

MAURÍCIO GONÇALVES DA COSTA SOUSA

AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E IMUNOMODULADORES:
NOVAS ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O PREPARO DO DENTE
PARA A REVASCULARIZAÇÃO PULPAR

BRASILIA, 2017

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAURÍCIO GONÇALVES DA COSTA SOUSA

AVALIAÇÃO DE PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E IMUNOMODULADORES:
NOVAS ESTRATÉGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA O PREPARO DO DENTE
PARA A REVASCULARIZAÇÃO PULPAR

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Orientadora: Profa. Dra. Taia Maria Berto Rezende

Co-Orientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

BRASÍLIA

2017

Dedico este trabalho à minha família, em especial à minha mãe Cida e meu irmão Fabricio, que persistiram em acreditar no poder da educação para transformar nossas vidas. Dedico também aos meus amigos, que me deram todo o apoio!!

AGRADECIMENTOS

À orientadora **Prof.^a Dr.^a Taia Maria Berto Rezende**, pela atenção, carinho, eficiência e pelo espelho que é pra mim.

Ao co-orientador **Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**, pela confiança e por toda a inspiração para melhorar o mundo com a nossa vontade de fazer ciência.

Aos membros da banca avaliadora, **Prof.^a Dr.^a Juliana Loot de Carvalho**, **Prof. Dr. Jacy Ribeiro de Carvalho Junior** e **Prof. Dr. Rinaldo Wellerson Pereira** pela disponibilidade para avaliar e contribuir para este trabalho.

À **Stella Maris de Freitas Lima**, pela contribuição em várias etapas deste trabalho, e por ser uma fonte de inspiração profissional para mim.

À **Ana Paula de Castro Cantuária**, por todo o auxílio envolvendo a parte de células e **Rayssa Porcino** pelo auxílio nas etapas envolvendo bactérias.

Aos colegas do biodonto, que sempre estiveram dispostos para me ajudar e acrescentar ao meu trabalho **Camila, Mirna, Elaine, Poliana, Ingrid, Jade, Tarsila, Tássio, Danilo, Mayara e Bianca** .

Ao **Jeeser Alves de Almeida**, por todas as contribuições na análise estatística;

À aluna de iniciação científica e amiga **Patricia Diniz Xavier**, por toda a dedicação, auxílio e parceria nos momentos mais difíceis.

Ao aluno de iniciação científica **Daniel Soares**, pela sua humildade e vontade de contribuir para este trabalho.

À técnica **Kênia Chaves**, por sempre me ajudar em tudo que podia;

À minha mãe, **Maria Aparecida Gonçalves da Costa**, que lutou profundamente para me dar uma boa educação.

Ao meu irmão e melhor amigo, **Fabricio Gonçalves da Costa Silva**, por me apoiar em todas as decisões.

Aos meus amigos da banda mais linda **Paulinha, Juliana, Lucas Henrique, Lucas Pessanha e Lorena**, por me apoiarem e me darem todo o carinho sempre.

Aos meus amigos de vida **Leonardo, Hian, Moisés, Katherine, Franciely, Luark, Liana, Adriana Hanai e Denize**, por todas as risadas, conselhos, desabafos e carinho.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** da Universidade de Brasília, pela oportunidade;

Ao **Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas** da Universidade Católica de Brasília, pelo acolhimento e estrutura;

À **CAPES, CNPq, FAPDF, UCB e UnB**, pelo auxílio financeiro;

Meus sinceros agradecimentos.

“ Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas transformam o mundo.”

(Paulo Freire)

RESUMO

Terapias regenerativas recentes como a revascularização pulpar vem ganhando espaço na endodontia em dentes permanentes imaturos. Porém o uso das medicações difundidas para técnica como a pasta dupla antibiótica (DAP) contendo metronidazol (MTZ) e ciprofloxacino (CIP) ou tripla antibiótica (TAP) contendo CIP, MTZ e minociclina pode causar resistência, citotoxicidade e manchamento dentinário. Em contrapartida, peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) podem apresentar atividade antimicrobiana e imunomodulatória, surgindo como uma opção para a revascularização pulpar. Desta forma, este estudo objetivou avaliar o potencial antimicrobiano e imunomodulador de peptídeos sintéticos (DJK-6, IDR-1018, IDR-1002 e LL-37), comparados à TAP e DAP em um modelo de infecção endodôntica *in vitro*. O estudo foi dividido em 3 etapas: (1) avaliação do potencial antimicrobiano dos fármacos de TAP e DAP (sozinhos ou em combinação) e dos PDHs contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (*S.a.*) e *Enterococcus faecalis* (*E.f.*) e o potencial sinérgico do CIP juntamente com IDR-1002; (2) comparação das concentrações encontradas neste estudo com as concentrações clínicas de TAP e DAP, através da viabilidade celular por MTT e produção de óxido nítrico (NO) pela reação de Griess, em linhagem de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929; (3) avaliação imunomodulatória, pela produção das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-12 e IL-10 e fator de necrose tumoral (TNF- α), por ELISA, além do NO em RAW 264.7 (RAW) e da IL-6 e NO em L929, com ou sem o recombinante de interferon gama (rIFN- γ) e antígenos mortos pelo calor (*heat killed* - *HK*)-*S.a.* ou *HK-E.f.* Na primeira etapa, o CIP se apresentou como o melhor antimicrobiano presente nas pastas e o IDR-1002, como o melhor PDH. Ademais, a combinação entre CIP e IDR-1002 apresentou ação sinérgica. A viabilidade celular não foi reduzida por nenhum dos grupos e TAP estimulou a produção de NO em RAW. Finalmente o PDH LL-37 reduziu significativamente a viabilidade de células L929 e TAP, a viabilidade de RAW. Na ausência de estímulos antigênicos, TAP e DAP apresentaram um perfil pró-inflamatório na ausência dos estímulos antigênicos, aumentando na produção de IL-1 α , TNF- α e IL-6 em células RAW e IL-6 em L929. Na adição dos estímulos antigênicos e rIFN- γ , as pastas apresentaram um perfil pró e anti-inflamatório: TAP reduziu a produção de IL-1 α , IL-12 e IL-6 em RAW e aumentou TNF- α e NO, e a DAP reduziu a produção de IL-1 α , IL-10 e IL-6 em RAW e aumentou IL-12. CIP, LL-37, IDR-1002 e a combinação de CIP com IDR-1002 apresentaram um perfil anti-inflamatório, reduzindo principalmente IL-6 e IL-12 na presença dos estímulos antigênicos e rIFN- γ . Em suma, a combinação sinérgica de CIP com IDR-1002 foi eficaz contra ambas bactérias e apresentou um papel anti-inflamatório neste modelo de infecção *in vitro*, podendo surgir como uma opção promissora para aplicações biotecnológicas envolvendo a revascularização pulpar.

Palavras-chave: Revascularização pulpar, TAP, DAP, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, peptídeos de defesa do hospedeiro.

ABSTRACT

Recent regenerative therapies such as pulpal revascularization have been diffused in endodontics in immature permanent teeth. However, the use of medications such as double antibiotic paste (DAP) containing metronidazole (MTZ) and ciprofloxacin (CIP) or triple antibiotic paste (TAP) containing CIP, MTZ and minocycline may cause resistance, cytotoxicity and dentin discoloration. On the other hand, host defense peptides (HDPs) have antimicrobial and immunomodulatory effects, emerging as an option for pulpal revascularization. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial and immunomodulatory potential of synthetic peptides (DJK-6, IDR-1018, IDR-1002 and LL-37) compared to TAP and DAP, in an *in vitro* endodontic infection model. For this, the study was divided in three stages: (1) antimicrobial potential of TAP and DAP drugs (alone or in combination) and HDPs against the bacteria *Staphylococcus aureus* (*S.a.*) and *Enterococcus faecalis* (*E.f.*) and the synergistic potential of CIP and IDR-1002; (2) comparison of the findings of this study with TAP and DAP clinical concentrations, through cell viability by MTT and nitric oxide (NO) production by the Griess reaction, in RAW 264.7 macrophages and L929 fibroblasts; (3) immunomodulatory stage, by the evaluation of cytokines by ELISA: IL-1 α , IL-6, IL-12, IL-10 and tumor necrosis factor (TNF- α), as well as NO in RAW 264.7 (RAW) and IL-6 and NO, in L929 with or without the recombinant interferon gamma (rIFN- γ) and heat killed antigens HK-*S.a.* or HK-*E.f.* In the first stage, CIP presented the best antimicrobial activity comparing to TAP and DAP containing antibiotics and IDR-1002, the best HDP. In addition, the combination between CIP and IDR-1002 was synergistic. The viability was not reduced by any groups and TAP stimulated NO production in RAW cells. Finally, LL-37 significantly reduced the viability of L929 and TAP, the RAW viability. Without any antigenic stimuli, TAP and DAP presented a pro-inflammatory profile up regulating IL-1 α , TNF- α and IL-6 in RAW and IL-6, in L929. However, the addition of antigenic stimuli and rIFN- γ , TAP and DAP presented pro and anti-inflammatory profile reducing IL-1 α , IL-12 and IL-6 in RAW and increasing TNF- α and NO, and reducing IL-1 α , IL-10 and IL-6 in RAW and increasing IL-12. CIP, LL-37, IDR-1002 and the combination of CIP with IDR-1002 showed an anti-inflammatory profile, mainly reducing IL-6 and IL-12 with antigenic and rIFN- γ stimuli. In conclusion, the synergistic combination of CIP with IDR-1002 was effective against both bacteria and presented an anti-inflammatory role in this *in vitro* infection model may emerge as a promising option for biotechnological applications involving pulp revascularization.

Keywords: pulp revascularization, TAP, DAP, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, host defense peptides.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática do procedimento das etapas clínicas da terapia para revascularização pulpar.....46
- Figura 2 - Representação gráfica da distribuição dos trabalhos relacionados à pasta tripla antibiótica na base de dados *Pubmed* (acesso em: 28/12/2016, 20:32), utilizando as seguintes palavras chave: *triple antibiotic paste*, *duple antibiotic paste*, *triple antibiotic past and endodontics*, *triple antibiotic paste in root canal*, *duple antibiotic past and endodontics*, *triple past and endodontics*. Foram encontrados um total de 119 trabalhos, sendo eles: 42 clínicos, 32 *ex vivo*, 24 *in vitro*, 10 *in vivo* e 5 revisões de literatura.....55
- Figura 3 - Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.....68
- Figura 4 - Etapas experimentais e grupos testados.....75
- Figura 5 - Viabilidade celular de RAW 264.7 das culturas na presença de diferentes estímulos: (A) DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão das absorbâncias (595nm), de 3 réplicas biológicas em triplicata. * representa a diferença estatística comparado aos grupos controle (RAW), após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$).....84

Figura 6 - Produção de NO em células RAW 264.7 na presença de diferentes estímulos: (A) DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão da produção de nitrito em μM , de 3 réplicas biológicas em triplicata. * representa diferença estatística comparada ao o grupo controle (RAW) (A e B); # representa diferença estatística comparada com DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) ou DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B); ● representa diferença estatística comparadas com TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A); e ■ representa diferença estatística comparadas com CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sem IDR-1002 (A), após teste *one-way* ANOVA com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).....86

Figura 7 - Viabilidade celular de L929 das culturas na presença de diferentes estímulos: (A) DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão das absorbâncias (595nm), de 3 réplicas biológicas em triplicata. # representa a diferença estatística comparada a DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$).....87

Figura 8 - Produção de NO em células L929 na presença de diferentes estímulos: (A) DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão da produção de nitrito em μM , de 3 réplicas biológicas em triplicata. ● representa diferença estatística comparadas ao grupo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) sem IDR-1002 (A); * representa diferença estatística comparada com o grupo controle (L929) (A e B); e # representa diferença estatística comparada com DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), após teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$).....89

Figura 9 - Viabilidade celular de células RAW 264.7. Os gráficos representam as culturas celulares estimuladas com diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* (A) com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão na absorbância de 595 nm, realizadas em 3 réplicas biológicas. As diferenças estatísticas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas com o grupo controle (A-C); Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹ (C); e \$ comparadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ (C). A microscopia óptica (20x) demonstra os aspectos morfológicos celulares (E-L) iniciais (dia 1) e finais (dia 3) de cultura de células RAW 264.7 estimuladas com e sem rIFN- γ , LPS, LPS e rIFN- γ , *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹, *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ , *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ e *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ92

Figura 10 - Produção de NO pelas células RAW 264.7. Os gráficos representam os valores da produção de nitrito na presença de diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* sem (A) ou com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* sem (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e erro padrão da produção de nitrito em μ M realizadas em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) foram representadas por * comparadas com o controle (RAW) (A, B e C); # comparadas com os grupos estimulados com LPS (B); Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹ (B e C); \$ comparadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ (B e D); ■ comparadas com 10^7 UFC.mL⁻¹ (B, C e D); e ● comparadas com 10^8 UFC.mL⁻¹ (A, B, C e D).....94

Figura 11 - Viabilidade celular de células L929. Os gráficos representam as culturas celulares estimuladas com diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* (A) com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão na absorbância de 595 nm, realizadas em 3 réplicas biológicas. As diferenças estatísticas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas com o grupo controle (A-C); Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹ (C); e \$ comparadas

com 10^6 UFC.mL⁻¹ (C). A microscopia óptica (20x) demonstra os aspectos morfológicos celulares (E-L) iniciais (dia 1) e finais (dia 3) de cultura de células L929 estimuladas com e sem rIFN- γ , LPS, LPS e rIFN- γ , *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹, *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ , *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ e *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ96

Figura 12 - Produção de NO pelas células RAW 264.7. Os gráficos representam os valores da produção de nitrito na presença de diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* sem (A) ou com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* sem (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e erro padrão da produção de nitrito em μ M realizadas em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) foram representadas por * comparadas com o controle; Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹; \$ comparadas com 10^6 UFC.mL⁻¹; ■ comparadas com 10^7 UFC.mL⁻¹; e ● comparadas com 10^8 UFC.mL⁻¹.....98

Figura 13 - Viabilidade celular de células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1μ g.mL⁻¹) e TAP (2μ g.mL⁻¹), CIP ($0,015 \mu$ g.mL⁻¹), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32μ g.mL⁻¹) e associação de CIP ($0,015 \mu$ g.mL⁻¹) + IDR-1002 (32μ g.mL⁻¹); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. Diferenças estatísticas realizadas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP (1μ g.mL⁻¹) (A, B e C); ● comparadas aos grupos TAP (2μ g.mL⁻¹) (A, B e C); ■ comparadas ao grupo CIP ($0,015 \mu$ g.mL⁻¹) (A, B e C); ○ comparadas com LL-37 (B e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).....100

Figura 14 - Viabilidade celular de células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. Diferenças estatísticas realizadas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por • comparadas ao grupo TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B).....101

Figura 15 - Produção da citocina IL-1 α por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); • comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ■ comparadas ao grupo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ○ comparadas com LL-37 (A e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).....103

Figura 16 - Produção da citocina IL-6 por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo

controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ● comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ■ comparadas ao grupo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ○ comparadas com LL-37 (A, B e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).....105

Figura 17 - Produção da citocina TNF- α por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A); ● comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ■ comparadas ao grupo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A); e Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B).....107

Figura 18 - Produção da citocina IL-12 por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B e C); ● comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ■ comparadas ao grupo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B e C); ○ comparadas com LL-37 (A, B e C); % comparadas com IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).....109

Figura 19 - Produção da citocina IL-10 por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (C); • comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e \square comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).....111

Figura 20 - Produção do mediador NO por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em μM da produção de nitrito de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); e • comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C).....113

Figura - 21 Viabilidade celular de L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 48h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções

de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por \circ em comparação com LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C)115

Figura 22 - Viabilidade celular de L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por \circ em comparação com LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C)116

Figura 23 - Produção da citocina IL-6 por células L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 48h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (L929) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); • comparadas aos grupos TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e \square comparadas a L929 (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (C).....118

Figura 24 - Produção do mediador NO por células L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em μM da produção de nitrito de triplicatas

técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (L929) (B e C); ○ comparadas com LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B); e Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (C); □ comparadas a L929 (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (C).....120

Figura 25 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo LL-37 (4490,8 Da), com pureza superior a 95%.....191

Figura 26 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1018 (1536 Da), com pureza superior a 95%.....191

Figura 27 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1002 (1652,1 Da), com pureza superior a 95%.....192

Figura 28 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo DJK-6 (1666,9 Da), com pureza superior a 95%.....192

Figura 29 - Curvas representativa de crescimento da bactéria *E. faecalis* de três réplicas biológicas para determinação de fase logarítmica realizada previamente pelo grupo. (A) representa a determinação do número de células totais a partir da relação D. O. versus tempo de incubação em horas. (B) representa a linha de tendência com equação e R^2 e a determinação do número de células viáveis a partir da relação D. O. versus UFC.mL^{-1} 193

Figura 30 - Curvas representativa de crescimento da bactéria *S. aureus* de três réplicas biológicas para determinação de fase logarítmica realizada previamente pelo grupo. (A) representa a determinação do número de células totais a partir da relação

D. O. versus tempo de incubação em horas. (B) representa a linha de tendência com equação e R^2 e a determinação do número de células viáveis a partir da relação D. O. versus UFC.mL⁻¹.....193

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 - Estudos relacionados à revascularização pulpar e o perfil de medicação intracanal utilizada.....51
- Tabela 2 - Sequência molecular dos peptídeos LL-37, IDR-1002, IDR-1018 e DJK-6.....80
- Tabela 3 - Representação dos valores de CIM e CBM dos peptídeos e dos antimicrobianos da DAP e TAP em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *S. aureus* e *E. faecalis*.....82
- Tabela 4 - Resumo da etapa 2 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle.....90
- Tabela 5 - Resumo da fase imunomodulatória da etapa 3. Os diferentes tempos experimentais para células RAW 264.7 (24 e 72h) e L929 (48 e 72 h), além das citocinas IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-12 IL-10 e o mediador NO, em RAW 264.7 e IL-6 e o mediador NO, em L929 são representados na horizontal. – representa células sem estímulos antigênicos, S representa os estímulos HK-S. aureus 10^6 UFC.mL $^{-1}$ e E representa os estímulos com HK-E. faecalis 10^6 UFC.mL $^{-1}$ também na horizontal. Os estímulos de DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$), IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) são representados na vertical. ↑ representa aumento, = representa indiferença estatística e ↓ representa diminuição.....121

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ATCC – *American type culture collection*
- BHE – bainha epithelial de Hertwig
- BMP – Pproteína morfogenética óssea
- Ca(OH)₂ – hidróxido de cálcio
- CBM – concentração bactericida mínima
- CGRP – peptídeo relacionado com o gene da calcitocina
- CIM – concentração inibitória mínima
- CIP - ciprofloxacino
- DAP – pasta dupla antibiótica
- DPI – dente permanente imaturo
- D. O. – densidade ótica
- DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*
- DMSO – dimetilsufóxido
- DSCs – células-tronco dentárias
- EGF - fator de crescimento epidérmico
- ELISA – *Enzyme-Liked Immunoabsorbent Assay*
- ERK – quinase regulada pela sinalização extracelular
- FBS – soro bovino fetal
- FGF – fator de crescimento de fibroblastos
- FPR – receptor de peptídeo formil
- HBD – beta defensina humana
- HK - *heat killed*
- IFN-γ – interferon gama
- IL – interleucina
- iNOS – óxido nítrico sintetase indutível
- LPS – lipopolissacarídeo
- LTA – ácido lipoteicóico
- MALDI-ToF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*
- MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno
- MCP – proteína quimiotática de monócitos
- MEC – matriz extra-celular

M-CSF – fator estimulador de colônias de macrófagos
MIP-2 – proteína inflamatória dos macrófagos
MMP – metaloproteinase
MNC – minociclina
MTA – agregado de trióxido mineral
MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
MTZ - metronidazol
NCCLS - *National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NF-κB – fator nuclear kappa B
NO – óxido nítrico
NPY – neuropeptídeo Y
NK – neuropeptídeo K
PBS – tampão fosfato salina
PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas
PDH – peptídeo de defesa do hospedeiro
PIGF – fator de crescimento da placenta
PDLSC – células – tronco do ligamento periodontal
PCL – policaprolactona
PCR – reação de polimerase em cadeia
PDS - polidiaxonona
PGA – ácido poliglicólico
PKC – proteína C quinase
PLA - ácido polilático
PRF – plasma rico em fibrina
PRP – plasma rico em plaquetas
RANKL - receptor do ligante nuclear kappa-B
ROS – espécies reativas de oxigênio
RT-HPLC - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
SCAP – células-tronco da papila apical
SHED – células-tronco de dentes exfoliados
SCR – sistema de canais radiculares
SP- substância P
TGF-β – fator de Crescimento e transformação beta
TLR – receptor do tipo *tool*

