos no desenvolvimento da lesão periapical é amplamente conhecida, após estudo clássico que demonstrou que a exposição pulpar em ratos *germ-free* não levou à formação de lesão periapical, enquanto em animais convencionais houve desenvolvimento da lesão 15 dias após contaminação do tecido pulpar³. Em humanos, nos dentes com lesão periapical visível radiograficamente, as bactérias estão amplamente distribuídas no sistema de canais radiculares e nas lacunas de reabsorção do cimento, seja na forma isolada ou formando extensos biofilmes microbianos⁴.

No exame histopatológico a lesão periapical pode ser classificada em cistos radiculares e granulomas periapicais¹. O cisto radicular é o mais comum dentre os cistos odontogênicos, é caracterizado pela presença de um infiltrado inflamatório envolvido em uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso revestida por um epitélio com um lúmen contendo líquido e restos celulares. Os granulomas periapicais por outro lado, são constituídos por um infiltrado inflamatório ao redor do ápice de um dente sem vitalidade pulpar e consistem de um tecido granulomatoso, circundado por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso⁵.

A presença de micro-organismos, particularmente os anaeróbios gram-negativos, no sistema de canais radiculares e nas lacunas de reabsorção do cimento, pós-tratamento de canais radiculares, é considerada uma das principais causas de persistência da lesão periapical e, portanto, do insucesso do tratamento endodôntico^{6,7}. Ainda, em modelos experimentais de doença periodontal ou de lesão periapical, a presença de bactérias estimula a resposta inflamatória local e a produção intensa de proteases que degradam o meio extracelular e facilitam o processo de reabsorção óssea^{7,8}.

Dentre as proteases responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular estão as metaloproteinases da matriz (MMPs). Estas proteinases são expressas em resposta a estímulos específicos pelas células residentes do tecido conjuntivo durante o processo de remodelação tecidual, bem como por células inflamatórias que invadem os tecidos durante eventos inflamatórios^{9,10}.

As metaloproteinases da matriz são compostas por 25 proteínas incluindo: collagenases (MMP-1, -8 e -13), gelatinases (MMP-2 e -9), estromelisinases (MMP-3, -7 e -10), matrilisinas (MMP-7 e -26), MMPs tipo membrana (MMP-14, -15, -16, -17 e -24) e outras MMPs, caracterizadas de acordo com substrato⁷. Durante a destruição tecidual na doença periodontal, as metaloproteinases da matriz são consideradas mediadores importantes para a degradação do colágeno e, portanto, da perda de inserção do elemento dental^{9,11}.

Durante a reabsorção óssea, a metaloproteinase da matriz-1 (MMP-1) desempenha um importante papel na desorganização do tecido osteóide que recobre os tecidos mineralizados, possibilitando a reabsorção óssea^{11,12}. As metaloproteinases da matriz têm sido descritas em lesões periapicais de humanos¹³⁻¹⁵ e evidências indicam que a presença de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) podem resultar em lesões periapicais fenotipicamente distintas¹⁶. Ainda, o reconhecimento e caracterização da expressão de metaloproteinases da matriz em lesões em humanos é importante no sentido de esclarecer se a lesão periapical experimentalmente induzida em modelos animais representa a resposta inflamatória periapical em nível translacional. Dessa maneira, o objetivo desta revisão será abordar a importância das

metaloproteinasas da matriz no desenvolvimento das lesões periapicais e sua modulação durante a fase de reparação tecidual depois de instituído o tratamento endodôntico.

REVISÃO DA LITERATURA

foi realizada uma revisão de estudos disponíveis na literatura por meio da busca bibliográfica nas bases de dados eletrônicos PUBMED/MEDLINE, LILACS, Science Direct e Scielo (Scientific Electronic Library), no período de 1965 à 2020. Para a pesquisa foram utilizados os seguintes descritores: “Lesão Periapical”, “Metaloproteinase da Matriz”, “Periodontite Apical”, “Granuloma Periapical” e “Cisto Radicular”. Como critérios de inclusão, foram adotados os artigos escritos em inglês, espanhol e português; aqueles que se enquadravam no enfoque do trabalho e os mais relevantes em termos de delineamento das informações desejadas. A amostra foi constituída por 120 trabalhos, dos quais, após leitura criteriosa do resumo, 42 trabalhos foram incluídos na revisão de literatura.