Treg – linfócito T regulador

TRP – receptor de canal transiente

VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

VIP – polipeptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	REVISÃO DE LITERATURA	29
2.1	ANATOMIA E FISIOLOGIA DE DENTES PERMANENTES IMATUROS (DPIs)	29
2.2	PATOLOGIAS PULPARES ENVOVENDO DENTES PERMANENTES IMATUROS	32
2.2.1	Citocinas e mediadores envolvidos com a destruição e reparo tecidual pulpar	36
2.3	TRATAMENTO ENDODÔNTICO EM DENTES PERMANENTES IMATUROS	41
2.3.1	Apicigênese e apicificação	41
2.3.2	Revascularização/regeneração pulpar	44
2.3.3	Medicações intracanaís usadas para a revascularização pulpar	49
2.3.3.1	Pasta tripla antibiótica	49
2.3.3.2	Antimicrobianos usadas na pasta tripla antibiótica	56
2.3.3.1.1	<i>Ciprofloxacino</i>	56
2.3.3.1.2	<i>Metronidazol</i>	57
2.3.3.1.3	<i>Minociclina</i>	58
2.4	PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO	59
2.4.1	DJK-6	62
2.4.2	Peptídeo regulador da defesa inata 1018 (IDR-1018)	63
2.4.3	Peptídeo regulador da imunidade inata 1002 (IDR-1002)	64
2.4.4	LL-37	64
3	OBJETIVOS	66
3.1	OBJETIVO GERAL	66
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	66
4	MÉTODOS	68
4.1	DELINIAMENTO EXPERIMENTAL	68
4.2	OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E MUNOMODULADORES (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 e LL-37)	69

4.3	ARMAZENAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E IMUNOMODULADORES (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 e LL-37).....	69
4.4	OBTENÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS DAS PASTAS UTILIZADAS EM REVASCULARIZAÇÃO PULPAR	70
4.5	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS, DAS PASTAS UTILIZADAS PARA REVASCULARIZAÇÃO PULPAR E DOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES NAS PASTAS ISOLADAMENTE	70
4.6	AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO SINÉRGICA DO PEPTÍDEO IDR-1002 E O ANTIMICROBIANO CIPROFLOXACINO	72
4.7	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E RESPOSTA IMUNE DE TAP, DAP, DO CIPROFLOXACINO, DO PEPTÍDEOS IDR-1002 E LL-37 E DA ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA DE IDR-1002 E CIPROFLOXACINO.....	73
4.7.1	Culturas celulares e grupos experimentais das etapas 2 e 3	73
4.7.2	Preparo e teste dos antígenos microbianos mortos pelo calor	76
4.7.3	I, de DAP e TAP e da associação sinérgica de IDR-1002 e ciprofloxacino	76
4.7.4	Avaliação da atividade imunomodulatória dos peptídeos, DAP, TAP e sinergismo (IDR-1002 e ciprofloxacino).....	77
4.7.4.1	Dosagem de citocinas por Enzyme-Liked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	77
4.7.4.2	Dosagem de óxido nítrico (NO)	78
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	79
5	RESULTADOS	80
5.1	ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 E LL-37) E DA TAP E DAP, ALÉM DO POTENCIAL SINÉRGICO DAS MELHORES AMOSTRAS	80
5.1.1	Avaliação da pureza dos peptídeos estudados e dos antimicrobianos de TAP e DAP	80
5.1.2	Avaliação da capacidade antimicrobiana dos peptídeos e dos antimicrobianos das pastas DAP e TAP juntos ou separados.	81
5.1.3	Avaliação da combinação sinérgica do peptídeo IDR-1002 e o antimicrobiano CIP	82
5.2	ETAPA 2: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE NITRITO NAS CONCENTRAÇÕES CLÍNICAS DA TAP E DAP, NAS CONCENTRAÇÕES	

ENCONTRADAS NA ANÁLISE ANTIMICROBIANA DA DAP, TAP E DA PROPOSTA SINÉRGICA (CIP + IDR-1002).....	83
5.2.1 Viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7	84
5.2.2 Produção de NO em macrófagos RAW 264.7	85
5.2.3 Viabilidade celular em fibroblastos L929	87
5.2.4 Produção de NO em fibroblastos L929	88
5.3 ETAPA 3: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CITOTÓXICA E IMUNOMODULATÓRIA EM LINHAGEM DE CÉLULAS RAW 264.7 E L929 DAS AMOSTRAS SELECIONADAS EM UM MODELO DE INFECÇÃO ENDODONTICA <i>IN VITRO</i>	90
5.3.1 Avaliação da viabilidade celular em RAW 264.7 estimulada com diferentes concentrações de <i>HK-S. aureus</i> e <i>HK-E. faecalis</i>	91
5.3.2 Avaliação da produção de NO em RAW 264.7 estimulada com diferentes concentrações de <i>HK-S. aureus</i> e <i>HK-E. faecalis</i>	93
5.3.3 Avaliação da viabilidade celular em L929 estimulada com diferentes concentrações de <i>HK-S. aureus</i> e <i>HK-E. faecalis</i>	95
5.3.4 Avaliação da produção de NO em L929 estimulada com diferentes concentrações de <i>HK-S. aureus</i> e <i>HK-E. faecalis</i>	97
5.3.5 Avaliação da capacidade imunomodulatória da TAP, DAP, CIP, LL-37, IDR-1002 e CIP + IDR-1002	98
5.3.5.1 Avaliação da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de TAP, DAP, CIP, LL-37, IDR-1002 e CIP + IDR-1002, em 24 e 48 h.....	99
5.3.5.2 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória IL-1 α em macrófagos RAW 264.7.....	102
5.3.5.3 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 em macrófagos RAW 264.7	104
5.3.5.4 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α em macrófagos RAW 264.7	106
5.3.5.5 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória perfil M1 (IL-12) em macrófagos RAW 264.7	108
5.3.5.6 Avaliação da produção da citocina anti-inflamatória perfil M2 (IL-10) em macrófagos RAW 264.7	110
5.3.5.7 Avaliação da produção do mediador NO por macrófagos RAW 264.7.....	112
5.3.5.8 Avaliação da viabilidade de fibroblastos L929 na presença de TAP, DAP, CIP, LL-37, IDR-1002 e CIP + IDR-1002, em 48 e 72 h.....	114

5.3.5.9	Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 em fibroblastos L929.....	117
5.3.5.10	Avaliação da produção do mediador NO em fibroblastos L929.....	119
6	DISCUSSÃO	122
7	CONCLUSÕES	141
8	REFERÊNCIAS	142
9	ANEXO A - ESPECTRO DE MASSA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E IMUNOMODULADORES	191
10	ANEXO B - CURVAS DE CRESCIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE FASE LOGARÍTMICA DE <i>E. FAECALIS</i> E <i>S. AUREUS</i>	193
11	ANEXO C - PUBLICAÇÕES.....	194

1 INTRODUÇÃO

Terapias regenerativas tem sido difundidas nos últimos anos na endodontia, especialmente em dentes permanentes imaturos (1). Tais elementos, apresentam paredes de dentina mais finas e ápice aberto, o que dificulta o tratamento químico-mecânico e obturação do canal radicular (2). Além disso, frente aos insucessos causados pelas terapias de apicificação e apicigênese, novas técnicas buscam a revascularização do tecido pulpar (3, 4).

A técnica para busca de revascularização pulpar consiste no acesso ao sistema de canais radiculares (SCR), irrigação e subsequente uso de uma medicação intracanal, visando a remoção do maior número de microrganismos (5). Sendo assim, um ambiente asséptico pode permitir a sobreinstrumentação e formação de um coágulo sanguíneo, que pode servir como um arcabouço para a construção de uma nova polpa (5). Todavia, a medicação padrão-ouro empregada para técnica, conhecida como pasta tripla antibiótica TAP (contendo metronidazol, ciprofloxacino e minociclina) pode ser citotóxica, causar resistência microbiana, além do escurecimento dentinário (6-8). Por conseguinte, a presença de microrganismos prevalentes no SCR radiculares como *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, podem desenconrajar a neoformação tecidual (9).

Diante os casos de insucesso com a TAP, peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) são relatados como biomoléculas com potencial antimicrobiano, imunomodulador e regenerativo, podendo emergir como novas medicações intracanaís para a endodontia (10). O peptídeo DJK-6 por exemplo, pode eliminar o biofilme de microrganismos resistentes (11). Por outro lado, os peptídeos reguladores da imunidade inata (IDR-1002 e IDR-1018) vêm sendo estudados como eficientes imunomoduladores (12). E a catelicidina LL-37 pode atuar sobre uma gama de microrganismos, modular a resposta imune inata e induzir o reparo tecidual (13). No entanto, apesar de diversas características benéficas relatadas com estas biomoléculas, até o momento, a aplicação de PDHs no contexto de revascularização pulpar não tem sido explorada.

Em vista disso, este trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano e imunomodulador de PDHs sintéticos (DJK-6, IDR-1018, IDR-1002 e LL-37) em um contexto de infecção endodôntica *in vitro*. A proposta foi criar novas estratégias biotecnológicas para os processos de revascularização/regeneração tecidual pulpar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ANATOMIA E FISIOLOGIA DE DENTES PERMANENTES IMATUROS (DPIS)

A polpa pode ser considerada um tecido conjuntivo frouxo, não mineralizado, altamente vascularizado e innervado, localizado no interior do dente, na câmara pulpar e canais radiculares, sendo circundado por estruturas rígidas, como a dentina (14). O tecido pulpar pode ser responsável por proporcionar diversas funções aos outros tecidos dentinários, tais como: resposta imunológica, funções sensoriais, nutrição e apresenta capacidade de formação e regeneração (15). Em adição, este pode ser composto por uma variedade de células, tais como fibroblastos, odontoblastos, células vasculares, mesenquimais indiferenciadas, células-tronco da papila apical, células inflamatórias, neurônios sensoriais e simpáticos e diversas outras células que podem ser essenciais para o fechamento do ápice dentário (16, 17).

O desenvolvimento dentário tem origem a partir do ectomesênquima, que durante diversas fases, dá origem à polpa, ao esmalte, à dentina e ao cimento (18). Durante a fase de campânula, o epitélio interno se une ao epitélio externo para a formação da raiz, e as células mesenquimais indiferenciadas contribuem para a construção do arca-bouço pulpar (19). Após a formação da dentina radicular, a bainha epitelial de Hertwig (BEH) que envolve a raiz, pode ser interrompida ou perfurada (20). O rompimento induz à formação de uma estrutura em forma de malha na BHE que permite que as células foliculares dentárias entrem em contato com a superfície dentinária da raiz recém-formada (20, 21). As células foliculares dentárias podem se diferenciar em cementoblastos e conseqüentemente em cimento (22). Ao mesmo tempo, fibras de colágeno secretadas por células foliculares dentárias podem ser incorporadas na nova matriz de cimento que se unem ao ligamento periodontal, durante o desenvolvimento dentário (23).

Posteriormente à diferenciação e alongamento da raiz, o dente permanente erupciona na cavidade oral, para estabelecer contatos oclusais, a começar pelos incisivos centrais superiores, por volta de 6 anos de idade. Porém, mesmo erupcionado, a formação completa da raiz com o fechamento do ápice dentário só

acontece depois de 3 a 4 anos (24). Desta forma, por serem dentes ainda em formação, se tornam impreteríveis os cuidados com o órgão dentário, uma vez que possuem paredes dentinárias mais finas e câmaras pulpares mais amplas (25).

Dentre os componentes celulares presentes na polpa, os fibroblastos estão em maior número (26). Os fibroblastos oferecem tanto um suporte estrutural, como de defesa e podem ser responsáveis por manter a matriz colagenosa e atrair células do sistema imunológico como macrófagos, tornando-os ativos para responder à invasão bacteriana (27). Os fibroblastos pulpares também atuam na identificação de antígenos, produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios, tais como interleucina IL-6, IL-8 e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (28-30). Ademais, outras células como os odontoblastos estão posicionados em uma camada única (31). Estas podem ser responsáveis pela síntese e mineralização da matriz extracelular (MEC) (32). A diferenciação de odontoblastos implica em diversos fatores, tais como a remoção do ciclo celular, polarização de células, criação de um processo celular, produção e liberação de colágeno tipo I e diversas proteínas não-colagenosas (33). Essas células pulpares estão em contato com a matriz extracelular, que se caracteriza como uma cadeia unida de macromoléculas segregadamente extracelular.

A cadeia formada pela MEC possui um papel fundamental na estrutura celular, regulação no desenvolvimento e diferenciação teciduais (34). As principais moléculas da MEC podem ser proteínas não-colagenosas (como por exemplo, tenascina, fibronectina, sialoproteína, osteocalcina e osteonectina) e proteoglicanos, englobando o sulfato de condroitina, ácido hialurônico, sulfato de fosfolípídeos e de heparina (35). A câmara pulpar se mostra altamente vascularizada, possuindo capilares, vênulas e arteríolas (36). Os vasos chegam à polpa por meio do forame apical e canais acessórios e podem ter ramificações na camada odontoblástica e na área rica em capilares, onde ocorrem as maiores trocas metabólicas (37). As células pulpares, assim como todas as células do organismo, necessitam do plasma sanguíneo e fluido intersticial, para manutenção e desempenho de suas funções vitais (38, 39).

Quanto à inervação do tecido pulpar, esta pode ser oriunda do nervo trigeminal e possui fibras eferentes simpáticas que regulam o fluxo sanguíneo (40). Tais fibras seguem o trajeto dos vasos sanguíneos, penetrando pelo forame apical e se distribuindo por toda a polpa (41). Dois importantes tipos de fibras mielínicas podem estar presentes neste tecido incluindo as do tipo A (delta e beta) e C (42, 43). A maioria

das fibras do tipo A se localizam na periferia da polpa e estão concentradas no corno pulpar. Já as fibras amielínicas C, se encontram no interior da polpa e se prolongam até a região acelular que fica abaixo da camada odontoblástica (44).

Ademais, outras células presentes no tecido pulpar como as células-tronco pulpares (DSCs) e células-tronco da papila apical (SCAPs) podem originar novas células, tais como os adipócitos, células neurais, condrócitos e osteoblastos, sendo importantes no processo de regeneração pulpar, formação do ápice dentário e também dos processos de regulação de outras células (45, 46). Em relação as diferenças entre dentes permanentes maduros e DPLs, estes últimos apresentam paredes de dentina mais finas, ápice aberto e câmara pulpar mais ampla (47). Isso implica em uma maior susceptibilidade a fraturas e também à invasão de microrganismos na câmara pulpar (48). Além disso, DPLs apresentam câmara pulpar com maior número de vasos sanguíneos que dentes maduros (49). Um estudo de imuno-histoquímica demonstrou uma maior expressão do marcador CD34 em polpas de DPLs, do que dentes maduros (50). Este marcador pode estar fortemente relacionado com os processos de angiogênese (51). Ademais os DPLs apresentam uma maior quantidade de regiões de interação entre tecido epitelial e células mesenquimais indiferenciadas, conhecidas como restos epiteliais de Malassez (52). DPLs possuem ainda uma maior concentração de SCAPs, que estão diretamente relacionadas com o fechamento do ápice dentário (53).

A polpa possui, entre tantas outras funções, um mecanismo de proteção através da resposta imunológica frente a agentes agressores (54). No entanto, a presença de antígenos microbianos ou trauma dental nos DPLs podem levar ao desenvolvimento de uma resposta inflamatória, que pode evoluir para a necrose (55). Frente aos processos de balanço (fisiológico) e desbalanço (patologias pulpares), o sistema imunológico pulpar apresenta importante papel, tanto na regulação e manutenção do tecido, quanto na proteção e destruição de agentes invasores (56). O sistema imunológico pulpar pode ser constituído de células dendríticas, macrófagos, linfócitos e uma variedade de células mesenquimais, epiteliais e endoteliais (57).

2.2 PATOLOGIAS PULPARES ENVOVENDO DPIS

Como mencionado, os principais agentes etiológicos relacionados a necrose pulpar em DPI podem ser o trauma ou a cárie dental (58). Em termos mundiais, cerca de 20-30% das crianças de até 12 anos já sofreram algum tipo de trauma dentário (59). Como uma das possíveis complicações do trauma dental, o tecido pulpar pode ser afetado, apresentando como causa o rompimento de vasos sanguíneos e conseqüentemente necrose asséptica por hemorragia (60). Quando uma destas lesões afeta a BEH, ou causa uma necrose pulpar, o desenvolvimento da raiz pode ser estagnado, aumentando o risco de fraturas (61). Além disso, dentes traumatizados podem ser mais susceptíveis à entrada de microrganismos no ambiente pulpar e conseqüentemente, desenvolvimento de uma pulpíte irreversível (62).

Já em relação aos processos cariosos, sabe-se que a constituição da microbiota bucal pode ser bastante heterogênea, incluindo espécies bacterianas, fúngicas e virais (63). A grande maioria desses microrganismos habita a cavidade oral em caráter comensal (64). No que diz respeito à etiologia das infecções bacterianas da polpa, estudos demonstram uma maior prevalência de bactérias anaeróbicas, estritas e facultativas, durante os processos de patologia pulpar (65, 66). Por se encontrarem localizadas entre as camadas de tecidos mineralizados, anatomicamente, a concentração de oxigênio no tecido pulpar se torna restrita (67). Em adição, a necrose, quando instalada, reduz ainda mais a disponibilidade de oxigênio proveniente da circulação sanguínea, inviabilizando assim, a presença de bactérias aeróbicas obrigatórias (68).

As bactérias produtoras de biofilme estão geralmente relacionadas com lesões endodônticas (69). O biofilme, portanto, está envolvido ainda nas primeiras etapas do mecanismo fisiopatológico da pulpíte, que normalmente se inicia com a lesão cariosa e progride para a necrose pulpar, lesão perirradicular e perda óssea (69, 70).

O biofilme pode ser formado quando várias bactérias da mesma espécie se unem formando uma colônia e, através dessa interação estimulam a produção e a secreção de uma matriz extracelular polimérica responsável por sua defesa a ataques físicos ou químicos (71). Essa matriz extracelular circunda todas as células bacterianas e sua proteção a agentes antimicrobianos pode ser diretamente proporcional a sua espessura (72).

A produção do biofilme pode ser mediada por mecanismos de comunicação entre as células bacterianas, fenômeno chamado de *quorum sensing* (73). Através da produção de moléculas sinalizadoras, células bacterianas conseguem se comunicar e promover respostas uniformes em toda a colônia (74). Fora isso, o biofilme também facilita a transferência de genes de resistência entre as bactérias, com a produção de bombas de efluxo (74). Embora a relação entre a presença/permanência bacteriana e o insucesso terapêutico de tratamentos endodônticos seja bem estabelecida na literatura, há divergências quanto a persistência e a virulência de alguns gêneros bacterianos (75). Murad e colaboradores, utilizando amostras provenientes de 36 pacientes que receberam tratamento endodôntico no ano anterior ao estudo e com lesão periapical atual, detectaram, através de técnicas de amplificação de DNA, um total de 79 espécies bacterianas. Os resultados obtidos sugerem que as espécies bacterianas *Enterococcus faecium* e *Staphylococcus epidermis* podem ser mais prevalentes em lesões endodônticas. Os autores ainda sugerem que estudos relacionados à identificação da microbiota desse tipo de lesão podem ser extremamente complicados e que a divergência dos resultados obtidos com outros estudos presentes na literatura se deve ao fato de que podem ser empregados diferentes métodos analíticos para o sequenciamento e a identificação do material genético obtido a partir de amostras (68).

Apesar disso, o gênero *Enterococci* ainda pode ser fortemente correlacionado com lesões endodônticas (69). Bactérias desse gênero podem ser conhecidas por sua resistência antimicrobiana e pela competição com outras espécies bacterianas (76). A espécie bacteriana *Enterococcus faecalis*, que normalmente habita o trato gastrointestinal, pode ser comumente encontrada em lesões pulpares e perirradulares (77). Esta pode ser classificada como Gram-positiva e anaeróbica facultativa, o que lhe dá subsídios para estar presente tanto nas fases iniciais quanto nas fases mais avançadas da inflamação. Além disso, por causa de sua forma arredondada a penetração pelos túbulos dentinários se torna facilitada. A produção de biofilme também pode ser um fator de risco associado à bactéria *E. faecalis* (78).

Assim como *E. faecalis*, a espécie bacteriana *Staphylococcus aureus* vem se demonstrando cada vez mais virulenta e, conseqüentemente, correlacionada a lesões endodônticas (79). A *S. aureus* também pode ser classificada como uma bactéria Gram-positiva e anaeróbica, assim como o *E. faecalis*. Similarmente, a *S. aureus*

possui um arcabouço esférico que facilita sua passagem pelos túbulos dentinários. Além disso, a *S. aureus*, também pode ser uma bactéria produtora de biofilme (80).

A presença dos microrganismos presentes no sistema de canais radiculares de DPIs foi avaliada, e mesmo depois da utilização de diversas medicações intracanaís (9). As espécies mais comumente encontradas foram *Actinomyces naeslundii*, *Porphyromonas endotalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *E. faecalis* (9).

O tecido pulpar por ser circundado por estrutura dentinária rígida, apresenta alguma dificuldade para o acesso microbiano (81). Uma vez que esse complexo pode ser violado, a polpa está sujeita a sofrer invasões, o que resulta em respostas inflamatórias de diferentes níveis (56). A inflamação no tecido pulpar pode ser complexa, devido a conformação anatômica que a mesma se encontra (14).