Durante o desenvolvimento da lesão periapical os diversos componentes da matriz extracelular são progressivamente degradados, principalmente devido à contaminação microbiana do sistema de canais radiculares². Dentre estes componentes estão o colágeno, a fibronectina, a laminina e as proteoglicanas de baixo peso molecular¹⁷. A marcante desorganização das fibras colágenas na lesão periapical pode ser potencialmente causada por metaloproteinasas da matriz, enzimas importantes tanto para a remodelação como para a destruição tecidual. A presença de microrganismos no sistema de canais radiculares está associada à presença de severa desorganização tecidual e à maior expressão de metaloproteinasas da matriz na região periapical^{7,18}.

As metaloproteinasas da matriz participam dos estágios iniciais da desorganização do tecido pulpar em eventos inflamatórios não controlados, como no caso de uma pulpíte irreversível¹⁹. Com a progressão da necrose tecidual para a região apical, concomitantemente à contaminação dos canais radiculares, existe um recrutamento de células inflamatórias para os tecidos periapicais e reabsorção do tecido ósseo na região periapical¹⁸.

As metaloproteinasas da matriz estão envolvidas na lesão periapical de humanos e importância dessas proteases na patogênese da lesão periapical, principalmente para diferenciar cistos e granulomas periapicais de humanos foi demonstrada por meio da avaliação da expressão e atividade de metaloproteinasas da matriz utilizando *microarrays* de DNA, zimografia *in situ* e imunohistoquímica^{13,20}. As metaloproteinasas da matriz foram imunomarcadas em tecidos periapicais de humanos previamente e foi proposto que as MMP-1, -8, -9 e -13 estão envolvidas na expansão das lesões periapicais^{14,21}. Por meio de zimografia *in situ*, foi demonstrada a presença e alta densidade de metaloproteinasas da matriz ativas, principalmente na área com maior concentração de células inflamatórias nos granulomas periapicais¹³.

Durante a formação da lesão periapical experimental em ratos existe alta expressão de MMP-2 e -9 até por volta de 21 dias pós-contaminação dos canais radiculares, período este caracterizado por uma alta densidade de polimorfonucleares neutrófilos nos tecidos. Com o passar do tempo e cronicidade do processo, por volta de 30 dias, há maior prevalência de células mononucleadas e proliferação de células epiteliais na lesão periapical, com menor expressão de metaloproteinasas da matriz, sugerindo um possível mecanismo para as metaloproteinasas da matriz na transformação de granuloma para cisto periapical. Em estágios avançados da progressão da lesão periapical, padrão similar de redução tempo-dependente da expressão de MMP-12 foi observado^{8,22}. As metaloproteinasas da matriz também representam um mecanismo por meio do qual as lesões periapicais são exacerbadas em ratas

ovariectomizadas, concomitantemente à maior expressão de marcadores da osteoclastogênese e citocinas pró-inflamatórias¹⁰.

Estudos prévios demonstraram que a expressão de MMP-1 em cistos periapicais de humanos está restrita ao tecido epitelial circundando a lesão, macrófagos subepiteliais, fibroblastos e células endoteliais, enquanto durante o desenvolvimento da lesão periapical de ratos, observou-se a expressão de MMP-1 em regiões do tecido ósseo que estão em processo de reabsorção ativa^{23,24}. Por outro lado, foi relatado que a expressão de MMP-9 e -13 foi mais intensa na zona de células inflamatórias na lesão, indicando que diferentes metaloproteinases da matriz são produzidas e secretadas em sítios distintos, por células que compõe a lesão periapical^{13,20,25}. Estes resultados sugerem que cada metaloproteinase da matriz desempenha um papel específico na patogênese da lesão periapical. Estudos demonstraram funções divergentes para as metaloproteinases da matriz durante o desenvolvimento e progressão das lesões periapicais, estimulando a expansão da lesão intraóssea ou inibindo sua progressão²⁶⁻²⁸. Existem evidências de que a síntese de MMP-9 pelas células presentes no microambiente periapical seja regulada via receptor de reconhecimento de padrão microbiano toll-2 (TLR2) e da proteína adaptadora MyD88 quando ativados por micro-organismos advindos da cavidade bucal²⁷. Estes dados e os resultados do presente trabalho mostram que é importante caracterizar o perfil de metaloproteinases da matriz no desenvolvimento da lesão periapical previamente à utilização terapêutica de pan-inibidores, que inibem inespecificamente metaloproteinases com funções distintas^{29,30}.