A imunidade inata pulpar apresenta-se como a primeira reação do organismo frente a agentes infecciosos, possuindo um papel fundamental na identificação de antígenos (82). Esta pode atuar de forma inespecífica frente a qualquer agente infeccioso (83). Ademais, ela desenvolve uma forte reação inflamatória, envolvendo diversas células que chegam por meio da circulação sanguínea a fim de eliminar os agentes infecciosos (57). A polpa pode ser um tecido que, mesmo em condições normais, possui uma pressão devido a presença do líquido intersticial (57). Esse fluido originado do plasma pode ser rico em imunoglobulinas, proteínas do soro e mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas (84).

Através do reconhecimento de antígenos presentes neste tecido, diversas células como neutrófilos, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos e células endoteliais produzem uma série de citocinas, tais como as interleucinas IL-8, IL-1 α , IL-6, IL-12 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (85-87). Estas citocinas estão diretamente envolvidas com a dilatação dos vasos sanguíneos pulpares, aumento da permeabilidade vascular, quimotaxia, ativação, modulação da resposta imune adaptativa e exacerbação da inflamação (88, 89). Ademais a produção de espécies reativas de oxigênio, como o radical livre gasoso óxido nítrico indutível (NO), pode ser capaz de contribuir para a destruição dos patógenos, pela sua ação oxidativa (90).

Quando a inflamação em estágio avançado atinge o tecido pulpar, se torna difícil para o mesmo reverter o quadro (91). Durante esse processo, as fibras nervosas presentes neste tecido expressam neuropeptídeos, tais como a substância P (SP), o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina (CGRP), o neuropeptídeo K (NK), neuroquinina A (NKA), neuropeptídeo Y (NPY), polipeptídeo intestinal vasoativo (VIP),

somatostatina, secretoneurina e galanina (92-94). Esses neuropeptídeos podem ser responsáveis pela regulação do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, vasodilatação e as alterações patológicas, observadas clinicamente pelos sintomas de dor (95). A síntese destes mediadores não só degrada o tecido pulpar, como também o impossibilita de recrutar células-tronco para o local (96).

A inflamação crônica da polpa, pode ser caracterizada pela presença de linfócitos B, células do plasma e infiltrado de linfócitos T, com predominância dos CD4+ sobre os CD8+ (97). Os linfócitos do tipo Th1 promovem uma resposta mediada por interferon gama (IFN)- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12 o que determina uma resposta pró-inflamatória e conseqüentemente leva à destruição do tecido (98). Enquanto que a resposta do tipo Th2 tem associação com IL-13, IL-10, IL-5 e IL-6, que estão relacionadas com uma resposta anti-inflamatória (99). Altos níveis de TNF- α e IL-1- α promovem a liberação de mediadores inflamatórios e quimiocinas que intensificam a resposta (100). O IFN- γ ativa macrófagos, aumentando ainda mais a inflamação (101). O perfil Th17, também presente nas infecções pulpares crônicas, está envolvido com a liberação de IL-17 e fator de crescimento e transformação (TGF)- β (102, 103). Ademais, Th17 está envolvido com a ativação do receptor do ligante nuclear kappa-B (RANKL), um estimulador de osteoclastos (104).

Nesse momento, os macrófagos desempenham um papel fundamental, polarizando em M1 (função pró-inflamatória) ou M2 (pró-resolução) (105). Estas células se diferenciam a partir de monócitos e podem se polarizar reversivelmente em M1 ou M2, de acordo com o perfil de citocinas liberadas durante os processos de inflamação e reparo teciduais (106). A polarização para M1 pode ser geralmente mediada por antígenos como o lipopolissacarídeo (LPS), que induz a produção de IL-1 β , IL-12, TNF- α e IL-23, exacerbação da resposta imune e destruição do tecido, por estas células (107). Já a linhagem de macrófagos M2, quando estimulada por IL-10 e TGF- β , atua na redução de citocinas pró-inflamatórias, no recrutamento de linfócitos T CD4+ e estimulação dos linfócitos T reguladores (Treg) (30). Diante disso, a atuação inicial de macrófagos M1 e o reparo tecidual de M2 podem ser a chave para o equilíbrio entre um estado patológico e fisiológico pulpar (108). A resolução da inflamação ainda requer a eliminação de agentes patogênicos, a redução de mediadores pró-inflamatórios e presença de mediadores anti-inflamatórios, como IL-4, IL-10, heme oxigenase-1 e Treg, que cessam os danos (96). Até então nenhum estudo descreveu o papel de macrófagos especificamente em DPIs.

Desta forma, as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α , IL-6, IL-12, TNF- α), anti-inflamatória (IL-10) e NO, descritos abaixo, foram selecionados para este trabalho, por estarem diretamente relacionados com os processo de destruição e reparo tecidual pulpar.

2.2.1 Citocinas e mediadores envolvidos com a destruição e reparo tecidual pulpar

A interleucina IL-1 α pode ser produzida por diversas células do organismo tais como células epiteliais, endoteliais, macrófagos, células dendríticas, fibroblastos, linfócitos, queratinócitos e hepatócitos (109). Esta citocina tem caráter pró-inflamatório e sua produção indutível está relacionada principalmente com as vias de sinalização P1 e NF-kappa B, que regulam positivamente sua síntese (110). Além de sua ação sistêmica, no tecido pulpar esta citocina parece ter um papel central juntamente com outras citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , no processo de desenvolvimento e progressão da destruição tecidual (111). Ademais, a associação da produção de IL-1 α está relacionada com a presença de antígenos bacterianos como LPS e outras bactérias como *P. gingivalis*, *E. coli* e *E. faecalis* (112). Um estudo imuno-histoquímico demonstrou alta ligação de anticorpos anti-IL-1 α tanto nos momentos iniciais da pulpíte, quanto nos tecidos necrosados, relacionando a destruição deste tecido e o retardo do reparo tecidual, com a presença desta citocina (113).

Assim como o TNF- α , a IL-1 α está associada à apoptose de fibroblastos pulpares. Além disso, pode estar relacionada com os casos de infecções persistentes e insucessos no tratamento endodôntico (114). Até então, nenhum estudo descreveu o papel desta citocina especificamente em DPIs.

A interleucina IL-6 pode ser uma das primeiras citocinas liberadas nos momentos iniciais da inflamação e apresenta ação pleiotrópica em infecções locais (115). Esta citocina pode ser produzida por células endoteliais, fibroblastos, células tronco pulpares, queratinócitos, macrófagos e neutrófilos e tem relação direta com a promoção de fatores solúveis do plasma e ativação do sistema complemento (88, 116). A IL-6 induz a infiltração de células do sistema imune inato pelo aumento das

moléculas de adesão e também pela indução da síntese de metaloproteinases (117). Sua produção também está associada às proteínas de fase aguda como a proteína C reativa (118). A IL-6 também pode regular o sistema imune, atuando na polarização de linfócitos Th2, Th17 e T reguladoras (Treg) (119). Esta citocina por conseguinte, pode ser regulada pela produção de IL-17 e IL-8 (120). No tecido pulpar, os antígenos de bactérias Gram-positivas podem atuar no receptor *tooll like receptor* TLR-2 de odontoblastos e regular positivamente a produção de IL-6 (55). Esta citocina, também pode ser aumentada em resposta à produção de IL-1 e TNF- α (121). Além disso, a IL-6 exacerba a resposta imune pulpar, uma vez que está envolvida na vasodilatação pulpar e permeabilidade vascular (85). Ademais, a produção de IL-6 pode estar associada ao edema pulpar pela ação de bactérias Gram-positivas infiltradas nos túbulos dentinários (55).

A IL-6 pode desempenhar um caráter protetor, uma vez que a diminuição da produção de IL-6 poder exacerbar a lesão periapical e conseqüentemente aumentar o número de osteoclastos, contribuindo para a reabsorção óssea (122, 123). Quando se trata do reparo tecidual, a IL-6 parece ter um papel fundamental nos processos de diferenciação celular (124). A produção de IL-6 aumenta a diferenciação osteogênica e adiposa, além de estar relacionada com a diferenciação condrogênica de células-tronco pulpares (125). A presença de *P. gingivalis* aumenta a expressão de TLR-2 e TLR-4 em células-tronco pulpares na presença de IL-6 e TNF- α (126). Outro estudo observou quantitativamente uma maior produção basal de IL-6 em células mesenquimais de dentes decíduos esfoliados, quando comparadas às células-tronco de dentes permanentes (127). Uma vez que fibroblastos e células pulpares produzem IL-6 na presença de bactérias envolvidas na progressão das patologias pulpares, a produção desta citocina pode levar à degradação de proteínas da matriz extracelular (MMPs) como colágeno e MMP1, MMP2 e MMP3 (117).

Os DPIs apresentam um maior número de SCAP, quando comparados aos dentes maduros. A produção de IL-6 por estas células foi avaliada, na presença de LPS. A produção desta citocina foi relacionada com a ativação do TLR-4 (128).

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), classicamente estudado e caracterizado como uma citocina pró-inflamatória pleiotrópica pode ser sintetizado principalmente por macrófagos e células dendríticas (129). A produção de TNF- α pode causar a maior parte dos sintomas presentes na pulpíte e está aumentado sistemicamente em pacientes com pulpíte aguda (130). Os sintomas clínicos de dor e

sensibilidade dentinária estão relacionados com as pressões internas exercidas pelos vasos sanguíneos às terminações nervosas e pela produção de prostaglandinas, mediadas pela sensibilização dos canais iônicos que conduzem os estímulos dolorosos nas terminações nervosas pulpare (131). A ação pró-inflamatória e dolorosa desta citocina pode estar associada com a ativação de receptores de canais transientes (TRPs). Estes estão presentes nos odontoblastos, que transmitem os sinais dolorosos através dos prolongamentos odontoblásticos (15).

O TNF- α pode estar associado à osteíte e também à osteólise assim como ao aumento do número de osteoclastos e RANKL (132). O estímulo de RANKL por TNF- α coloca este mediador como estimulador da osteoclastogênese e reabsorção óssea (133). Alguns estudos associam lesões perirradiculares e infecções refratárias com um aumento da expressão de TNF- α (134, 135). A produção deste está relacionada com a produção de IL-1, que em conjunto, atuam no processo de reabsorção óssea e desencadeiam uma resposta do tipo 1, seja relacionada aos macrófagos ou às células T (136). A síntese de IL-6 também está relacionada com TNF- α , uma vez que macrófagos e neutrófilos diminuem a produção de IL-6 em resposta ao aumento da produção de TNF- α (117).

A presença de TNF- α no tecido pulpar pode contribuir para destruição e apoptose de fibroblastos, além da degradação da matriz extracelular da polpa (117). Diversos estudos relacionam o efeito citotóxico deste mediador em fibroblastos murinos e da polpa humana (137-139). Ademais, a ação citotóxica de TNF- α em fibroblastos gengivais foi associada ao aumento do ácido butírico e ativação da via de sinalização extrínseca de caspase 8 (140). Porém, a ausência de TNF- α dificulta a diferenciação de células-tronco pulpares, uma vez que células-tronco pulpares estimuladas com baixas concentrações de TNF- α aumentaram a expressão para marcadores de condrócitos e adipócitos (141, 142). Os DPIs apresentam uma maior concentração de SCAP, que além de estarem relacionadas com o desenvolvimento do ápice dentário, podem ser capazes de produzir TNF- α , na presença de LPS (128).

A interleucina IL-12 pode ser secretada por neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B, após a ativação de células apresentadoras de antígenos (143). Esta citocina regula a balança Th1, Th2 e Th17, aumentando a resposta imune celular, mediada principalmente por Th1 e bloqueando a diferenciação de linfócitos T *naive* em Th2 (144). A IL-12 pode ser produzida em resposta a antígenos intracelulares e é conhecida por ativar células *natural killers* (145). Esta citocina

também está associada com a ativação do gene promotor de interferon gama IFN- γ (146). O aumento de IL-12 e de IFN- γ estão relacionados com a ativação de macrófagos e conseqüente elevação da produção de espécies reativas de oxigênio como NO, no combate aos antígenos, pela ação microbicida e oxidativa (147). A ação de IL-12 em células T citotóxicas pode aumentar a expressão de granzimas e perforinas nestas células, e em linfócitos B, pode aumentar a produção de imunoglobulinas relacionadas com uma resposta Th1 (148, 149). Além disso, o aumento de IL-12 está relacionado com a diferenciação do perfil M1 de macrófagos (106). Até então, nenhum trabalho foi publicado relacionando o papel desta citocina especificamente em DPLs.

A interleucina IL-10 pode ser uma das principais citocinas anti-inflamatórias e está diretamente relacionada com a diferenciação de células T *naive* em Th2 (150). Esta pode ser comumente sintetizada por Treg, macrófagos, monócitos, T auxiliares (Th1, Th2 e Th17) e células dendríticas (151). A IL-10 regula negativamente a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de minimizar a ação danosa destas nos tecidos (150). Ademais a ação da IL-10 pode ser contrabalanceada pela produção de IFN- γ , o que pode caracterizar uma resposta mediada por Th1, via IFN- γ ou Th2, Th17 e Treg, estimuladas por IL-10 (152). A IL-6 e a IL-10, em conjunto, inibem a osteoclastogênese (136). A utilização de murinos *knockout* para IL-12 e IFN- γ não interferiram na evolução de processos de reabsorção periapical, ao passo que murinos *knockout* para a produção de IL-6 e IL-10, apresentaram uma exacerbação da resposta periapical (153). A presença de bactérias *Fusobacterium nucleatum* e *Peptostreptococcus prevotii* em camundongos *germ-free* estimularam a produção de IL-10 e conseqüente aumento da expressão de TGF- β , após 14 dias de estímulo, em resposta ao aumento de TNF- α , RANKL e IFN- γ (153). A expressão de IL-10 nos processos de neutralização e estabilização da resposta inflamatória, podem ser essenciais para regeneração e manutenção tecidual, uma vez que a produção de IL-10 está relacionada a produção de TGF- β (154). Células-tronco pulparem podem regular positivamente a produção de IL-10, ao passo que diminuem a expressão de IL-2 e IFN- γ (155). A linhagem de macrófagos M2, quando estimulada por IL-10 e TGF- β atua na redução de citocinas pró-inflamatórias, no recrutamento de linfócitos T CD4+ e estimulação dos linfócitos Treg (30). Até então, ainda não foram publicados trabalhos relacionando o papel desta citocina especificamente em DPLs.

O óxido nítrico (NO) pode ser considerado um radical livre gasoso produzido pela NO-sintase (NOs), convertendo L-arginina em L-citrulina. Três isoformas de NOs tem sido relatadas, sendo duas delas: o NOs 1 (neuronal NOs) e NOs 3 (endotelial NOs), expressos em menores concentrações no tecido pulpar (156). O óxido nítrico indutível NOs 2 pode ser produzido em resposta a presença de microrganismos e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e TNF- α (157). Este mediador atua na destruição de microrganismos mas ao mesmo tempo, em altas concentrações pode ser danoso para o tecido pulpar, uma vez que o aumento de NOs 2 pode degradar as proteínas da matriz extracelular e também o colágeno no tecido conjuntivo frouxo (158). No tecido pulpar, a síntese de NO acontece principalmente por fibroblastos, células-tronco pulpares e macrófagos (159). Por possuírem um marcador imunoreativo para 3-nitrotirosina (um biomarcador para derivados de peroxinitrito), os odontoblastos também podem produzir NOs 2. Essa produção pode ser importante no combate inicial de bactérias Gram-positivas como *Streptococcus mutans* presentes na dentina (160). A síntese de NOs por odontoblastos está relacionada com a ativação do receptor (TLR2) (161). Fibroblastos pulpares podem ser capazes de produzir NO em resposta a antígenos *heat killed* de *E. faecalis* (162). A produção de NO no tecido pulpar também pode contribuir para os processos de formação e regeneração tecidual, já que a formação de novos vasos pode ser essencial para construção de um novo tecido (163). E por ser lipofílico, o NO pode facilmente ser permeável às membranas biológicas, causando vasodilatação (164). Ademais, o NO pode regular positivamente a produção de VEGF, fundamental para a angiogênese (165). Como os DPLs apresentam uma maior concentração de vasos sanguíneos, a síntese deste radical livre torna-se fundamental na manutenção e no estabelecimento de sua fisiologia (163). Um estudo *in vitro* demonstrou um aumento da expressão de NO sintase em células pulpares oriundas de DPLs, quando comparadas a células pulpares de terceiros molares (166).

A polpa apresenta dificuldade de auto-resolução quando atinge os quadros de pulpite irreversível. Tal fato ocorre em virtude do aumento da pressão pulpar e da êxtase sanguínea, dificultadas pelo processo inflamatório e pelo fato deste tecido estar circundado pelas paredes inextensíveis de dentina. Desta forma, ocorre uma dificuldade na drenagem dos mediadores inflamatórios, gerando grandes danos teciduais podendo evoluir para necrose pulpar (167). Diante do quadro de pulpite inicial até a necrose, o tratamento endodôntico se torna necessário nos DPLs (168).

2.3 TRATAMENTO ENDODÔNTICO EM DPIS

Os DPIS apresentam-se em fase final de formação radicular e assim, possuem paredes radiculares finas, ápice aberto e necessitam do tecido pulpar para sua formação radicular total. Neste sentido, sempre que possível, tratamentos endodônticos conservadores devem ser preteridos, por manter pelo menos parte do tecido pulpar viável para o fim desta formação radicular (169). No entanto, quando o tratamento endodôntico radical se torna necessário, cuidados durante os processos de instrumentação e irrigação do SCR, além do seu preenchimento com um material inerte devem ser tomados (170). E este último ainda permanece como um desafio para a endodontia (171, 172). Neste sentido, as opções de tratamento para DPIS podem ser a apicigênese, a apicificação ou tentativa de revascularização pulpar (173).

2.3.1 Apicigênese e apicificação

Durante muitos anos, diversas técnicas clínicas para tratamento de DPIS foram discutidas, a fim de se estabelecer um protocolo, que preservasse a estrutura dentária na boca e ao mesmo tempo contribuísse para o desenvolvimento do ápice dentário (174-176). As primeiras condutas clínicas para o tratamento de DPIS foram a apicigênese e a apicificação (177).

A apicigênese pode ser considerada uma terapia de complementação radicular em dentes jovens imaturos, que apresentam a polpa com vitalidade e que sofreram exposição pulpar devido a traumas ou fraturas coronárias, assim como a cáries dentárias e restaurações inadequadas (178). Este processo pode ser atingido quando se torna possível a realização de formas de tratamento endodôntico conservador, como capeamento pulpar direto ou pulpotomia (remoção da porção pulpar coronária) (179). Com esta conduta de tratamento, parte do tecido pulpar pode ser preservado, assim como a BEH (180). A apicigênese foi defendida por Tomeck e Smith, que demonstraram histologicamente, em dentes com ápice aberto de macacos, que o

processo de desenvolvimento radicular ocorreria após realização de pulpotomias e pulpectomias, sem o uso de substâncias químicas, medicações ou preenchimento radicular. Eles concluíram que a formação radicular poderia continuar sem a terapia endodôntica convencional invasiva, mesmo que o crescimento pudesse ser retardado e irregular. Sendo assim, o fechamento do ápice radicular parecia estar mais relacionado ao crescimento do tecido trabecular, do que com a deposição de tecidos duros (181). Desta forma, a preservação de parte do tecido pulpar em condições de normalidade, possibilita uma completa formação radicular, deposição de dentina, aumento da espessura radicular e promoção do fechamento do ápice radicular (2).

No entanto, quando a necrose pulpar estabelece-se, pode ser necessária a realização do tratamento endodôntico radical. Desta forma, a partir da década de 60, o processo de apicificação foi descrito como uma alternativa para estes casos (182, 183). A apicificação consiste numa abordagem conservadora para induzir a formação de uma barreira calcificada no ápice radicular (184). O objetivo desta técnica pode ser a diminuição do diâmetro apical dos DPLs, a fim de facilitar uma futura obturação com um material inerte (185). Embora a apicificação seja um processo natural, este deve ser estimulado por um ativador biológico (186). Frank (187) e Heithersay (188) observaram o fechamento do ápice radiograficamente, quando uma pasta de hidróxido de cálcio foi introduzida em canais de DPLs. Steiner e Van Hassel utilizaram uma mistura de hidróxido de cálcio e paramonoclorofenol canforado para induzir o fechamento apical em DPLs. Eles demonstraram que esse material radiopaco atravessava o forame, e formava uma estrutura semelhante ao cimento (189).

Dylewski afirmou que o material calcificado que se formava no ápice seria uma proliferação de tecidos conjuntivos cuja diferenciação assemelha-se à osteodentina, que se torna contínua com a predentina (190). Neste sentido, a terapia com utilização do hidróxido de cálcio se tornou padrão, por muitos anos (191).

Diversos estudos demonstram as favoráveis respostas clínicas, radiográficas e histológicas obtidas com hidróxido de cálcio, evidenciada com a dissociação dos íons Ca^{2+} e OH^-), como: controle da reação inflamatória (por ação higroscópica, formação de pontes de proteinato de cálcio e inibição da fosfolipase); neutralização de ácidos produtos de osteoclastos (hidrolases ácidas e ácido láctico); indução de mineralização (através da ativação de fosfatase alcalina e ATPases dependentes de cálcio); indução da diferenciação celular; despolimerização de endotoxinas; ação antibacteriana por danos irreversíveis ao DNA, proteínas, enzimas e lipídeos bacterianos (192-196).

Ademais, relata-se que o hidróxido de cálcio pode interagir positivamente com as células da BEH (197).

No entanto, a terapia tradicional de apicificação com a utilização de Ca(OH)_2 a longo prazo apresenta algumas desvantagens como a variabilidade de tempo de tratamento, imprevisibilidade da formação de um selamento apical e dificuldade de acompanhamento dos pacientes (198, 199). Em adição, o uso do Ca(OH)_2 pode gerar fraturas a longo prazo, na região cervical da raiz (200). Diante as críticas e insucessos da apicificação com a utilização do Ca(OH)_2 , em 1999 Shabahang e colaboradores demonstraram a formação de uma barreira apical consistente quando utilizaram um material com características semelhantes ao hidróxido de cálcio (201). Esse material, chamado de agregado de trióxido mineral (MTA) foi utilizado como barreira apical em modelo canino, com ápice aberto e apresentou melhores resultados quando comparado ao Ca(OH)_2 (201).

O MTA apresenta-se como um biomaterial composto por silicato tricálcio, óxido tricálcio, óxido de silicato e aluminato de tricálcio (202). A partir do momento em que o MTA pode ser colocado em contato direto com tecidos humanos este pode apresentar diversas ações, tais como: proliferação celular através da ação dos íons de óxido de cálcio (203), criação de um ambiente antibacteriano pela sua ação alcalina (204), modulação da produção de citocinas (205) e a balança Th1 e Th2 do sistema imune (206), estimulação da diferenciação e migração de tecidos duros (207), além de atuar no selamento biológico (208).

Vários estudos confirmaram resultados clínicos bem-sucedidos do MTA, incluindo a cicatrização de lesões periapicais existentes na maioria dos dentes imaturos (209, 210). Pesquisadores avaliaram o potencial do MTA no fechamento do ápice de incisivos centrais de 21 crianças avaliadas por 6 meses e constataram o fechamento do ápice dentário em 95,5% dos casos através de análise radiográfica (211). Diante dos diversos benefícios biológicos, o MTA também tornou-se indicado como um material para indução da formação de uma barreira apical (212).

A apicificação permite o fechamento do ápice dentário, com a correta conduta clínica com a utilização de um material bioativo, como o Ca(OH)_2 ou MTA (213). Todavia, diversas críticas tem sido realizada a essas técnicas, pois nelas, as paredes radiculares permanecem finas e assim, frágeis (214). Ademais, tanto o Ca(OH)_2 quanto o MTA não estão relacionados com a indução da formação de um novo tecido para o espaço pulpar (215-217).

Frente às desvantagens da apicificação, novas terapias regenerativas vem ganhando espaço na endodontia, como os processos de revascularização pulpar (218). Essa técnica se associa a diversos avanços bio e nanotecnológicos relacionados à engenharia de tecidos, o que contribuir não só com o fechamento do ápice dentário, mas com a formação de um novo tecido para o espaço pulpar (219).

2.3.2 Revascularização/regeneração pulpar

A revascularização pulpar pode ser uma alternativa clínica para tratamento de DPLs com necrose pulpar, através da formação de um coágulo apical induzido (220). Apesar de ser um assunto amplamente discutido e difundido na última década, os primeiros achados clínicos da técnica de revascularização pulpar podem ser descritos principalmente para os casos de avulsão dentária (221). Diversos modelos em animais, principalmente em cães, demonstravam o potencial de neoformação de vasos sanguíneos em dentes avulsionados, após a reimplantação imediata dos elementos dentários (222-224). Os achados histológicos mostravam um reestabelecimento do suprimento vascular oriundo do ápice, em dentes avulsionados após o reimplante e avaliação durante 120 dias (225).

Nygaard-Ostby (215) realizou um estudo clínico de formação de tecido a partir do ápice dentário. Para verificar a hipótese, 17 pacientes com lesão pulpar ou dentes necrosados foram tratados por desinfecção do canal radicular, dilatação dos forames apicais e indução de um sangramento apical proposital e posterior ao uso do hidróxido de cálcio. Após um acompanhamento de 3 anos, os dentes foram extraídos para o exame histológico, mesmo sem nenhuma sintomatologia. Os exames radiográficos revelaram o fechamento do ápice e histologicamente, uma invaginação de um tecido conjuntivo fibroso, associado a ilhas mineralizadas (226).

No contexto dos DPLs, em decorrência de suas características anatômicas, envolvendo paredes radiculares finas e ápice aberto, dificuldades para uma correta limpeza química e mecânica podem ser encontradas, apesar de serem essenciais para remoção do biofilme presente nos casos de necrose pulpar (5). Além disso, a permanência destes microrganismos se torna um fator desencorajador para a formação de novos tecidos (48). Frente à problemática da presença de biofilme e

microrganismos no canal radicular para a reconstrução de um novo tecido pulpar, Hoshino e colaboradores sugeriram a utilização de uma pasta contendo associação de três antibióticos (ciprofloxacino, metronidazol e minociclina), como medicação intracanal (227).

A revascularização pulpar consiste na invaginação do tecido apical, após a indução de um sangramento, com conseqüente formação de um tecido conjuntivo fibroso, no sistema de canais radiculares (228). Já a regeneração pulpar pode ser a formação de um tecido idêntico ao que foi perdido, rico em células-tronco, vasos sanguíneos e inclusive terminações nervosas (5). Apesar de ser uma técnica já usada clinicamente, muitos estudos *in vivo* e clínicos questionam as reais características desse novo tecido formado, uma vez que a maioria dos pacientes submetidos a revascularização pulpar e acompanhados radiograficamente não apresentaram sensibilidade após a realização do procedimento (1, 3, 62, 229, 230). Apesar das diferentes particularidades das técnicas empregadas em terapias de revascularização pulpar, Diógenes sugeriu o protocolo mais aceito atualmente (Figura 1). Neste protocolo, o primeiro passo consiste no acesso do canal radicular e irrigação com hipoclorito de sódio e solução salina. O canal então pode ser seco e uma medicação intracanal pode ser aplicada, responsável por eliminar o maior número de microrganismos que possam dificultar a formação do novo tecido. Após 2-4 semanas, com a ausência de sintomatologia, uma nova irrigação com hipoclorito de sódio e solução salina pode ser feita, e assim uma sobreinstrumentação pode ser realizada para promover a formação de um coágulo apical. Logo após, recomenda-se o uso do MTA para vedamento biológico e em seguida, uma restauração definitiva. O tratamento deve ser acompanhado durante diversos meses e até anos (5).

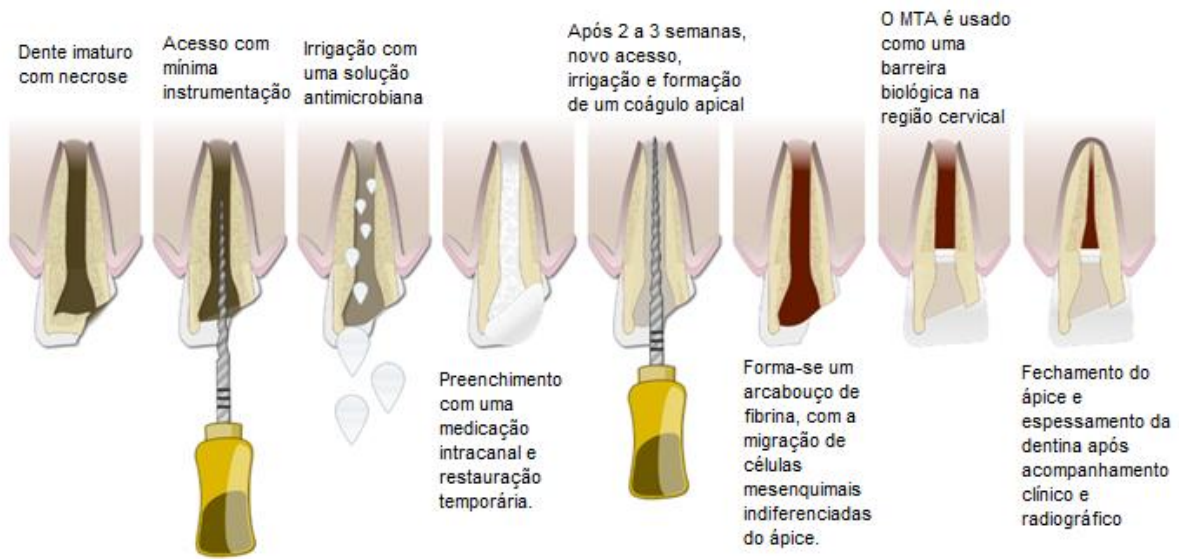


Figura 1 – Representação esquemática do procedimento das etapas clínicas da terapia para revascularização pulpar (5) .

No entanto, algumas desvantagens relacionadas à medicação intracanal estabelecida para a técnica, conhecida como pasta tripla antibiótica foram relatadas. Dentre elas, a citotoxicidade e manchamento dentinário. Além disso, o arcabouço natural formado por fibrina pode não ser suficiente para a reconstrução do tecido pulpar perdido (3, 214, 231-233). Aliás, ainda não foram descobertos os reais estímulos para a formação do tecido o conjuntivo semelhante ao tecido pulpar inervado (234).

As ideias mais recentes relacionadas com a revascularização estão baseadas na biologia molecular, biotecnologia, nanotecnologia e engenharia de tecidos (235). Esta última propõe três fatores fundamentais para a construção de um novo tecido: a presença de células mesenquimais indiferenciadas, a presença de fatores de crescimento e o estabelecimento de um arcabouço (236).

O tecido pulpar pode ser rico em células-tronco e a atuação destas tem um papel essencial na formação do tecido pulpar, desenvolvimento, manutenção e regulação de outras células presentes na polpa (46). As células-tronco pulpares foram identificadas pela sua capacidade de regeneração do complexo dentino-pulpar pela primeira vez por Gronthos (237). Estas foram eventualmente designados como células

tronco da polpa dentária (DPSCs) (237). Durante os processos de necrose, no entanto as DPSCs podem ser destruídas (238).

Embora diversas células-tronco tenham sido identificadas na região oral, as SCAPs, células tronco de dentes decíduos exfoliados (SHED) e células tronco do ligamento periodontal (PDLSC) estão diretamente ligadas aos processos de regeneração tecidual (239). DPSCs podem ser células multipotentes capazes de se diferenciar em adipócitos, osteoblastos e mioblastos (240). Estas células possuem capacidade neurogênica, através de sua ação neurotrópica (241). Além disso, estas células podem ser criopreservadas e utilizadas em terapias de engenharia tecidual em DPLs (242, 243). As SCAP podem ser células essenciais para o desenvolvimento do ápice dentário e desenvolvimento do tecido pulpar (217, 244). Um estudo revelou a presença do marcador CD34 em SCAPs (245). Este marcador está relacionado com a adesão de outras células mesenquimais indiferenciadas (246). As SHED apresentam ação neurotrópica superior a DPSCs e podem ser responsáveis pela proliferação de DPSCs (236). Estas células também induzem a produção de colágeno e regulam a produção de citocinas relacionadas ao reparo tecidual como IL-10 e TGF- β (127, 247). Já as PDLSCs estão diretamente ligadas a diferenciação de cementoblastos e a formação de tecido adiposo (248).

As células do sistema imune como macrófagos M2, também vem sendo amplamente exploradas no contexto regenerativo (249). Estas geralmente podem ser estimuladas por IL-10 e TGF- β , durante a polarização a partir de M0 (106). Durante muitos anos, a ação destas células sempre esteve envolvida apenas com a resposta imune pró-inflamatória, porém alguns trabalhos mais recentes sugerem uma ação direta no reparo tecidual e sua interação com biomateriais (250, 251). Estas células podem criar um “ambiente imune reparador” ideal para a construção de novos tecidos, atraindo fibroblastos para o local através da síntese do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e VEGF (30, 252).

Alem disso quando se trata de regeneração tecidual, a presença de fatores de crescimento e de biomoléculas de reparo podem ser essenciais para a formação de um novo tecido (253). Três vertentes de reparo tecidual vem sendo estudadas, como cruciais para a regeneração pupar, tais como a dentinogênese, a angiogênese e a neurogênese (254).

O TGF- β pode ser considerada uma citocina que pode estar diretamente relacionada com a diferenciação e desenvolvimento de fibroblastos e, além disso,

essa citocina pode estar envolvida nos processos de desenvolvimento de formação de novos odontoblastos (255, 256). Já as proteínas ósseas morfogenéticas (BMPs) possuem ligantes para a formação de ameloblastos e osteoblastos, surgindo como uma opção para o surgimento de um novos tecidos (257, 258). Um estudo demonstrou o potencial osteogênico das BMPs em camundongos com defeitos ósseos, através da utilização de um arcabouço com liberação controlada de BMP-7 (259).

A formação de novos vasos durante o estabelecimento do tecido pulpar pode ser de suma importância e diversos fatores de crescimento endoteliais e vasculares podem ser responsáveis pela angiogênese no tecido pulpar (260). Pesquisadores analisaram a matriz dentinária e observou uma elevada concentração de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-AB), VEGF, FGF, fator de crescimento da placenta (PIGF) e baixa concentração do fator de crescimento epidérmico (EGF) (261). Um estudo *in vivo* demonstrou o desenvolvimento de um tecido muito semelhante ao tecido pulpar ao introduzir nanofibras com liberação controlada de VEGF no dorso de camundongos (262). Ademais, o radical livre gasoso NO, também, apresenta um papel importante no desenvolvimento de novos vasos, por ser um potente vasodilatador (163).

A formação de tecido nervoso pode ser um dos maiores desafios enfrentados pela ciência e isso não é diferente no contexto de regeneração tecidual pulpar (263, 264). No entanto, alguns estudos tem relacionado o papel neurogênico de DPSCs e SHEDs (265, 266). A ativação de proteínas C kinases (PKCs) e vias de sinalização cAMPs associados ao FGF estimula a neurogênese em DPSCs (267). Apesar desses achados, a neurogênese do tecido pulpar ainda é desconhecida e pode ser uma chave para a reconstrução neuronal deste tecido (268).

O sangramento apical estimulado pela sobreinstrumentação na revascularização causa a migração intracanal de uma matriz de fibrina rica em plaquetas, que serve como um arcabouço natural para a formação de uma nova polpa (218). Porém, outros arcabouços tanto naturais, como sintéticos reabsorvíveis vem sendo utilizados, com a finalidade de melhorar a adesão de células-tronco e servir como uma matriz tridimensional (269). A utilização do plasma rico em plaquetas (PRP) e também, do plasma rico em fibrina (PRF) oriundos do sangue do próprio paciente, podem ser alternativas de arcabouços naturais e já apresentam bons resultados na osteoblastogênese e formação de tecido ósseo na odontologia (270, 271). Um estudo demonstrou a proliferação de fibroblastos gengivais na presença de PRF (272).

Arcabouços desenhados a partir de colágeno e também com estruturas gelatinosas associadas a células-tronco da polpa, também tem sido descritas como potenciais para utilização na engenharia de tecido pulpar (273). Além disso, nanotubos, nanofibras e matrizes degradáveis compostas de poliésteres como ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ou policaprolactona (PCL) tem se mostrado promissores para a engenharia de tecidos (269, 274-276). Foi observado o potencial antimicrobiano de nanofibras de polidioxonona (PDS) associadas ao antimicrobiano ciprofloxacino contra *Porphyromonas gingivalis* e *E. faecalis* (277).

2.3.3 Medicções intracanaís usadas para a revascularização pulpar

Os processos de revascularização e/ou regeneração pulpar podem ser extremamente complexos (70). Sendo assim, se torna essencial a manutenção de condições assépticas no SCR (5). No entanto, nestes casos, esta condição pode não ser tão simples de se atingir, pois cerca de 600 espécies bacterianas podem estar associadas a infecções pulpares (278). Além do mais, DPIs apresentam finas paredes de dentina radicular, inviabilizando a realização de uma eficiente instrumentação, ficando a descontaminação a cargo dos agentes antimicrobianos (7). Diante disso, se torna de suma importância o uso de uma medicação ou biomolécula intracanal eficiente que reduza o maior número de microrganismos no SCR, além de não ser citotóxica e estimular a formação de um novo tecido (279).

2.3.3.1 Pasta tripla antibiótica

Apesar da problemática relacionada ao fato da presença dos microrganismos dificultarem os processos de revascularização e regeneração pulpar, poucas medicações intracanaís foram estudadas para a técnica (280). A medicação padrão-ouro na clínica consiste em uma associação em proporções iguais de ciprofloxacino, metronidazol e minociclina (280, 281). Porém, apesar de suas vantagens antimicrobianas serem amplamente difundidas clinicamente, muitas críticas tem sido

direcionadas a esta medicação (6).O trabalho de Hoshino e colaboradores foi o primeiro a sugerir a utilização da pasta tripla antibiótica (TAP), baseado em trabalhos prévios, do próprio autor, que avaliou o potencial do metronidazol no combate contra bactérias da cárie (282). O experimento que propôs o uso da TAP, condicionou dentes extraídos por pulpíte em anaerobiose. O potencial antimicrobiano da associação de 4 antibióticos (metronidazol, rifampicina, minociclina e ciprofloxacino) ou de 3 antibióticos (metronidazol, ciprofloxacino, e minociclina) foi avaliado. A associação dos 3 antibióticos em concentrações iguais de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foi a responsável por eliminar a maior parte dos microrganismos presentes neste modelo *ex vivo*. Além disso, o trabalho sugeriu o uso de um veículo oleoso, como propilenoglicol para a formação de uma pasta antimicrobiana para a revascularização pulpar (227).

A partir daí, uma série de estudos, em sua maioria relatos de casos clínicos, foram publicados, utilizando a TAP, com casos de revascularização, mas sem sensibilidade provocada, após acompanhamento clínico e radiográfico (tabela 1). Até então, poucos estudos reproduziram os experimentos de Hoshino *in vitro*, e só a partir dos anos 2000, uma série de novos trabalhos começaram a estudar *in vitro* e *in vivo* o potencial desta medicação (Figura 2).

Tabela 1 - Estudos relacionados à revascularização pulpar e o perfil de medicação intracanal utilizada.

Tratamento químico	Tipo de estudo	Ação	Concentração Testada	Resultado	Confirmação do resultado	Referência
TAP	<i>In vivo</i> - camundongo	revascularização	0,01 mg.mL ⁻¹ minociclina, 0,01 mg.mL ⁻¹ de ciprofloxacino e 0,02 mg.mL ⁻¹ de metronidazol	Ativação de células odontoblásticas	Avaliação radiográfica	(283)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(284)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(285)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(286)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(4)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(287)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(288)

TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(289)
TAP	<i>In vivo</i> - cachorro	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(290)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(291)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Invaginação do tecido periodontal	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(292)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(293)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Aumento da proliferação celular apical	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(294)
Ca(OH)₂	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	Não citada no artigo	Redução do número de microrganismos do ápice	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(295)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(296)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(297)

TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(298)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(299)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(300)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(301)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	diminuição da lesão periapical	Avaliação radiográfica	(302)
TAP	<i>in vivo</i> – ratos	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(303)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(304)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(305)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica e clínica: assintomático provocado	(280)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Revascularização	Avaliação radiográfica	(9)

TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	diminuição da lesão periapical	Avaliação radiográfica	(306)
TAP	Clínico - Relato de caso	antimicrobiana	25 µg.ml ⁻¹ de cada antibiótico	Insucesso do tratamento	Avaliação radiográfica e clínica: dor espontânea e provocada	(48)

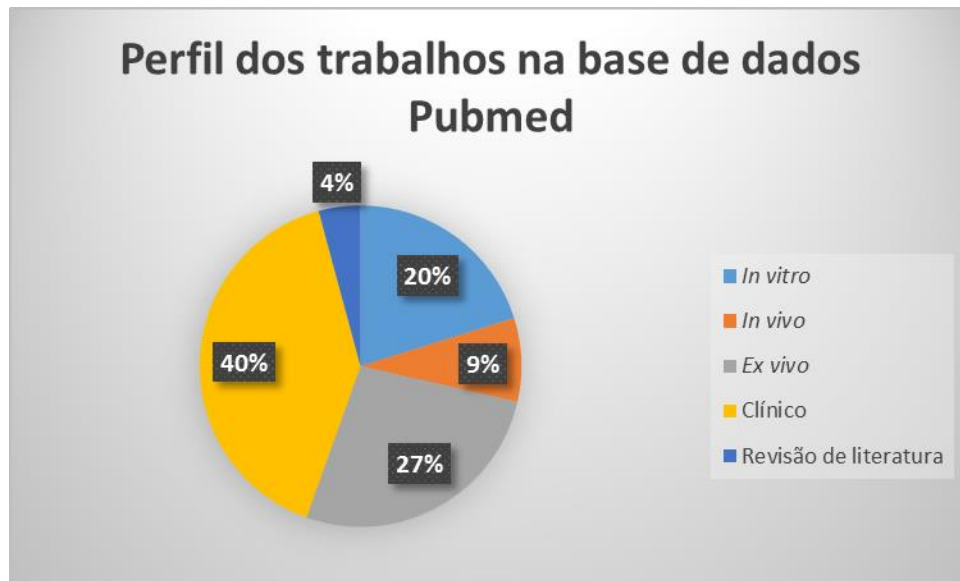


Figura 2 - Representação gráfica da distribuição dos trabalhos relacionados à pasta tripla antibiótica na base de dados *Pubmed* (acesso em: 28/12/2016, 20:32), utilizando as seguintes palavras chave: *triple antibiotic paste*, *duple antibiotic paste*, *triple antibiotic past and endodontics*, *triple antibiotic paste in root canal*, *duple antibiotic past and endodontics*, *triple past and endodontics*. Foram encontrados um total de 119 trabalhos, sendo eles: 42 clínicos, 32 *ex vivo*, 24 *in vitro*, 10 *in vivo* e 5 revisões de literatura.