A ausência de desorganização tecidual ou a presença de desorganização leve podem ser consideradas sucesso do tratamento endodôntico, levando-se em consideração a duração do período de acompanhamento. Esses desfechos foram encontrados nos dentes com vitalidade pulpar submetido ao tratamento endodôntico ou nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora. Nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora foi evidenciado menor porcentagem de raízes contaminadas pós-tratamento endodôntico, possivelmente devido à atividade antimicrobiana atribuída ao hidróxido de cálcio^{6,31}. Em dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico utilizando o hidróxido de cálcio como curativo de demora, foi observado um menor índice de atividade inflamatória acompanhando por um aumento do número de fibroblastos na região periapical. Nas células presentes na região periapical havia menor expressão de MMP-2, -8 e -9 do que nos dentes com lesão periapical sem tratamento ou naqueles submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única⁷. Por outro lado, nos dentes com lesão periapical submetidos ao tratamento endodôntico em sessão única, havia persistência de bactérias pós-obturações dos canais radiculares e desorganização do tecido conjuntivo, indicando um reduzido reparo periapical. A persistência de microrganismos no sistema de canais radiculares é considerada um dos responsáveis pela manutenção de um infiltrado inflamatório crônico periapical^{6,32} e presença de metaloproteinases da matriz^{7,18} pós-tratamento de canais radiculares.

In vitro, células da linhagem osteoblástica MG63 estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) extraído de *Prevotella nigrescens* expressaram grande quantidade de RNAm para MMP-1. Quando o LPS foi misturado ao hidróxido de cálcio, houve menor expressão de RNAm para MMP-1 com maior expressão do inibidor tecidual de metaloproteinases da matriz-1 (TIMP-1)³³. Entretanto esses efeitos não podem ser diretamente atribuídos ao hidróxido de cálcio, uma vez que é amplamente conhecido que o hidróxido de cálcio é capaz de hidrolisar o LPS bacteriano *in vitro* e, portanto, inibir seus efeitos tóxicos *in vivo*^{34,35}. Dessa maneira, a menor expressão de RNAm para MMP-1 poderia ser um efeito indireto do pré-tratamento do LPS com hidróxido de cálcio e, portanto, de sua inativação. Por outro lado, *in vivo*, o efeito inibitório do hidróxido de cálcio na síntese de MMP-9 não foi confirmado em um estudo clínico randomizado em humanos³⁶.

A inabilidade para identificar a natureza da lesão periapical torna o prognóstico imprevisível, uma vez que cistos geralmente não reparam após tratamento endodôntico convencional e requerem procedimentos cirúrgicos adicionais³⁷. Com relação às MMPs, padrões distintos de imunomarcagem foram observados em cistos e granulomas em estudos prévios. A camada de células epiteliais nos cistos estava positivamente corada para MMP-2, -9 e -13, embora tenha exibido baixa atividade enzimática que pode ser devido à reduzida matriz extracelular nos tecidos epiteliais³⁸. Por outro lado, no tecido conjuntivo de ambas as lesões, onde as células inflamatórias estão localizadas, foi detectada atividade enzimática de metaloproteinases da matriz. No estroma da lesão, a expressão de MMP-2 era difusa pela matriz extracelular e as células exibiram fraca marcação citoplasmática. MMP-9 e -13 estavam localizadas e mais evidentes na zona de células inflamatórias, com forte marcação intracelular. De modo singular, os granulomas periapicais apresentaram alta expressão de MMP-13 e um padrão de expressão de MMP-9 nas células polimorfonucleares, diferentemente dos cistos. Por outro lado, foi demonstrado também que a expressão aumentada de MMP-9 estava relacionada a expansão de cistos radiculares¹⁴, o que reduz a aceitabilidade desta enzima como um marcador de especificidade de granulomas periapicais. Não obstante, independentemente destes achados, as metaloproteinases da matriz estão diretamente relacionadas à expansão das lesões periapicais.

A simultânea e mais evidente expressão de MMP-9 e -13 em granulomas sugere um mecanismo de regulação coordenado destas proteases na dinâmica da lesão periapical. A interação entre MMP-9 e -13 se devem ao fato de que a MMP-13 é capaz de ativar a MMP-9, o que poderia explicar a atividade enzimática mais intensa observada em granulomas periapicais³⁹. A expressão de MMP-9 em polimorfonucleares representa um achado interessante, uma vez que essas células apresentam um mecanismo distinto de regulação de metaloproteinases da matriz. A síntese de MMP-9 está completa quanto os polimorfonucleares fazem a diapedese e a regulação dessa enzima é mediada pela liberação de grânulos citoplasmáticos e não por eventos transcripcionais^{25,40}. Além disso, em geral, a atividade das metaloproteinases da matriz é regulada por mecanismos pós-transcrição via clivagem do pró-peptídeo ou por inibidores teciduais de metaloproteinases da matriz e, dessa maneira, a atividade de qualquer metaloproteinase da matriz não necessariamente é o reflexo da expressão gênica⁴¹.