Whibley e colaboradores avaliaram o potencial antimicrobiano da TAP em dentes com periodontite apical de cães, induzidos por *P. gingivalis*. A utilização de 20 mg.mL⁻¹ de cada antibiótico foi responsável pela redução de 80% das unidades formadoras de colônias (UFCs), após um período de 3 meses (307). Outro estudo avaliou diversas concentrações (1, 100 e 1000 mg.mL⁻¹) da TAP em um modelo de infecção de dentina com *E. faecalis*. Após 7 dias, houve uma redução no número de UFCs, principalmente nas maiores concentrações (100 e 1000 mg.mL⁻¹) (308).

Apesar de seu potencial antimicrobiano consolidado, uma das maiores críticas sobre a TAP está relacionada com o manchamento da dentina, associado à presença da minociclina (7, 309, 310). Diante disso, muitos estudos tem sugerido o uso apenas da pasta dupla antibiótica (DAP), contendo metronidazol e ciprofloxacino, ou a incorporação da ampicilina para uma nova formulação da TAP (311). Kim e colaboradores avaliaram o manchamento em modelos de dentina dos antibióticos isolados ou combinados (DAP ou TAP) e observou que o escurecimento estava associado exclusivamente à presença da minociclina após 3 semanas (312).

Outro problema relacionado a TAP pode ser sua ação citotóxica (6, 313). A TAP se mostrou citotóxica em DSCs, mesmo em concentrações menores ($0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$), em comparação com a mesma concentração de Ca(OH)_2 *in vitro* (314). Seu efeito deletério em fibroblastos do ligamento periodontal, também já foi relatado. Foi observada redução da proliferação destas células na presença da TAP, além do aumento expressivo na produção de IL-6, após 24 h de incubação (315). Outro estudo observou *ex vivo* em discos de dentina, a redução significativa de SCAPs na presença de 1 mg.mL^{-1} da TAP (8).

Pereira e colaboradores (312) descreveram os mecanismos celulares envolvendo a TAP. Neste estudo, foram introduzidos subcutaneamente em camundongos tubos de polietileno contendo TAP. Após 21 dias, os achados histológicos demonstraram que a TAP induziu uma inflamação exacerbada, resposta angiogênica, com maior número de células inflamatórias, maior área vascular em densidade e menor porcentagem relativa de colágeno em comparação com o grupo controle com PBS. Estes achados sugerem que TAP parece induzir a formação de novos vasos e ao mesmo tempo causar uma resposta inflamatória exacerbada.

2.3.3.2 Antimicrobianos usados na pasta tripla antibiótica

2.3.3.2.1 Ciprofloxacino

O ciprofloxacino (CIP), de fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{18}\text{FN}_3\text{O}_3$ e hidrofóbico pode ser considerado uma quinolona de segunda geração (316). As quinolonas começaram a ser comercializadas no início da década de 1960 com o objetivo de combater infecções causadas por microrganismos resistentes (317). A adição de um átomo de flúor na posição número 6 do anel quinolônico pode ser responsável pelo aumento do espectro de ação da classe farmacológica (318). O CIP pode inibir três enzimas presentes no citoplasma celular bacteriano: a DNA-girase, a topoisomera do tipo IIA e a topoisomerase IV (319). Essas enzimas podem ser indispensáveis para a replicação, transcrição e tradução do DNA bacteriano (320). Inicialmente, o fármaco possui atividade bacteriostática, contudo o desfecho do tratamento à base de

fluoroquinolonas se torna a morte bacteriana (321). Estudos demonstraram que a atividade bactericida das fluoroquinolonas está relacionada ao aumento das doses normalmente utilizadas e também à fragmentação do DNA bacteriano, causada pelas extremidades livres do complexo formado entre o fármaco e a enzima DNA-girase (322).

O CIP possui amplo espectro de ação, contudo pode ser mais eficaz contra bactérias Gram-negativas (318). Estudos demonstram que o desenvolvimento da resistência ao uso de fluoroquinolonas está correlacionado com a disseminação de bactérias produtoras de β -lactamases de amplo espectro (ESBLs), enzimas responsáveis pela destruição do anel β -lactâmico por meio de reação de hidrólise (80).

Uma vez que o uso de antimicrobianos β -lactâmicos pode ser ineficaz contra essas cepas, o uso de fluoroquinolonas aumentou consideravelmente nas últimas décadas (323). Conseqüentemente, têm-se notado um aumento das taxas de insucesso terapêutico relacionados ao uso de ciprofloxacino, até então considerado medicamento de escolha para tratamento de microrganismos multirresistentes (318). Em relação ao uso de ciprofloxacino na terapia endodôntica, este fármaco tem sido demonstrado o mais eficaz, quando comparado ao metronidazol e à minociclina, contra microrganismos prevalentes no sistema de canais radiculares (324). Um estudo demonstrou *in vitro* a redução no número de UFCs de *E. faecalis*, na presença de nanofibras com liberação controlada de ciprofloxacino (325). Uma associação de ciprofloxacino com $\text{Ca}(\text{OH})_2$ diminuiu drasticamente o biofilme em blocos de dentina infectados com *E. faecalis* (326).

2.3.3.2.2 Metronidazol

O metronidazol (MTZ), de fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ pode ser considerado o principal representante da classe farmacológica dos nitroimidazólicos (327). Possui um estreito espectro de ação, sendo efetivo apenas contra microrganismos anaeróbicos (328). O MTZ foi lançado em 1959 para o tratamento de tricomoníase, doença sexualmente transmissível causada pelo protozoário *Trichomonas vaginalis* (329). Além disso, o MTZ pode ser utilizado para o tratamento de outras doenças sexualmente transmissíveis como a sífilis, causada por cepas resistentes de

Treponema pallidum; tratamento de erradicação da *Helicobacter pylori*; e doenças parasitárias como a amebíase e a giardíase (329-331). Por ser um pró-fármaco, a molécula de MTZ precisa sofrer algumas transformações químicas ou enzimáticas *in vivo* para se transformar em uma molécula farmacologicamente ativa (328). Embora o completo mecanismo de ação do MTZ ainda não tenha sido elucidado, sugere-se que a produção de metabólitos ativos ocorre após o ataque enzimático bacteriano, pois a molécula inicial de MTZ possui propriedades antioxidantes (332).

Comumente, bactérias capazes de expressar bombas de efluxo podem resistentes ao uso de MTZ (74). Ao adentrar à célula bacteriana, o fármaco pode ser lançado para o ambiente externo antes de produzir qualquer efeito terapêutico (80). Existe uma correlação entre bactérias produtoras de biofilme e esse mecanismo de resistência (80). Este fármaco também pode ser utilizado para o tratamento de periodontite agressiva (333). No tratamento endodôntico, o MTZ está pode reduzir o biofilme de microrganismos comumente encontrados no SCRs de dentes necrosados (334). Porém, autores relacionaram *in vitro* o uso deste fármaco com a resistência de alguns gêneros de microrganismos presentes na pulpíte e necrose pulpar como: *Fusobacterium*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Parvimonas*, *Streptococcus*, *Treponema* e *Enterococcus* (335).

2.3.3.2.3 Minociclina

A minociclina (MNC), de fórmula molecular $C_{23}H_{27}N_3O_7$ pode ser considerada uma tetraciclina semi-sintética de segunda geração (62). As tetraciclinas podem ser originadas de peptídeos antimicrobianos produzidos por um fungo do gênero *Streptomyces*, descoberto por Benjamin Minge Duggar, em 1945 (336). A adição do grupo dimetilamina no carbono 7 da molécula pode ser responsável pelo aumento do espectro de ação da classe, a qual passou a ter maior efeito sobre bactérias Gram-negativas (336). As tetraciclinas podem ser fármacos bacteriostáticos capazes de se ligar à subunidade 30S do ribossomo, inibindo assim, a síntese de proteínas bacterianas (337). Essa subunidade ribossomal pode ser encontrada em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, por isso a MNC possui amplo espectro de ação (338).

O uso de MNC no sistema de canais radiculares pode causar o escurecimento dentinário. Essa relação se encontra bem estabelecida na literatura e constitui a maior crítica referente ao uso da minociclina em tratamentos endodônticos (233). Nagata e colaboradores observaram que o uso da minociclina como medicação intracanal em procedimentos de revascularização pulpar provocou a descoloração da dentina em 85,71% dos dentes tratados (9). Além disso, o grau de escurecimento pode ser diretamente proporcional ao tempo de exposição à minociclina (312).

A pasta dupla antibiótica (DAP) foi sugerida por Iwaya em 2001 (216). Esta pode ser composta por partes iguais de MTZ e CIP e seu uso foi proposto a partir de críticas referentes ao emprego da TAP, relacionadas ao manchamento da dentina (308). Análises espectrofotométricas de dentes tratados com a DAP comprovam que não há alterações da cor da dentina de pacientes tratados com essa combinação de antimicrobianos (309). Além disso, a DAP se apresentou tão eficaz quanto a TAP na redução de biofilme de *E. faecalis* (308).

Outras medicações intracanaís para a revascularização vem sendo sugeridas, como a utilização de uma associação de Ca(OH)_2 e clorexidina gel 2% (9). Um relato de caso que utilizou a associação de Ca(OH)_2 e clorexidina a 2% demonstrou o fechamento apical e o aumento da espessura das paredes de dentina, observadas por tomografia computadorizada. Após o acompanhamento de 2 anos, não houve calcificação pulpar (339). A medicação intracanal ideal para revascularização deve reduzir ao máximo o número de microrganismos, controlar a inflamação local e estimular o reparo tecidual (340). Em busca de novas biomoléculas, peptídeos de defesa do hospedeiro podem surgir como uma nova opção para a endodontia e especialmente para os processos de revascularização pulpar.

2.4 PEPTÍDEOS DE DEFESA DO HOSPEDEIRO

Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) podem ser considerados antibióticos naturais produzidos por animais, plantas, protozoários, fungos e bactérias contra antígenos (341). Este tipo de biomolécula pode apresentar estrutura anfipática ou catiônica com várias funções, uma vez que podem ser liberados em condições inflamatórias (342). Tais biomoléculas atuam sobre mecanismos de defesa do

hospedeiro, principalmente na imunidade inata (343). Seu potencial biotecnológico tem sido estudado como forma de modular a resposta a infecções, patologias e regeneração de tecidos, além de possuir um amplo espectro contra microrganismos (344). Desta forma, estas biomoléculas podem ser adotadas como novas possibilidades farmacológicas em muitas áreas de saúde (345).

A resistência aos antibióticos encontrados no mercado pode ser um problema mundial, uma vez que muitos microrganismos, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, podem ser responsáveis por muitas mortes causadas principalmente por infecções nosocomiais (346). Como possibilidades favoráveis, os pesquisadores têm estudado o uso de PDHs não apenas contra patógenos suscetíveis, mas também contra bactérias e fungos persistentes (347, 348).

Os PDHs humanos podem ser encontrados na saliva, como a catelicidina LL-37 ou nos interstícios dos tecidos, tais como as β -defensinas humanas (HBDs). A catelicidina LL-37 contém 37 aminoácidos, pode ser produzida por neutrófilos e pode ser encontrada no epitélio escamoso oral, na saliva e no fluido gengival (349). A LL-37 pode apresentar ação antimicrobiana, imunomodulatória ou regenerativa (350). As HBDs podem ser moléculas catiônicas produzidas em membranas mucosas (351). Estas podem ser ricas em cisteínas e têm um amplo espectro (352). Estas moléculas podem ser exacerbadas durante a imunidade inata contra infecções (353). Um estudo demonstrou que os pacientes com periodontite grave apresentaram um aumento dos níveis séricos de HBD1, HBD2 e HBD3 (354).

Além dos peptídeos antimicrobianos naturais produzidos por seres humanos e outros seres vivos, serem eficazes na imunidade inata, os peptídeos sintéticos estão se tornando mais populares em estudos científicos (355). Este fato se justifica pela capacidade de produzir modificações em suas sequências, aumentando sua capacidade antimicrobiana, imunomodulatória, ou até mesmo melhorar sua resistência contra degradação (356). Eles também podem ser expressos em outros organismos, através das técnicas de expressão heteróloga, permitindo diversas alternativas para as aplicações biotecnológicas destas biomoléculas (357).

O mecanismo de ação dos PDHs ainda não foi totalmente elucidado. Os modelos aceitos relataram interferência intracelular e extracelular (358). Foi relatada a interação de peptídeos com membranas fosfolipídicas de microrganismos, principalmente relacionadas a propriedades bioquímicas definidas pela sequência de aminoácidos (estrutura de carga anfipática e hidrofobicidade) através de uma camada

de adelgaçamento local por expansão da membrana externa (359). Além disso, outros estudos discutem sobre a possibilidade de formação de canais, poros ou rachaduras estendidas na membrana (360).

Há outros trabalhos ainda, que relataram a ação antimicrobiana dos peptídeos com sua carga positiva e sua característica hidrofóbica. O primeiro aspecto estaria relacionado com a interação eletrostática destes com a membrana plasmática de microrganismos carregadas negativamente, e o segundo, pela interação de seus resíduos hidrofóbicos com os lipídeos presentes na membrana plasmática (361, 362). Algumas alterações e interações entre ácidos nucleicos e proteínas fosforiladas também podem ocorrer devido às suas características catiônicas (363).

Pesquisas recentes conectaram a ação de PDHs com a membrana plasmática, chamando este mecanismo de forma de barril (*barrel steve*) que permite tal extravasamento mediante interação com canais seletivos de íons (364). Os PDHs também podem atuar em forma tapete (*carpet*), onde penetram na membrana fosfolipídica formando um tapete e promovendo sua desestabilização (365). Há também alguns estudos que sugerem o mecanismo de formação de poros toroidal, onde os peptídeos estão associados com hélices de membranas de fosfolipídeos (366). Ademais, no mecanismo de ação conhecido como detergente, os peptídeos podem causar ruptura das camadas e consequente perda de íons (345). Alguns estudos consideram a ação de PDHs em enzimas, transcrição de genes e síntese de DNA (367).

Em relação aos PDHs no ambiente endodôntico, alguns peptídeos possuem ação contra microrganismos causadores da cárie e também microrganismos relacionados com as patologias pulpares (368). Estudos demonstram o potencial de HBDs contra patógenos causadores da pulpíte, como: *E. faecalis*, *F. nucleatum* e *T. forsythia* (369, 370). A capacidade antimicrobiana da catelicidina LL-37 também foi relatada contra microrganismos prevalentes na pulpíte como *T. denticola*, *E. faecalis*, *P. gingivalis*, *T. forsythia* e *E. corrodens* (371, 372). Alguns peptídeos sintéticos também podem reduzir o biofilme de bactérias comumente encontradas no SCR (373). Um estudo demonstrou a diminuição de 85% no biofilme de *S. mutans* e *E. faecalis* na presença de 10 µg.mL⁻¹ de DJK-5, um peptídeo sintético D-enantiomérico (374). O uso de PDHs em DPIs para os processos de revascularização pulpar ainda não foram relatados.

No que se refere o papel de peptídeos antimicrobianos e sua atuação no sistema imune, estes podem atuar interagindo com TLRs, ou mesmo desencadeando vias de sinalização específicas de células do sistema imune adaptativo ou inato ou até mesmo ativando as cascatas do sistema do complemento (375). Embora seu efeito sobre o sistema imunológico esteja sendo estudado, ainda não há consenso elucidado como estas moléculas podem ser capazes de modular a resposta imune (376). No entanto, um ponto importante a ser discutido neste contexto pode ser a baixa citotoxicidade de PDHs. Muitos estudos *in vitro* demonstram que as concentrações antimicrobianas não apresentam graus significativos de citotoxicidade (377, 378).

Em suma, pode ser extremamente importante compreender não apenas os mecanismos-alvos da sua ação antimicrobiana, mas também os seus mecanismos celulares e moleculares nas células alvo. Assim, se torna possível considerar o potencial biotecnológico e farmacêutico destas biomoléculas, incluindo antimicrobianos, imunomoduladores, regenerativos ou a soma destas funções. Diante disso, os peptídeos descritos abaixo foram os escolhidos para este trabalho por apresentarem tanto ação sobre diversos microrganismos, quanto ação imunomodulatória.

2.4.1 DJK-6

O peptídeo DJK-6 (VQWRRIRVWVIR) foi descrito pela primeira vez em fevereiro de 2015 e possui 12 resíduos de aminoácidos (11). Apesar de poucos trabalhos publicados com este peptídeo, este D-enantiômero foi desenvolvido para aumentar a resistência as enzimas produzidas pelo hospedeiro na presença de peptídeos anti-biofilmes, que possuem estrutura L-enantiômera (11). Assim, com a mesma ação antimicrobiana, foi possível construir uma biomolécula mais resistente à degradação enzimática (11). O DJK-6 e seu similar DJK-5, apresentaram ação bactericida contra diversas espécies resistentes, como *A. baumani* e *K. pneumoniae* advindas de isolados clínicos, além de reduzir o biofilme de bactérias Gram-negativas como *P. aeruginosa* (11, 379). Pela ação direta antimicrobiana em biofilmes de microrganismos resistentes, este peptídeo foi selecionado para este trabalho.

2.4.2 Peptídeo regulador da defesa inata 1018 (IDR-1018)

O IDR-1018 (VRLIVAVRIWRRNH₂) pode ser considerado um pequeno peptídeo sintético derivado de uma bactericina bovina Bac2a (380). Foi desenvolvido para ter atividade imunomodulatória (380). Vários estudos demonstraram a ação deste peptídeo em células do sistema imune e na regulação de citocinas (381). Este peptídeo apresenta capacidade de modular a resposta dos neutrófilos, assim como, estimular a adesão de neutrófilos e também, aumentar a expressão de moléculas de adesão tais como ICAM-1, CD11b e CD62L e os marcadores de ativação como CD64, CD18 e CD66b (12). Este peptídeo demonstrou atividade antimicrobiana em *E. coli* na concentração de 25 µg.mL⁻¹ (382). Outro estudo demonstrou a relação do peptídeo com a diferenciação de macrófagos M2. Os macrófagos desempenham um papel fundamental na resposta imunológica e diferenciação destas células em M1 ou M2, pode determinar uma resposta em maior ou menor grau. Neste estudo, o perfil de citocinas produzido pelos macrófagos M2 foi aumentado na presença deste peptídeo (383). Ademais, o IDR-1018 apresenta a capacidade de aumentar a taxa de cicatrização de feridas e tal mecanismo de ação ainda não foi descoberto, mas pode estar relacionado com a sua ação sobre o sistema imunológico adaptativo e reparação de tecidos (384). Além de sua capacidade imunomodulatória, o IDR-1018 também apresenta uma atividade antimicrobiana. Este peptídeo demonstrou atividade em vários microrganismos, incluindo alguns mutiresistentes como *P. aeruginosa*, *E. coli*, *Acinetobacter baumannii*, *K. pneumoniae*, *S. aureus* resistente à metilina, *Salmonella typhimurium* e *Burkholderia cenocepacia* (382). Diante sua ação antimicrobiana e de indução de reparo tecidual, este peptídeo foi selecionado para este trabalho, uma vez que o controle do biofilme, a redução dos microrganismos e a ativação de macrófagos M2 podem ser essenciais para o reparo tecidual em DPLs, no intuito de promover a revascularização pulpar.

2.4.3 Peptídeo regulador da imunidade inata 1002 (IDR-1002)

O peptídeo IDR 1002 (VQRWLIVWRIRKNH₂) pode ser caracterizado como um pequeno peptídeo sintético composto por 12 resíduos de aminoácidos que assim como o peptídeo IDR-1018, apresenta tanto ação antimicrobiana quanto imunomoduladora (385). A ação do IDR-1002 está principalmente relacionada com a ativação do sistema imune diante processos infecciosos (386). No primeiro relato de estudo com este peptídeo, este estimulou a produção de CXCL1, CXCL8 e CCL2 em leucócitos murinos e conferiu proteção contra infecções por *Echerichia coli* (385). Além disso, esta biomolécula apresentou ação antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (387). Ademais, o IDR-1002 foi relacionado ao recrutamento de neutrófilos e o aumento da degranulação de neutrófilos na presença de LPS, assim como na liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas por estas células, além das citocinas TNF- α e IL-10 (12). A ação do IDR-1002 em neutrófilos pode estar associada à via de sinalização MAPk (12). Além disso, este peptídeo está relacionado com a quimiotaxia de monócitos, uma vez que aumenta a quimioatração celular diante das citocinas CCL3 e CCL5 (388). O potencial receptor para o IDR-1002 em macrófagos e monócitos pode ser o CCR5 (388). Apesar deste peptídeo apresentar atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, prevalente em patologias pulpares, não foram realizados estudos envolvendo outros microrganismos prevalentes nas patologias pulpares. Frente a sua importante ação imunomodulatória nos processos de proteção dos tecidos contra a ação de microrganismos, este peptídeo foi escolhido como peptídeo candidato para os testes antimicrobianos, citotóxicos e imunomodulatórios na construção de um modelo de infecção endodôntica *in vitro*.

2.4.4 LL-37

A LL-37 pode ser considerada a catelicidina mais amplamente estudada, sendo esta oriunda da proteína hCAP-18, após sua liberação por neutrófilos e clivagem por proteinase (389). A LL-37 pode ser caracterizada como um peptídeo catiônico e pode ser encontrada em epitélio escamoso oral não queratinizado, em células epiteliais

secretoras, no fluído gengival, no exsudato de sulco gengival e na saliva humana, a partir de sua liberação homeostática por meio da degranulação de neutrófilos (390). Tal peptídeo possui atividade microbicida de amplo espectro, atingindo bactérias (Gram-positivas e negativas), fungos e vírus (391). Dentre as Gram-positivas, tem-se: *Streptococcus spp*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *Listeria monocytogenes*, *E. faecium*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* (392). Dentre as Gram-negativas, tem-se: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella minnesota*, *B. cepacia*, *Capnocytophaga ochracea*, *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Proteus vulgaris*, *Capnocytophaga sputigena*, *P. gingivalis* e *Salmonella enterica dublin* (393). Seu efeito abrange ainda espiroquetas (*Leptospira interrogans*, *Borrelia spp.*, *Treponema pallidum*) (394), o fungo *C. albicans* (395) e o vírus *influenza* (396).

Além da atividade microbicida, a LL-37 apresenta importantes funções adicionais na defesa do hospedeiro, incluindo: quimiotaxia e modulação da resposta, indução do recrutamento de neutrófilos, monócitos, células T e mastócitos, liberação de IL-8, sinal de transdução, aumento na secreção de proteínas e cicatrização de feridas (397-399). Desta forma, o peptídeo LL-37 foi selecionado como peptídeo controle por ser uma catelecidina natural humana com efeito antimicrobiano e imunomodulatório previamente descrito.

A odontologia atual preconiza a filosofia da mínima intervenção e máxima preservação, sendo tais ideias estendidas também à área endodôntica. A engenharia tecidual e a biologia molecular podem contribuir para a regeneração tecidual e conduzir novas alternativas terapêuticas de revascularização pulpar, guiadas por arcabouços que podem estimular a formação de um novo tecido. Frente à causa de insucessos com antibióticos usados na revascularização, PDHs podem surgir como opção para a terapia endodôntica, uma vez que possuem atividade antimicrobiana e imunomodulatória, podendo proporcionar o reparo tecidual em DPIs.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Determinar a capacidade antimicrobiana, citotóxica e imunomodulatória de peptídeos sintéticos em comparação com as pastas DAP e TAP, em um modelo de infecção *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) e bactericida mínima (CBM) dos peptídeos (DJK-6, LL-37, IDR-1018 e IDR-1002), em comparação com as pastas (DAP e TAP) contra as bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*.
- Avaliar a combinação do peptídeo IDR-1002 e o antibiótico ciprofloxacino contra as bactérias *S. aureus* e *E. faecalis*.
- Avaliar a viabilidade celular e a produção de NO, em linhagens de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929, nas concentrações clínicas das pastas DAP e TAP, em comparação com os valores de CIM e CBM encontrados.
- Avaliar a viabilidade celular e a produção de NO em diferentes concentrações de antígenos mortos pelo calor (*heat - killed* – HK) de *S. aureus* e *E. faecalis* em culturas de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929.
- Avaliar a viabilidade celular de RAW 264.7 e L929 na presença das pastas DAP e TAP, do antibiótico ciprofloxacino, dos peptídeos LL-37 e IDR-1002 e da associação de ciprofloxacino e IDR-1002, estimulados com ou sem *HK-S. aureus* ou *HK-E. faecalis* com IFN- γ .
- Avaliar a produção das citocinas IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-12, IL-10 e o mediador NO, em células RAW 264.7, na presença das pastas DAP e TAP, do antibiótico ciprofloxacino, dos peptídeos LL-37 e IDR-1002 e da associação de

ciprofloxacino e IDR-1002, estimulados com ou sem *HK-S. aureus* ou *HK-E. faecalis* com IFN- γ .

- Avaliação da produção das citocina IL-6 e o mediador NO, em células L929, na presença das pastas DAP e TAP, do antibiótico ciprofloxacino, dos peptídeos LL-37 e IDR-1002 e da associação de ciprofloxacino e IDR-1002, estimulados com ou sem *HK-S. aureus* ou *HK-E. faecalis* com IFN- γ .

4 MÉTODOS

4.1 DELINIAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho consistiu em um estudo do potencial de peptídeos de defesa do hospedeiro em um modelo de infecção endodôntica *in vitro*, sendo avaliadas suas capacidades antimicrobianas (dos peptídeos IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 e LL-37), citotóxicas (do peptídeo IDR-1002 e LL-37) e imunomoduladoras (do peptídeo IDR-1002 e LL-37), em comparação com as medicações padrões-ouro utilizadas em terapias de revascularização pulpar (pasta tripla e dupla antibiótica). Desta forma, trabalho foi dividido em 3 etapas, conforme descrito na figura 3.

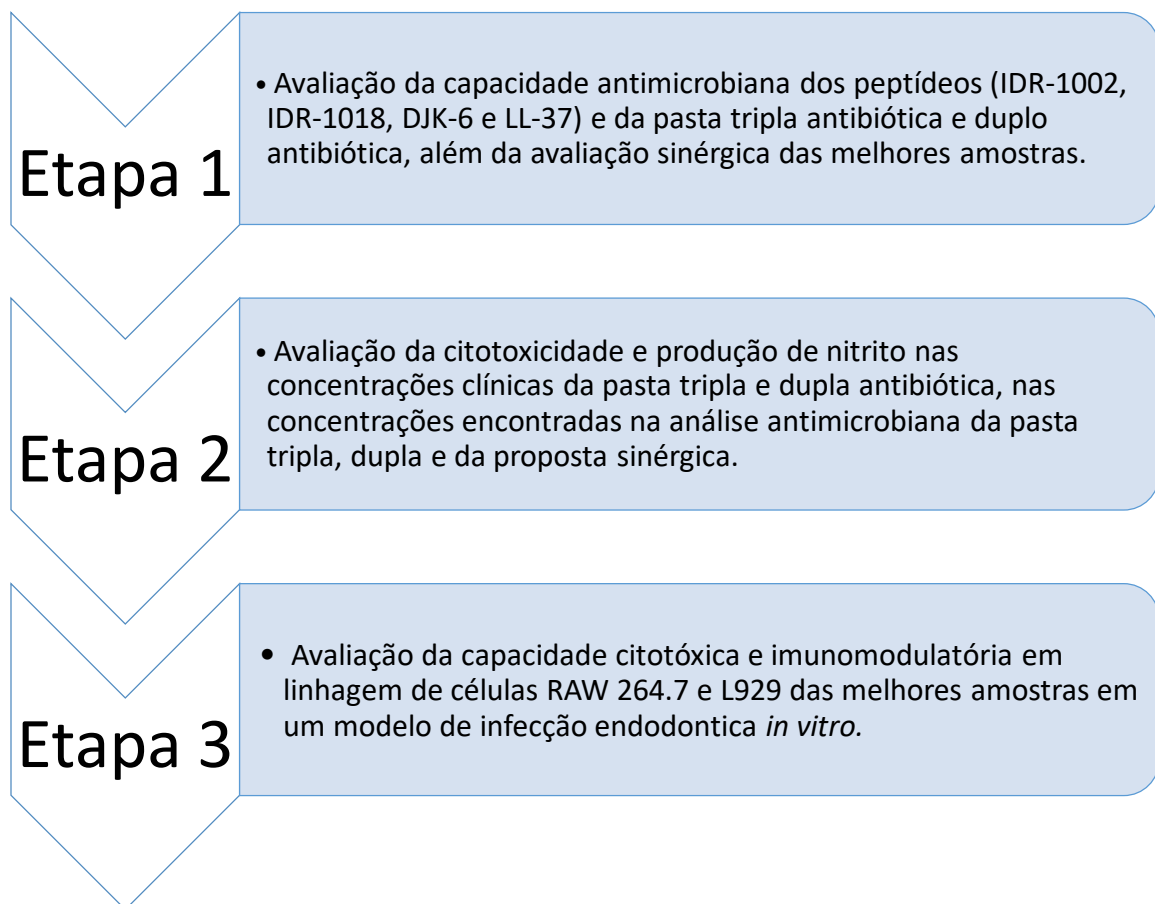


Figura - 3 Fluxograma das etapas desenvolvidas no trabalho.

4.2 OBTENÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E IMUNOMODULADORES (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 E LL-37)

Os peptídeos utilizados foram sintetizados, purificados (>95%), liofilizados e armazenados pela *Peptide 2.0 Inc.* (EUA) e *AminoTech* Pesquisa e Desenvolvimento (Brasil). A síntese foi realizada em fase sólida a partir da metodologia F-moc (400). Antes dos experimentos, foi realizada confirmação da massa molecular e pureza destes via espectrometria de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-ToF). Os peptídeos foram diluídos em água ultrapura e analisados em matriz (ácido saturado α -ciano-4-hidroxicinâmico, preparado com 50 μ L de ácido trifluoroacético à 3%, acetonitrila 100% e 200 μ L de água ultrapura), no volume de 1:3. A massa molecular foi determinada via MALDI-ToF *Ultra Flex III* (Bruker Daltonics, Billerica, MA). A massa mono isotópica foi obtida a partir de espectrometria de massa (Bruker Daltonics, Billerica, MA), utilizando o método de operação refletido e positivo de 700 a 3500 Da, com calibração externa (anexo A).

4.3 ARMAZENAMENTO E QUANTIFICAÇÃO DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E IMUNOMODULADORES (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 E LL-37)

Uma vez que o espectro da massa de alguns peptídeos tenha detectado impurezas, com a presença de íons não compatíveis com o peptídeo ou íons compatíveis com degradação, o peptídeo foi submetido à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (RT-HPLC). Para tal, o peptídeo foi solubilizado em água ultrapura (500 μ g) e submetido à coluna semi preparativa C18 (NST, 5 μ m, 250 mm x 10 mm), sendo eluído com um gradiente linear de acetonitrila (5-95%) por 60 min, a um fluxo de 2,5 mL.min⁻¹. As frações, monitoradas à 216 nm, foram coletadas e liofilizadas. Após a purificação, a amostra foi novamente analisada por MALDI-ToF. Para os experimentos, os peptídeos foram

diluídos em água ultrapura e quantificados pela absorção de UV a 205, 215 e 225 nm utilizando a fórmula de concentração (401):

$$A = (A_{215} - A_{225}) \times 144$$

$$B = (A_{205}) \times 31$$

$$A+B/2 = \mu\text{g.mL}^{-1}$$

Os peptídeos foram armazenados a -20°C até o uso.

4.4 OBTENÇÃO DOS ANTIMICROBIANOS DAS PASTAS UTILIZADAS EM REVASCULARIZAÇÃO PULPAR

Os antimicrobianos ciprofloxacino (CIP), metronidazol (MET), e minociclina (MNC) foram obtidos pela indústria multinacional Sigma Aldrich® (padrão farmacopéia européia). O CIP, o MET e a MNC foram misturados na proporção 1:1:1 em água Milli-Q autoclavada, para o preparo da pasta tripla antibiótica (TAP), segundo descrito por Hoshino (227). O CIP e o MTZ foram misturados na proporção 1:1 para a preparação da pasta dupla antibiótica (DAP), descrita por Iwaya (216). A diluição dos antimicrobianos aconteceu no momento da realização de cada experimento. A ampicilina (Sigma Aldrich®) foi usada como controle positivo para os ensaios antimicrobianos (402).

4.5 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS, DAS PASTAS UTILIZADAS PARA REVASCULARIZAÇÃO PULPAR E DOS ANTIMICROBIANOS PRESENTES NAS PASTAS ISOLADAMENTE

A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos antimicrobianos CIP, MET e MNC e quando combinados em TAP ou DAP e dos peptídeos antimicrobianos (IDR-1018, IDR-1002, DJK-6 e LL-37) foram

determinadas utilizando o método de microdiluição e macrodiluição em caldo, respectivamente, de acordo com a M7-A6 do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (402). Os bioensaios bacterianos foram realizados contra *E. faecalis* (ATCC 19433) e *S. aureus* (ATCC 25923). Os experimentos foram realizados de acordo com a fase logarítmica das curvas de crescimento, pré-determinadas, segundo anexo B. As bactérias foram pré-inoculadas a partir de uma colônia em 5 mL de meio Luria Bertani (LB, Sigma aldrich, EUA) e incubadas até que alcançassem a absorbância de 0,50 – 0,65 a 595 nm. Nesta absorbância, foi considerada uma concentração de 1×10^{12} UFCs.mL⁻¹ para *E. faecalis* e $2,9 \times 10^8$ UFCs.mL⁻¹ para *S. aureus*. Desta forma, com os pré-inóculos em fase logarítmica, os bioensaios antibacterianos foram realizados em meio Luria Bertnani (LB, Sigma aldrich, EUA) com a concentração de 5×10^4 UFC por poço, com um intervalo de concentrações das amostras a serem testadas. Os intervalos das concentrações testadas para determinação de uma concentração inibitória mínima foram de 2 a 256 µg.mL⁻¹ para os peptídeos (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 e LL-37) e de 0,025 a 256 µg.mL⁻¹ para os antimicrobianos de TAP e DAP isolados ou juntos. Além das amostras a serem testadas, foram utilizados 3 controles neste bioensaio: 1 - células bacterianas e meio de cultura (100% de crescimento bacteriano); 2 - células bacterianas, ampicilina na concentração de 20 µg.mL⁻¹ para *E. faecalis* e 4 µg.mL⁻¹ para *S. aureus* e meio de cultura (100% de inibição do crescimento bacteriano); e 3 - meio de cultura sem bactéria e sem amostras (branco). Os grupos foram preparados em triplicatas biológicas e triplicata técnica em placas de cultura de 96 poços (TPP, EUA) incubada por 12 h, a 37 °C, sob agitação média em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), com leituras a cada 30 min, a 595 nm. A CIM ou CBM foram determinadas a partir do crescimento microbiano nos pontos da metade da fase logarítmica curvas de crescimento realizadas previamente (abs 0,50 – 0,65), comparados aos controles positivo e negativo. Por fim, todas as concentrações das amostras testadas foram inoculadas por microgota em meio sólido para confirmação de atividade bactericida ou bacteriostática.

4.6 AVALIAÇÃO DA COMBINAÇÃO SINÉRGICA DO PEPTÍDEO IDR-1002 E O ANTIMICROBIANO CIPROFLOXACINO

Baseando-se nos melhores resultados de CIM e CBM dos antimicrobianos isolados ou combinados de DAP ou TAP (metronidazol e ciprofloxacino) e dos peptídeos previamente testados (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 e LL-37) contra *E. faecalis* e *S. aureus* uma avaliação da capacidade combinada de IDR-1002 e ciprofloxacino foi realizada, utilizando o método do tabuleiro xadrez (PILLAI 2005), com adaptações (403). A associação entre o peptídeo IDR-1002 e ciprofloxacino foi realizada em diferentes concentrações. O ensaio de susceptibilidade foi desenvolvido pelo método de microdiluição, de acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2009). As diluições dos peptídeos utilizados nestes experimentos foram baseadas no CIM de cada peptídeo isoladamente. Inicialmente foram preparadas diluições dos peptídeos em concentrações 2X maiores que a concentração desejada em água Milli-Q autoclavada. Posteriormente, 10 µL de cada concentração da série de diluição de IDR-1002 foram combinados com 10 µL de cada concentração de uma série de diluição do ciprofloxacino. Em cada poço da microplaca foi adicionado 80 µL da suspensão bacteriana (5×10^4 UFC) de *E. faecalis* (ATCC 19433) e *S. aureus* (ATCC 25923) em sua fase logarítima. O crescimento bacteriano foi observado após a incubação por 12 h, a 37 °C, sob agitação média em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), com leituras a cada 30 min, a 595. A partir dos valores das médias das absorvâncias a concentração inibitória fracional (ICIF) foi calculada de acordo com a equação abaixo:

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM (1 em combinação com 2)}}{\text{CIM de 1} + \frac{\text{CIM (2 em combinação com 1)}}{\text{CIM de 2}}}$$

O ICIF foi interpretado da seguinte forma:

- ICIF ≤ 0,5: ação sinérgica;
- ICIF > 0,50 e < 1,0: ação aditiva;
- ICIF > 1,0 e ≤ 4: indiferente;
- ICIF ≥ 4: ação antagônica.

4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E RESPOSTA IMUNE DE TAP, DAP, DO CIPROFLOXACINO, DO PEPTÍDEOS IDR-1002 E LL-37 E DA ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA DE IDR-1002 E CIPROFLOXACINO

4.7.1 Culturas celulares e grupos experimentais das etapas 2 e 3

Para a construção de um modelo de infecção endodôntica *in vitro*, foram utilizadas duas linhagens celulares: um monócito (RAW 264.7), representando uma célula do sistema imune inato e um fibroblasto (L929), representando uma célula de reparo tecidual. A linhagem de células RAW 264.7 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (CR108). Estas células são macrófagos precursores de osteoclastos, derivados de tumores induzidos em camundongos machos BALB/c infectados com o vírus da leucemia murina de Abelson (404). A linhagem de fibroblastos L929 foi obtida pela *American Type Culture Collection* (ATCC 929, Manassas, VA, USA). Estas células são fibroblastos oriundos de murinos *Mus musculus* (405). Ambas células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, EUA), suplementado com 10% de soro bovino fetal (Gibco, EUA), 0,5% de solução de aminoácidos MEM (Gibco, EUA) e em estufa contendo 5% de CO₂, a 37°C e 95% de umidade (406). As culturas celulares de RAW 264.7 e L929 (1x10⁵ células por poço) foram submetidas a diversos estímulos, sendo que na fase 2, os testes de nitrito e MTT determinaram os grupos que avançaram para a etapa 3. Na etapa 2 (figura 4), ambas as células foram estimuladas com as concentrações clínicas de TAP 75 µg.mL⁻¹ e DAP 75 µg.mL⁻¹ em comparação com as CIM encontradas nos experimentos antimicrobianos e de avaliação do sinergismo, previamente realizados (216, 227). As concentrações clínicas de 75 de DAP e TAP, foram utilizadas como parâmetro de comparação de viabilidade celular e produção de nitrito com os achados deste estudo, e não avançaram para etapa subsequente (etapa 3, figura 4). Além disso, a menor concentração da combinação sinérgica de IDR-1002 com CIP (16 µg.mL⁻¹ + 0,015 µg.mL⁻¹), encontrada para *E. faecalis*, não prosseguiu para os experimentos posteriores, uma vez que não apresentou diferença estatística em relação à concentração antimicrobiana para *S. aureus* (32 µg.mL⁻¹ + 0,015 µg.mL⁻¹).

Os grupos experimentais desenhados para este estudo se assemelham a um modelo de infecção experimental *in vitro*, pela presença do recombinante (r) da citocina pró-inflamatória IFN- γ (10 U por poço, Peprotech, EUA) e dos antígenos microbianos mortos pelo calor (1×10^6 UFC por poço). Além disso, o LPS ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, EUA), foi utilizado como controle, por ser um antígeno pró-inflamatório conhecido, e abundante nas infecções endodônticas. Ademais, os mecanismos imunomoduladores do LPS são mais claros e estabelecidos que o ácido lipotecóico (LTA), presente nas bactérias estudadas (407). Para a etapa 3 (figura 4), a proposta foi avaliar a capacidade de reduzir a resposta pró-inflamatória frente aos antígenos testados pela nova proposta terapêutica.