Por meio de *microarrays* de cDNA específico para detectar RNAm para moléculas componentes da matriz extracelular, foi demonstrado que algumas metaloproteinases da matriz são mais expressas em cistos e granulomas periapicais de humanos do que no ligamento periodontal sadio. Além disso, maior atividade gelatinolítica foi detectada em granulomas periapicais, especificamente na área com maior concentração de células inflamatórias e, por meio de imunomarcagem, foi confirmada a presença de MMP-9 e -13 no processo. A literatura tem demonstrado que pacientes com lesão periapical visível radiograficamente apresentaram expressão de MMP-2 e MMP-9 mais alta do que indivíduos-controle sadios, por meio de análise do fluido crevicular, porém a identidade da lesão não foi caracterizada microscopicamente. Uma vez que no presente estudo foi demonstrada expressão diferencial de MMP-9 e -13 em cistos e granulomas periapicais, estas moléculas poderiam ser investigadas como potenciais marcadores moleculares do *status* da lesão periapical e exploradas mais profundamente *in vivo* por meio de análise do fluido crevicular com o objetivo de tentar diferenciar clinicamente cistos e granulomas periapicais⁴².

DISCUSSÃO

O aumento de micro-organismos no interior do canal radicular possui relação com o desenvolvimento de lesão periapical^{2,3}. Micro-organismos anaeróbios Gram-negativos,

no sistema de canais radiculares e nas lacunas de reabsorção do cimento, pós-tratamento endodôntico é considerado como principal causa do insucesso do tratamento^{6,18}.

As metaloproteinases da matriz são consideradas principais mediadores para degradação de colágeno e perda da inserção óssea^{12,21}. Desempenhando um importante papel na desestruturação do tecido osteóide^{12,23}. A ausência ou presença leve de desorganização do tecido favorece o sucesso do tratamento endodôntico, resultados encontrados em dentes com vitalidade pulpar após tratamento endodôntico e com lesão periapical que utilizaram curativo de demora com hidróxido de cálcio^{6,7,31,33}.

Por outro lado, dentes tratados em única sessão, obtiveram a presença de microorganismos pós-obturação e desestruturação do tecido conjuntivo, sendo ineficaz para o reparo periapical^{6,32}. Em tecidos periapicais humanos realizaram a imunomarcação de metaloproteinases da matriz como MMP-1, -8, -9 e -13, estas são envolvidas no aumento de lesões periapicais²¹.

Devido pesquisas demonstrarem a expressão diferencial de MMP-9 e -13 em cistos e granulomas periapicais, estas moléculas poderiam ser investigadas como potenciais marcadores moleculares da lesão periapical, e averiguar *in vivo* por meio de análise do fluido crevicular a diferença clínica entre cistos e granulomas periapicais⁴¹. Dessa maneira, a identificação de componentes moleculares da matriz extracelular pode ser a base para a determinação de biomarcadores da natureza da lesão periapical e futuramente possibilitar o diagnóstico de cistos e granulomas previamente à realização do tratamento endodôntico. Possíveis candidatos a biomarcadores incluem as metaloproteinases da matriz, proteases responsáveis pela degradação do meio extracelular.

CONCLUSÃO

As metaloproteinases da matriz são enzimas importantes nos processos biológicos, desde o desenvolvimento e remodelação até a destruição tecidual. As lesões periapicais apresentam alta expressão de metaloproteinases da matriz e quando os dentes com lesão são submetidos ao tratamento endodôntico utilizando hidróxido de cálcio como curativo de demora existe menor expressão de MMPs quando comparado às lesões periapicais não tratadas ou tratadas em sessão única. Além disso, estas enzimas apresentam padrões de expressões distintos em granulomas e cistos periapicais, o que abre perspectiva para identificação futura de biomarcadores.