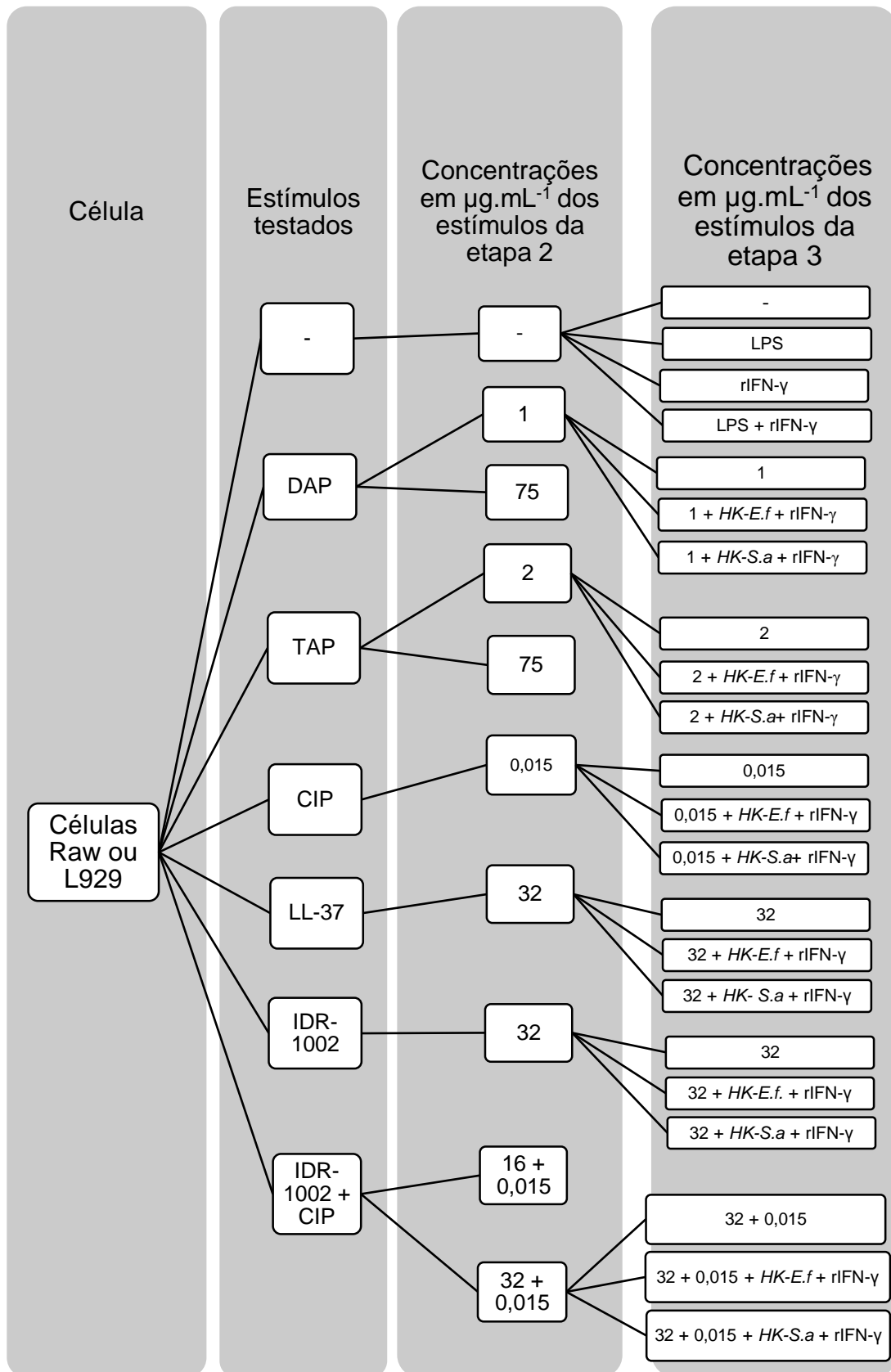


Figura 4 - Etapas experimentais e grupos testados

4.7.2 Preparo e teste dos antígenos microbianos mortos pelo calor

Os grupos experimentais desenhados para os experimentos de citotoxicidade e imunomodulação envolveram a estimulação celular com antígenos mortos pelo calor (*HK - Heat Killed*). Os antígenos foram preparados a partir dos mesmos microrganismos utilizados nos ensaios antimicrobianos: *E. faecalis* (ATCC 19433) e *S. aureus* (ATCC 25923). A preparação destes envolveu a coleta de colônias recém repicadas que foram ressuspensas em tampão PBS (separadamente) e quantificadas por D.O.. Posteriormente, estes foram aquecidos a 121 °C, durante 50 min e posteriormente armazenados a -20 °C. A morte destes microrganismos foi confirmada a partir de inoculação de uma alíquota de cada antígeno em meio líquido e nova incubação por 24 h (135). Os antígenos foram testados previamente à execução dos ensaios de citotoxicidade e imunomodulação. Este teste avaliou a quantidade de antígenos que seriam suficientes para estimular a resposta das células pré-osteoclásticas RAW 264.7 e fibroblastos L929 por meio da produção de nitrito, após 72h de incubação. Em adição, foi avaliada a viabilidade celular na presença das diferentes concentrações de antígenos (10^5 a 10^8 UFCs). Nesta situação, os melhores estímulos para os experimentos posteriores foi o de 10^6 UFCs para *HK-E. faecalis* e *HK-S. aureus*, em ambas as células na presença do recombinante rIFN- γ . O LPS ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Sigma-Aldrich, EUA), foi utilizado como controle antigênico pró-inflamatório para os estímulos em células RAW 264.7 e L929. Para avaliar o comportamento morfológico destas células frente aos antígenos HK de *E. faecalis* e *S. aureus*, imagens de microscopia de luz foram obtidas após os tempos experimentais de 0 e 72h de incubação.

4.7.3 Avaliação da citotoxicidade dos peptídeos, de DAP e TAP e da associação sinérgica de IDR-1002 e ciprofloxacino

O ensaio de viabilidade celular para a análise citotóxica foi realizado após 24 e 72 h para as células RAW 264.7 e após 48 e 72 h, para as células L929. As placas foram incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade nas etapas 2 e 3 deste

trabalho. Os grupos controles deste experimento foram representados por poços com 1 - células e meio de cultura, representando 100% de viabilidade celular; 2 - células, meio de cultura e solução de lise (10 mM Tris, pH 7,4, 1 mM EDTA e 0,1% triton X-100) (408) representando 0% de viabilidade celular; e 3 - meio de cultura (branco). Ao final dos períodos experimentais, foi utilizado o ensaio colorimétrico MTT (Sigma Chemicals Co., St. Louis, EUA). O MTT consiste em um método colorimétrico baseado na capacidade das células vivas de reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo no produto formazan (409). Após o período de incubação, todo o sobrenadante foi removido e foram adicionados 45 µL de meio DMEM por poço. Foi acrescentado 10 µL de MTT (50 µg por poço) e as placas de cultura (TPP, EUA) foram incubadas por 3 – 4h, a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade. A reação foi bloqueada com 60 µL por poço de dimetilsulfóxido com posterior homogeneização de cada poço para completa solubilização do produto celular. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas (Bio-Tek PowerWave HT, EUA), à 595 nm.

4.7.4 Avaliação da atividade imunomodulatória dos peptídeos, DAP, TAP e sinergismo (IDR-1002 e ciprofloxacino)

Os ensaios para avaliação da resposta imune seguiram os mesmos grupos de estudo já descritos (Figura 4). Após os períodos experimentais de 24, 48 e 72 h, o sobrenadante das culturas com diferentes estímulos foi coletado. A partir deste sobrenadante, foram realizadas as dosagens de óxido nítrico em RAW 264.7 e L929, das citocinas: TNF- α , IL-12, IL-6, IL-1 α e IL-10 (em culturas de células RAW 264.7) e IL-6 (em culturas de fibroblastos L929).

4.7.4.1 Dosagem de citocinas por Enzyme-Liked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

A partir do sobrenadante das culturas de células RAW 264.7 incubadas no período 24h e 72h, foi avaliada a produção de TNF- α , IL-12, IL-6, IL-1 α e IL-10. As

produção de IL-1 α , IL-6, IL-12 e TNF- α foram avaliadas após 24 h, enquanto a produção de IL-10 foi avaliada após 72 h de incubação, sendo os tempos experimentais baseados na literatura (135, 410). A partir do sobrenadante de células L929, foi avaliada a produção de IL-6, após 48h de incubação, sendo este tempo experimental escolhido baseado em dados prévios desta citocina produzida por estas células (411). As concentrações destas citocinas foram determinadas pelo método de *Enzyme-Liked Immunoabsorbent Assay* (ELISA), utilizando os respectivos *murine ELISA development kit* (Peprotech, New Jersey, EUA), seguindo-se as especificações do fabricante, nos sobrenadantes obtidos em diferentes períodos de cultura. Os níveis de citocinas foram expressos em picogramas por mililitro (pg.mL⁻¹), após comparação com curva padrão proposta pelo kit de ELISA utilizado de acordo com as especificações do fabricante: IL-6 (0,2-4 ng.mL⁻¹), IL-10 (0,25-3 ng.mL⁻¹) e TNF- α , IL-1 α e IL-12 (0,2-2 ng.mL⁻¹) (412).

4.7.4.2 Dosagem de óxido nítrico (NO)

A dosagem de óxido nítrico constituiu outro parâmetro analisado neste estudo. A partir da mesma cultura realizada no experimento de viabilidade celular, com diversas concentrações das amostras e antígenos, o sobrenadante de 72 h foi coletado para avaliação dos níveis de nitrito em ambas células (RAW 264.7 e L929). A produção de nitrito nos sobrenadantes das culturas foi avaliada pelo método de Green (413) com adaptações. Foram transferidos 100 μ L dos sobrenadantes de cultura para placas de 96 poços (TPP, EUA), acrescidos de 100 μ L de DMEM (Gibco, EUA) suplementado nos poços da curva padrão de nitrito de sódio. Em seguida, foram adicionados 100 μ L de uma solução de sulfanilamida a 1% em ácido fosfórico 2,5% e naftiletilenodiamina 1% em ácido fosfórico 2,5%, na proporção de 1:1. Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, foi realizada leitura em leitor de microplacas (*Bio-Tek PowerWave HT*, EUA), a 490 nm. A quantidade de nitrito foi calculada a partir da equação da curva padrão de nitrito de sódio (1,5625 μ M a 200 μ M) (413).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram submetidos ao cálculo da média e desvio padrão para cada réplica biológica e em seguida foi realizado o cálculo da média e erro padrão das médias, como um indicativo de reprodutibilidade das réplicas. Em seguida foi realizada a verificação de normalidade das amostras (teste de *Kolmogorov Smirnov*) e posterior estatística paramétrica, mediante a análise de variância de um fator (*one-way ANOVA*), seguido do pós teste de Bonferroni. As análises foram consideradas a um intervalo de segurança de 95%, tendo um valor de $p < 0,05$. Estas análises foram estabelecidas nas 2 últimas etapas do trabalho. Na etapa 1, a partir dos ensaios de atividade antimicrobiana e sinergismo, os grupos foram comparados aos controles referentes a 100% e 0% de crescimento microbiano. Na etapa 2, esta análise estatística foi definidora para reduzir o número de grupos para a etapa final, terceira etapa do estudo. E na terceira etapa do estudo, esta análise estatística possibilitou uma análise mais ampla do comportamento de DAP ou TAP, dos peptídeos IDR-1002 e da LL-37, e o sinergismo (IDR-1002 com ciprofloxacino) em um modelo de infecção endodôntica *in vitro*. O peptídeo LL-37 foi utilizado como controle para a comparação do peptídeo IDR-1002, por ser conhecidamente descrito na literatura como peptídeo com ação imunomoduladora (414). A análise estatística foi realizada no *software GraphPadPrism 6*.

5 RESULTADOS

5.1 ETAPA 1: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA DOS PEPTÍDEOS (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 E LL-37) E DA TAP E DAP, ALÉM DO POTENCIAL SINÉRGICO DAS MELHORES AMOSTRAS

5.1.1 Avaliação da pureza dos peptídeos estudados e dos antimicrobianos de TAP e DAP

Os PDHs foram analisados quanto a sua pureza e massa molecular utilizando MALDI-ToF, de acordo com a Tabela 2 e (Anexo A). Os espectros de massa apresentados no anexo foram usados como referência para posteriores análises de outros lotes dos mesmos peptídeos.

Tabela 2 – Sequência molecular dos peptídeos LL-37, IDR-1002, IDR-1018 e DJK-6.

Peptídeo	Sequência	Massa molecular
LL-37	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRIKDFLRNLPRTES	4493,33
IDR-1002	VQRWLIVWRIRK-NH ₂	1652,24
IDR-1018	VRLIVAVRIWRR-NH ₂	1536,01
DJK-6	VQWRRIRVWVIR	1667,03

O grau de pureza (98%) dos antimicrobianos CIP, MTZ e MNC foi informado pela empresa Sigma Aldrich, seguindo os padrões de qualidade da farmacopéia européia (padrão de ref: 5.12. ISO 17034).

5.1.2 Avaliação da capacidade antimicrobiana dos peptídeos e dos antimicrobianos das pastas DAP e TAP juntos ou separados.

Anteriormente à avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos e dos antimicrobianos da TAP ou DAP juntos ou separados, foram analisados os padrões de crescimento das cepas das bactérias *E. faecalis* (19433) e *S. aureus* (25923). As curvas de crescimento de *E. faecalis* e *S. aureus* que determinaram sua fase logarítmica estão representadas no Anexo B. As curvas de crescimento de *E. faecalis* determinaram o meio de sua fase logarítmica representados pela absorbância de 0,5 – 0,65 a 595 nm. O pré-inóculo incubado até alcançar a referida absorbância foi usado nos ensaios antimicrobianos.

A avaliação da atividade antimicrobiana dos peptídeos LL-37, IDR-1002, IDR-1018 e DJK-6 e dos antimicrobianos de DAP ou TAP juntos ou separados, foi realizada em bioensaios de microrganismos prevalentes em quadros de necrose pulpar de DPIs. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada, a partir da fase log, mediante comparação da absorbância das amostras testadas em relação ao controle negativo (0% de crescimento microbiano). A ausência de diferença entre os grupos testados com o controle negativo determinou a CIM. Nestes bioensaios foram consideradas CIM, as concentrações das amostras testadas que não apresentaram diferença estatística quando comparadas ao controle negativo (ampicilina 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. faecalis* e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus*). Desta forma, os valores de CIM e CBM (em $\mu\text{g.mL}^{-1}$) do peptídeo IDR-1002 foi de 128 para *S. aureus* e 64 para *E. faecalis*; do peptídeo IDR-1018 foi 256 (CIM) e >256 (CBM), tanto para *S. aureus* quanto para *E. faecalis*; do peptídeo DJK-6 foi >256 (CIM e CBM) para *S. aureus* e 256 (CIM) e >256 (CBM) para *E. faecalis*; do peptídeo LL-37 foi >256 (CIM e CBM) para ambas bactérias; do antimicrobiano CIP foi de 0,25 (CIM e CBM) para *S. aureus* e de 0,125 (CIM e CBM) para *E. faecalis*; do antimicrobiano MTZ foi >256 (CIM e CBM) para ambas bactérias; do antimicrobiano MNC foi de 1 (CIM e CBM) para *S. aureus* e de 8 (CIM e CBM) para *E. faecalis*; da pasta DAP foi de 1 (CIM e CBM) para *S. aureus* e de 0,25 (CIM e CBM) para *E. faecalis*; e da pasta TAP foi de 2 (CIM e CBM) para *S. aureus* e de 0,25 (CIM e CBM) para *E. faecalis*. Os resultados demonstraram que IDR-1002 apresentou os menores valores de CIM e CBM e LL-37, os maiores dentre os peptídeos. CIP apresentou os menores valores de CIM e CBM dentre os

antimicrobianos e MTZ os maiores. A DAP apresentou melhores resultados de CIM e CBM quando comparada a TAP (Tabela 3).

Tabela - 3 Representação dos valores de CIM e CBM dos peptídeos e dos antimicrobianos da DAP e TAP em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ contra *S. aureus* e *E. faecalis*.

ANTIMICROBIANOS/ PEPTÍDEOS	MICRORGANISMOS			
	<i>S. aureus</i> ATCC 25923		<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	
	CIM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CBM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CIM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$	CBM em $\mu\text{g.mL}^{-1}$
Ampicilina	4	4	20	20
IDR1002	128	128	64	64
IDR1018	256	>256	256	>256
DJK-6	>256	>256	256	>256
LL-37	>256	>256	>256	>256
CIP	0,25	0,25	0,125	0,125
MTZ	>256	>256	>256	>256
MNC	1	1	8	8
DAP	1	1	0,25	0,25
TAP	2	2	0,25	0,25

5.1.3 Avaliação da combinação sinérgica do peptídeo IDR-1002 e o antimicrobiano CIP

Baseando-se nos melhores resultados de CIM e CBM dos antimicrobianos isolados ou combinados de DAP ou TAP e dos peptídeos previamente testados (IDR-1002, IDR-1018, DJK-6 e LL-37) contra *E. faecalis* e *S. aureus*, uma avaliação da capacidade antimicrobiana combinada de IDR-1002 e CIP foi realizada. A partir das concentrações 2x maiores ($0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP e $256 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 para *S. aureus* e $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP e $128 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. faecalis*) do que as encontradas previamente, uma série de diluições foram realizadas. As concentrações inibitórias fracionárias (ICIF) foram determinadas, a partir da fase log, mediante comparação da absorbância das amostras testadas em relação ao controle negativo (0% de crescimento microbiano). A ausência de diferença entre os grupos testados com o controle negativo determinou a ICIF. Nestes bioensaios foram consideradas (ICIF), as concentrações das amostras testadas que não apresentaram diferença estatística

quando comparadas ao controle negativo (ampicilina 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. faecalis* e 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus*). Diante disso, foram encontradas associações sinérgicas para a bactéria *S. aureus* nas combinações de 0,062 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP + 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 (ICIF = 0,5), 0,031 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP + 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 (ICIF = 0,37) e 0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP + 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 (ICIF = 0,31). Para a bactéria *E. faecalis*, as associações sinérgicas foram encontradas nas combinações de 0,031 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP + 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 (ICIF = 0,5) e 0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP + 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 (ICIF = 0,37).

5.2 ETAPA 2: AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E PRODUÇÃO DE NITRITO NAS CONCENTRAÇÕES CLÍNICAS DA TAP E DAP, NAS CONCENTRAÇÕES ENCONTRADAS NA ANÁLISE ANTIMICROBIANA DA DAP, TAP E DA PROPOSTA SINÉRGICA (CIP + IDR-1002)

Frente aos resultados antimicrobianos e sinérgicos das amostras testadas, um ensaio de viabilidade celular por MTT e a produção de nitrito foi realizada em culturas das linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929, após 72 h de incubação. O objetivo foi comparar os resultados dos CIM encontrados neste estudo para DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), com as concentrações clínicas utilizadas (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Além disso, essa etapa serviu pra comparar os valores sinérgicos encontrados para *S. aureus* (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP + 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002) e *E. faecalis* (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP + 16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002), para determinação dos grupos a serem analisados na etapa final (etapa 3).

5.2.1 Viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7

A viabilidade celular das culturas na presença de diferentes estímulos se manteve estável ou acima de 100% em todos os grupos avaliados (Figuras 5A e 5B). Os grupos estimulados com DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) estimularam a proliferação celular quando comparados ao controle (RAW) (Figura 5A) ($p < 0,05$). A concentração clínica de $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de DAP aumentou a proliferação celular quando comparada ao controle (RAW) ($p < 0,05$) (Figura 5B).

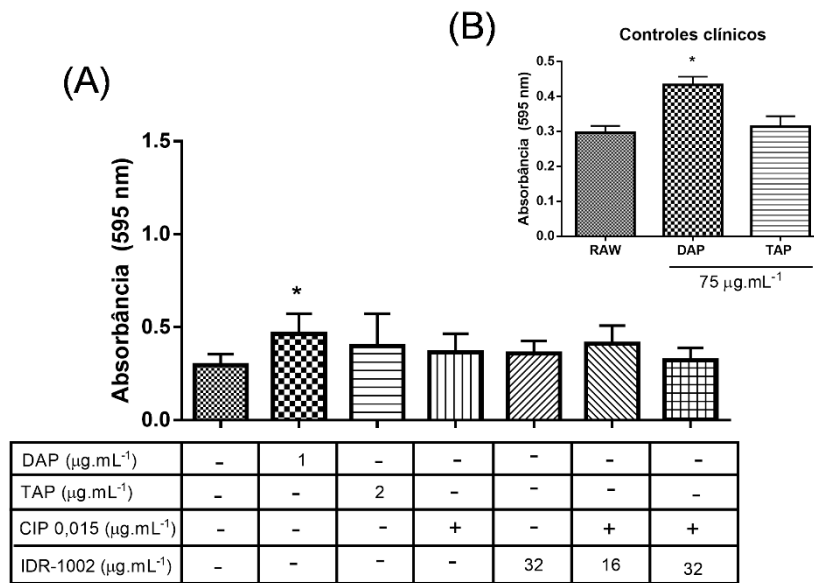


Figura 5 – Viabilidade celular de RAW 264.7 das culturas na presença de diferentes estímulos: (A) DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão das absorbâncias (595nm), de 3 réplicas biológicas em triplicata. * representa a diferença estatística comparado aos grupos controle (RAW), após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.2.2 Produção de NO em macrófagos RAW 264.7

A partir do sobrenadante das culturas incubadas, a produção de NO foi avaliada após 72h. DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção de NO em relação ao controle (RAW) ($p < 0,05$) e ao grupo contendo (CIP $0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sem IDR-1002 ($p < 0,05$), porém esta produção foi menor do que a observada com o grupo contendo TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 6A). A TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) induziu a maior produção de NO encontrada em relação ao grupo controle (RAW) e a todos os outros grupos testados ($p < 0,05$). Em adição, CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a produção deste mediador, a valor quase nulo, quando comparado a todos os outros grupos ($p < 0,05$), exceto em comparação ao grupo controle (RAW) (Figura 6A). Os grupos contendo CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentaram produção de NO semelhantes entre si e aumentadas em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 6A). Nos controles clínicos, a DAP $75 \mu\text{g.mL}^{-1}$ aumentou a produção de NO em relação ao controle (RAW) e a TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 6B). TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) também aumentou a produção de NO em relação ao grupo controle ($p < 0,05$) (Figura 6B).