REFERÊNCIAS

1. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 2011;3:5304.
2. Paula-Silva FWG, Ribeiro-Santos FR, Petean IBF, Arnez MFM, Almeida-Junior LA, Carvalho FK, et al. Root canal contamination or exposure to lipopolysaccharide differentially modulate prostaglandin E2 and leukotriene B4 signaling in apical periodontitis. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20190699.
3. 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(3):340-9.
4. Rocha CT, Rossi MA, Leonardo MR, Rocha LB, Nelson-Filho P, Silva LA. Biofilm on the apical region of roots in primary teeth with vital and necrotic pulps with or without radiographically evident apical pathosis. *Int Endod J.* 2008;41(8):664-9.
5. Neville BW. Doença pulpar e periapical. In: Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC, editores. *Patologia oral e maxilofacial.* Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p. 252-3.
6. Leonardo MR, Almeida WA, Ito IY, Silva LAB. Radiographic and microbiologic evaluation of posttreatment apical and periapical repair of root canals of dogs' teeth with experimentally induced chronic lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994;78(2):232-8.
7. Paula-Silva FW, da Silva LA, Kapila YL. Matrix metalloproteinase expression in teeth with apical periodontitis is differentially modulated by the modality of root canal treatment. *J Endod.* 2010;36(2):231-7.
8. Corotti MV, Zambuzzi WF, Paiva KB, Menezes R, Pinto LC, Lara VS, et al. Immunolocalization of matrix metalloproteinases-2 and -9 during apical periodontitis development. *Arch Oral Biol.* 2009;54(8):764-71.
9. Araújo RVS, Silva FO, Melo-Júnior MR, Porto ALF. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. *R Ci md biol.* 2011;10(1):82-8.
10. Romualdo PC, Lucisano MP, Paula-Silva FWG, Leoni GB, Sousa-Neto MD, Silva RAB, et al. Ovariectomy exacerbates apical periodontitis in rats with an increase in expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases. *J Endod.* 2018;44(5):780-5.
11. Rossa CJr, 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(7):478-88.
12. Araújo AA, Morais HB, Medeiros CACX, Brito GAC, Guedes PMM, Hiyari S, et al. Gliclazide reduced oxidative stress, inflammation, and bone loss in an experimental periodontal disease model. *J Appl Oral Sci.* 2019;27:e20180211.
13. Paula-Silva FW, D'Silva NJ, da Silva LA, Kapila YL. High matrix metalloproteinase activity is a hallmark of periapical granulomas. *J Endod.* 2009;35(9):1234-42.
14. D'addazio G, Artese L, Piccirilli M, Perfetti G. Role of matrix metalloproteinases in radicular cysts and periapical granulomas. *Minerva Stomatol.* 2014 Nov-Dec;63(11-12):411-20.
15. Pereira Faustino IS, Azevedo RS, Takahama A Jr. Metalloproteinases 2 and 9 immunoexpression in periapical lesions from primary endodontic infection: possible relationship with the histopathological diagnosis and the presence of pain. *J Endod.* 2016 Apr;42(4):547-51.
16. Torres AFC, Antunes LS, Oliveira NF, Küchler EC, Gomes CC, Antunes LAA. Genetic polymorphism and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periapical lesions: systematic review. *J Endod.* 2020 Jan;46(1):3-11.e1.
17. Delzangles B, Boy-Lefevre ML, Forest N. Glycoproteins expression in apical pathologic tissues: clinical incidences. *J Endod.* 1997;23(9):565-8.
18. Takahama A Jr, Rôças IN, Faustino ISP, Alves FRF, Azevedo RS, Gomes CC, et al. Association between bacteria occurring in the apical canal system and expression of bone-resorbing mediators and matrix metalloproteinases in apical periodontitis. *Int Endod J.* 2018;51(7):738-46.
19. Tsai CH, Chen YJ, Huang FM, Su YF, Chang YC. The upregulation of matrix metalloproteinase-9 in inflamed human dental pulps. *J Endod.* 2005;31(12):860-2.
20. Álvares PR, Arruda JAA, Silva LPD, Nascimento GJFD, Silveira MFD, Sobral APV. Immunohistochemical expression of TGF-β1 and MMP-9 in periapical lesions. *Braz Oral Res.* 2017 Jul 3;31:e51.
21. Carneiro E, Menezes R, Garlet GP, Garcia RB, Bramante CM, et al. Expression analysis of matrix metalloproteinase-9 in epithelialized and nonepithelialized apical periodontitis lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2009;107(1):127-32.
22. Morimoto T, Yamasaki M, Nakata K, Tsuji M, Nakamura H. The expression of macrophage and neutrophil elastases in rat periradicular lesions. *J Endod.* 2008;34(9):1072-6.
23. Hong CY, Lin SK, Kok SH, Cheng SJ, Lee MS, Wang TM, et al. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(3):162-9.

24. Lin SK, Chiang CP, Hong CY, Lin CP, Lan WH, Hsieh CC, et al. Immunolocalization of interstitial collagenase (MMP-1) and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) in radicular cysts. *J Oral Pathol Med*. 1997;26(10):458-63.
25. Andrade AL, Santos EM, Carmo AF, Freitas RA, Galvão HC. Analysis of tryptase-positive mast cells and immun-expression of MMP-9 and MMP-13 in periapical lesions. *Int Endod J*. 2017 May;50(5):446-54.
26. Metzger Z, Belkin D, Kariv N, Dotan M, Kfir A. Low-dose doxycycline inhibits bone resorption associated with apical periodontitis. *IntEndod J*. 2008;41(4):303-9.
27. Tjäderhane L, Hotakainen T, Kinnunen S, Ahonen M, Salo T. The effect of chemical inhibition of matrix metalloproteinases on the size of experimentally induced apical periodontitis. *IntEndod J*. 2007;40(6):282-9.
28. Wan C, Yuan G, Yang J, Sun Q, Zhang L, Zhang J, et al. MMP9 deficiency increased the size of experimentally induced apical periodontitis. *J Endod*. 2014;40(5):658-64.
29. Barreiros D, Nelson P Filho, Paula-Silva FWG, Oliveira KMH, Lucisano MP, De Rossi A, et al. MMP2 and MMP9 are associated with apical periodontitis progression and might be modulated by TLR2 and MyD88. *Braz Dent J*. 2018;29(1):43-7.
30. Verma RP, Hansch C. Matrix metalloproteinases (MMPs): chemical-biological functions and (Q)SARs. *Bioorg Med Chem*. 2007;15(6):2223-68.
31. Leonardo MR, Hernandez ME, Silva LA, Tanomaru-Filho M. Effect of a calcium hydroxide-based root canal dressing on periapical repair in dogs: a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006;102(5):680-5.
32. Fabricius L, Dahlén G, Sundqvist G, Happonen RP, Möller AJ. Influence of residual bacteria on periapical tissue healing after chemomechanical treatment and root filling of experimentally infected monkey teeth. *Eur J Oral Sci*. 2006;114(4):278-85.
33. Yang WK, Kim MR, Lee Y, Son HH, Lee W. Effect of calcium hydroxide-treated *Prevotella nigrescens* on the gene expression of matrix metalloproteinase and its inhibitor in MG63 cells. *J Endod*. 2006;32(12):1142-5.
34. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod*. 1993;19(2):76-8.
35. Silva LAB, da Silva RA, Branco LG, Navarro VP, Nelson-Filho P. Quantitative radiographic evaluation of periapical bone resorption in dog's teeth contaminated with bacterial endotoxin (LPS) associated or not with calcium hydroxide. *Braz Dent J*. 2008;19(4):296-300.
36. Özdemir MB, Karataş E, Albayrak M, Bayır Y. Effect of intracanal medicaments on matrix metalloproteinase-9 and vasoactive intestinal peptide secretion in periapical lesions of re-treated canals: a randomized controlled clinical study. *Clin Oral Investig*. 2019 Feb;23(2):921-8.
37. García CC, Sempere FV, Diago MP, Bowen EM. The post-endodontic periapical lesion: histologic and etiopathogenic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12(8):e585-90.
38. Fu X, Kassim SY, Parks WC, Heinecke JW. Hypochlorous acid oxygenates the cysteine switch domain of pro-matrilysin (MMP-7). A mechanism for matrix metalloproteinase activation and atherosclerotic plaque rupture by myeloperoxidase. *J BiolChem*. 2001;276(44):41279-87.
39. Leeman MF, Curran S, Murray GI. The structure, regulation, and function of human matrix metalloproteinase-13. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2002;37(3):149-66.
40. Chakraborti S, Mandal M, Das S, Mandal A, Chakraborti T. Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. *Mol Cell Biochem*. 2003;253(1-2):269-85.
41. Martinho FC, Teixeira FF, Cardoso FG, Ferreira NS, Nascimento GG, Carvalho CA, et al. Clinical investigation of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases, and matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase complexes and their networks in apical periodontitis. *J Endod*. 2016;42(7):1082-8.
42. Belmar MJ, Pabst C, Martínez B, Hernández M. Gelatinolytic activity in gingival crevicular fluid from teeth with periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(6):801-6.