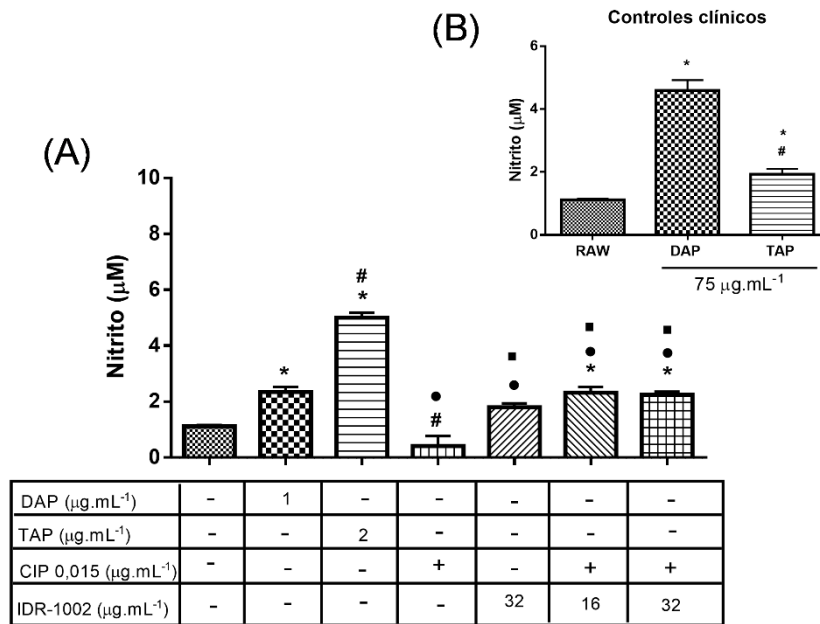


Figura 6 – Produção de NO em células RAW 264.7 na presença de diferentes estímulos: (A) DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão da produção de nitrito em μM , de 3 réplicas biológicas em triplicata. * representa diferença estatística comparada ao o grupo controle (RAW) (A e B); # representa diferença estatística comparada com DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A) ou DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B); • representa diferença estatística comparadas com TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A); e ■ representa diferença estatística comparadas com CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sem IDR-1002 (A), após teste *one-way* ANOVA com correção de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.2.3 Viabilidade celular em fibroblastos L929

A viabilidade celular das culturas na presença de diferentes estímulos se manteve estável ou acima de 100% em todos os grupos avaliados. Nenhum dos grupos alterou significativamente a viabilidade celular em relação ao controle (L929) e também entre si (Figura 7A). O grupo contendo TAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a proliferação celular quando comparado ao grupo DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 7B).

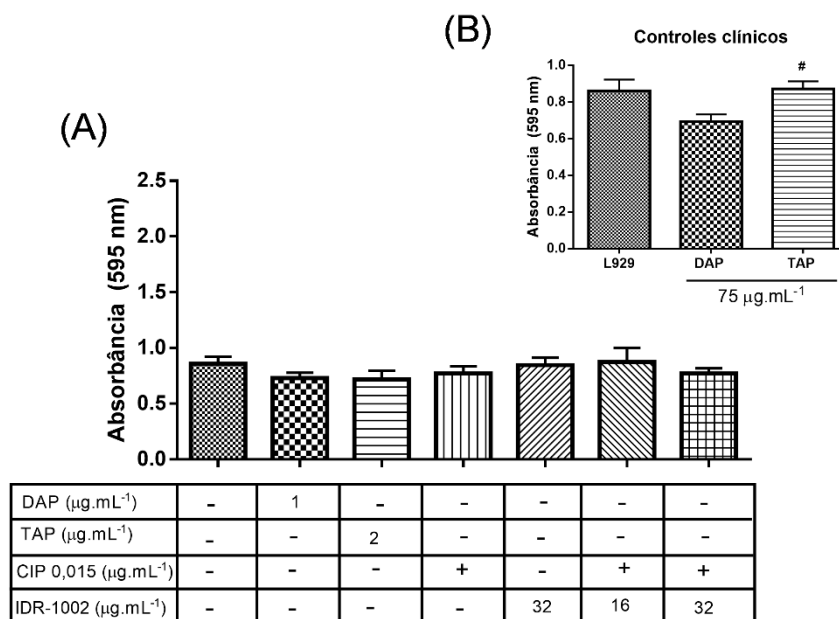


Figura 7 - Viabilidade celular de L929 das culturas na presença de diferentes estímulos: (A) DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão das absorbâncias (595nm), de 3 réplicas biológicas em triplicata. # representa a diferença estatística comparada a DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$).

5.2.4 Produção de NO em fibroblastos L929

A partir do sobrenadante das culturas incubadas, a produção de NO foi avaliada após 72h. Nenhum dos grupos testados alterou significamente a produção de NO em relação ao controle (L929) e o grupo estimulado com CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção deste mediador em relação a CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sem IDR-1002 ($p < 0,05$) (Figura 8A). DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diminuiu a produção de NO em relação ao controle (L929) e em relação a TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 8B). TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) estimulou a produção de NO quando comparada ao controle (L929) ($p < 0,05$) (Figura 8B).

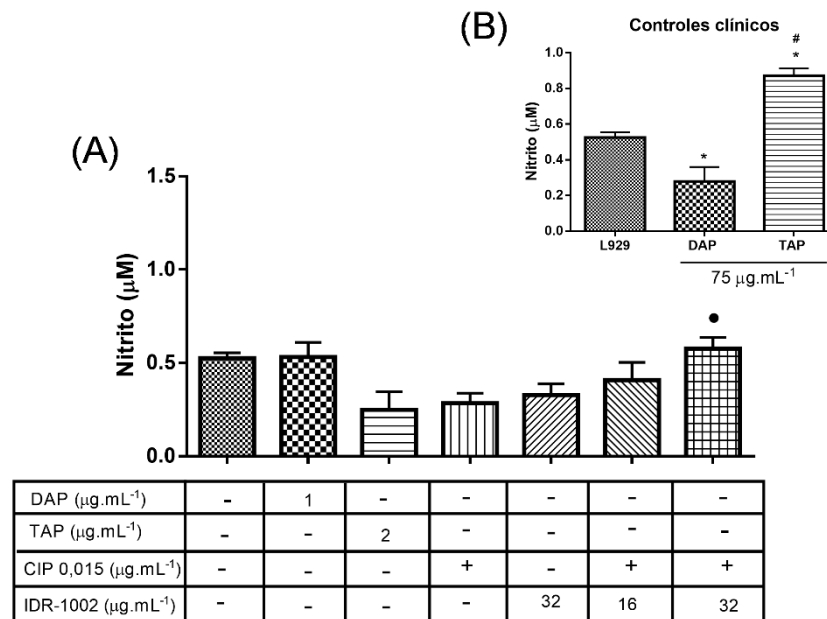


Figura 8 - Produção de NO em células L929 na presença de diferentes estímulos: (A) DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) concentrações clínicas DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão da produção de nitrito em μM , de 3 réplicas biológicas em triplicata. • representa diferença estatística comparadas ao grupo CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) sem IDR-1002 (A); * representa diferença estatística comparada com o grupo controle (L929) (A e B); e # representa diferença estatística comparada com DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), após teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$)

Tabela 4 - Resumo da etapa 2 do trabalho, onde = representa produção ou viabilidade igual ao do grupo controle, ↑ representa aumento de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle e ↓ representa diminuição de produção ou viabilidade em comparação ao grupo controle.

Grupos experimentais (concentração em $\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Viabilidade Celular RAW 264.7 (fig. 5 pág. 84)	Produção de NO RAW 264.7 (fig. 6 pág. 86)	Viabilidade celular L929 (fig. 7 pág. 87)	Produção de NO L929 (fig. 8 pág. 89)
DAP (1)	↑	↑	=	=
DAP (75)	↑	↑	=	↓
TAP (2)	=	↑	=	=
TAP (75)	=	↑	=	=
CIP (0,015)	=	=	=	=
IDR-1002 (32)	=	=	=	=
CIP (0,015) + IDR-1002 (16)	=	↑	=	=
CIP (0,015) + IDR-1002 (32)	=	↑	=	=

5.3 ETAPA 3: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE CITOTÓXICA E IMUNOMODULATÓRIA EM LINHAGEM DE CÉLULAS RAW 264.7 E L929 DAS AMOSTRAS SELECIONADAS EM UM MODELO DE INFECÇÃO ENDODONTICA *IN VITRO*.

Os grupos DAP e TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) não prosseguiram para a etapa 3, pois o objetivo era levar para a etapa subsequente (etapa 3), os valores do CIM encontrados neste estudo. Como não houveram diferenças estatísticas para as análises descritas entre CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$), apenas este último grupo avançou para a etapa final, já que nestes valores encontra-se ação sinérgica para *S. aureus* e ação aditiva para *E. faecalis*. A criação de um modelo de infecção endodôntica *in vitro* nesta etapa de citotoxicidade e imunomodulação abrangeu primeiramente a definição da concentração ($10^5 - 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$) do estímulo de antígenos *HK* de ambas bactérias, a serem utilizados nas culturas de células RAW e L929. O objetivo consistiu em selecionar a menor concentração que estimulasse as culturas celulares para as análise de produção das citocinas (IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-12 e IL-10), além do mediador NO, em macrófagos

RAW 264.7 e da citocina IL-6 e o mediador NO, em fibroblastos L929. Nesse modelo de infecção endodôntica *in vitro*, o LPS ($3 \mu\text{g.mL}^{-1}$ por poço) foi utilizado como um controle para os estímulos antigênicos e o rIFN- γ (10 U por poço), como um ativador clássico conhecido para produção de citocinas e mediadores em macrófagos e fibroblastos.

5.3.1 Avaliação da viabilidade celular em RAW 264.7 estimulada com diferentes concentrações de *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis*

As culturas de células RAW 264.7 estimuladas com diferentes concentrações de *HK-S. aureus* não apresentaram redução da viabilidade e o estímulo com LPS contribuiu para a proliferação celular ($p < 0,05$) (Figura 9A). A adição de rIFN- γ e 10^8 UFC.mL⁻¹ de *HK-S. aureus* contribuiu para a proliferação celular em relação ao grupo controle e aos grupos contendo 10^5 e 10^6 UFC.mL⁻¹ ($p < 0,05$) (Figura 9C). As diferentes concentrações de antígenos *HK-E. faecalis* também não reduziram a viabilidade celular e 10^8 UFC.mL⁻¹ e LPS, foram capazes de aumentar a proliferação celular quando comparados ao controle ($p < 0,05$) (Figura 9B). Nenhum dos grupos testados apresentou diferença estatística em relação ao controle e entre si, na presença de rIFN- γ e *HK-E. faecalis* (Figura 9D). As imagens de microscopia óptica (Figura 9E-L) demonstraram que após 3 dias de incubação, os grupos contendo *HK-S. aureus* (Figura 9I e 9J) e *HK-E. faecalis* (Figura 9K e 9L) com ou sem rIFN- γ alteraram sua morfologia, quando comparados com o grupo controle (Figura 9E).

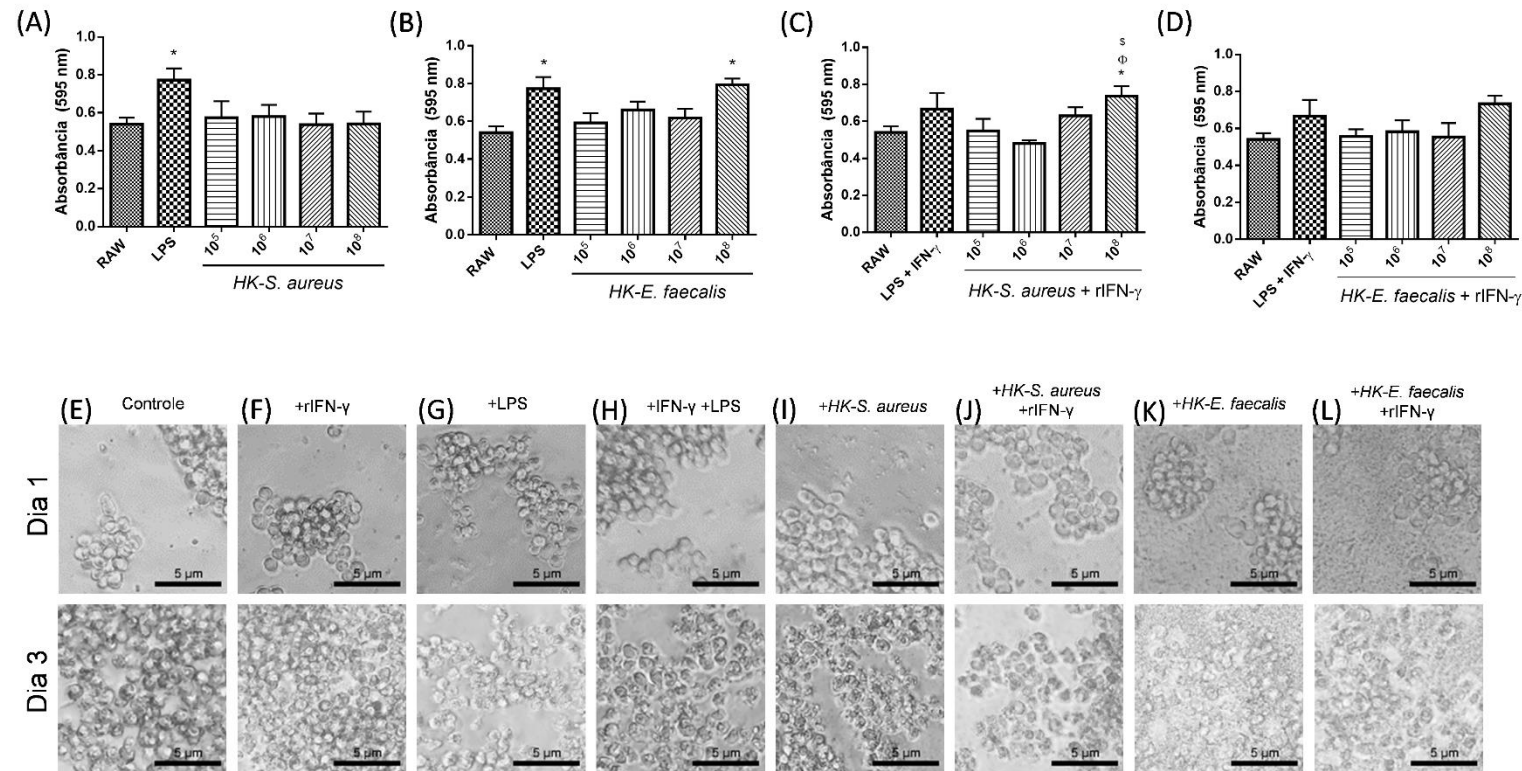


Figura 9 - Viabilidade celular de células RAW 264.7. Os gráficos representam as culturas celulares estimuladas com diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* (A) com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão na absorbância de 595 nm, realizadas em 3 réplicas biológicas. As diferenças estatísticas por one-way ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas com o grupo controle (A-C); Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹ (C); e \$ comparadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ (C). A microscopia óptica (20x) demonstra os aspectos morfológicos celulares (E-L) iniciais (dia 1) e finais (dia 3) de cultura de células RAW 264.7 estimuladas com e sem rIFN- γ , LPS, LPS e rIFN- γ , *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹, *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ , *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ e *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ .

5.3.2 Avaliação da produção de NO em RAW 264.7 estimulada com diferentes concentrações de *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis*

Nas culturas de RAW 264.7, a presença de LPS e diferentes concentrações de *HK-S. aureus* foram capazes de aumentar a produção de nitrito de sódio, após 72 h de incubação em relação ao controle, exceto no grupo contendo 10^8 UFC.mL⁻¹ ($p < 0,05$) (Figura 10A). A presença de IFN- γ aumentou a produção de nitrito por estas células nas diferentes concentrações de *HK-S. aureus* quando comparadas ao controle ou na presença de LPS ($p < 0,05$), com exceção do grupo estimulado com 10^8 UFC.mL⁻¹ (Figura 10C). Somente a concentração de 10^8 UFC.mL⁻¹ de *HK-E. faecalis* foi capaz de aumentar a produção de nitrito de sódio sem a presença de rIFN- γ em relação ao controle ($p < 0,05$) (Figura 10B). A adição de rIFN- γ levou a um aumento na produção de nitrito de sódio dos grupos estimulados com as diferentes concentrações de *HK-E. faecalis* ($p < 0,05$), com exceção do grupo contendo 10^8 UFC.mL⁻¹ de *HK-E. faecalis* (Figura 10D).

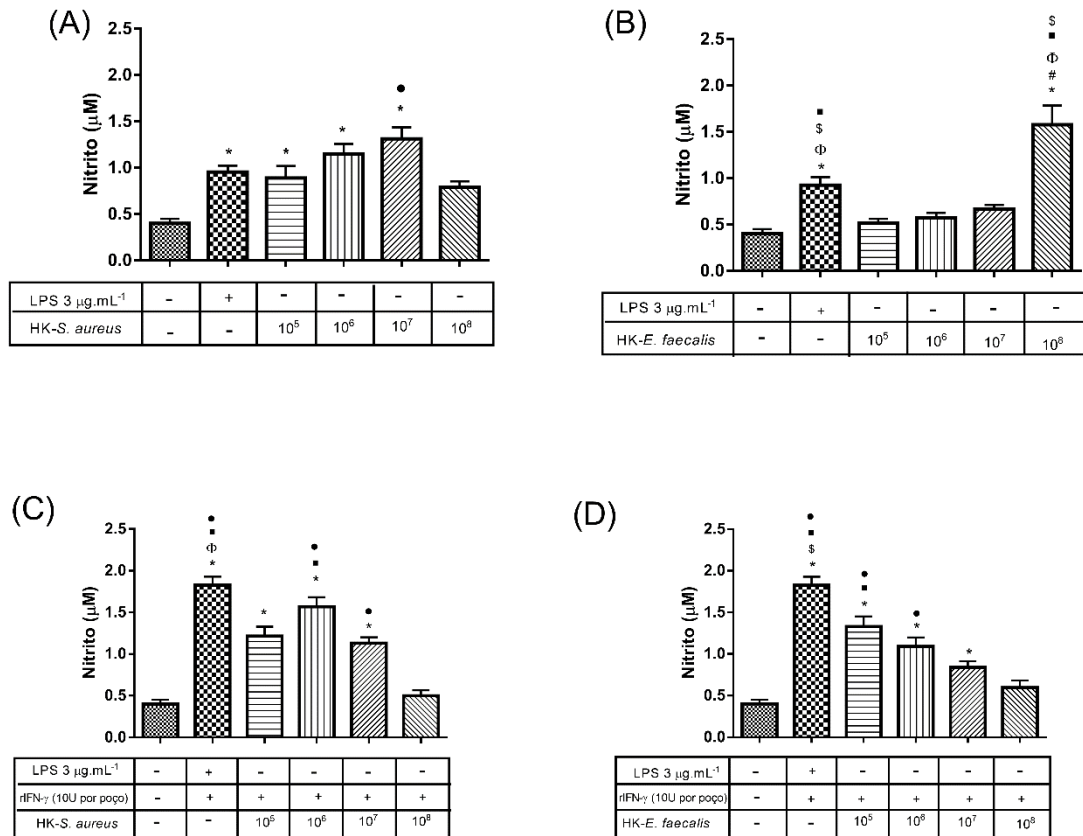


Figura 10 - Produção de NO pelas células RAW 264.7. Os gráficos representam os valores da produção de nitrito na presença de diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* sem (A) ou com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* sem (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e erro padrão da produção de nitrito em μ M realizadas em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) foram representadas por * comparadas com o controle (RAW) (A, B e C); # comparadas com os grupos estimulados com LPS (B); Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹ (B e C); \$ comparadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ (B e D); ■ comparadas com 10^7 UFC.mL⁻¹ (B, C e D); e ● comparadas com 10^8 UFC.mL⁻¹ (A, B, C e D).

5.3.3 Avaliação da viabilidade celular em L929 estimulada com diferentes concentrações de *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis*

As células L929 estimuladas com diferentes concentrações de *HK-S. aureus*, ou LPS não apresentaram sua viabilidade celular reduzida (Figura 11A). Além disso, 10^8 UFC.mL⁻¹ deste antígeno induziu a proliferação celular ($p < 0,05$) (Figura 11A). Quando rIFN- γ foi adicionado ao grupo contendo 10^6 UFC.mL⁻¹ de *HK-S. aureus* observou-se proliferação celular ($p < 0,05$) (Figura 11C). A presença do *HK-E. faecalis* diminuiu a viabilidade celular e a presença de 10^6 , 10^7 e 10^8 UFC.mL⁻¹ deste antígeno, também, induziu a proliferação destas células ($p < 0,05$) (Figura 11B). O estímulo de rIFN- γ juntamente com *HK-E. faecalis* não foi capaz de alterar a viabilidade celular em nenhum dos grupos testados (Figura 11D). As imagens de microscopia óptica (Figura 11A-L) demonstram que após 3 dias de incubação, os grupos contendo LPS (Figura 11G), *HK-S. aureus* (Figura 11I e 11J) e *HK-E. faecalis* (Figura 11K e 11L) com ou sem rIFN- γ alteraram a morfologia celular de L929, quando comparados com o grupo de controle (Figura 11E).

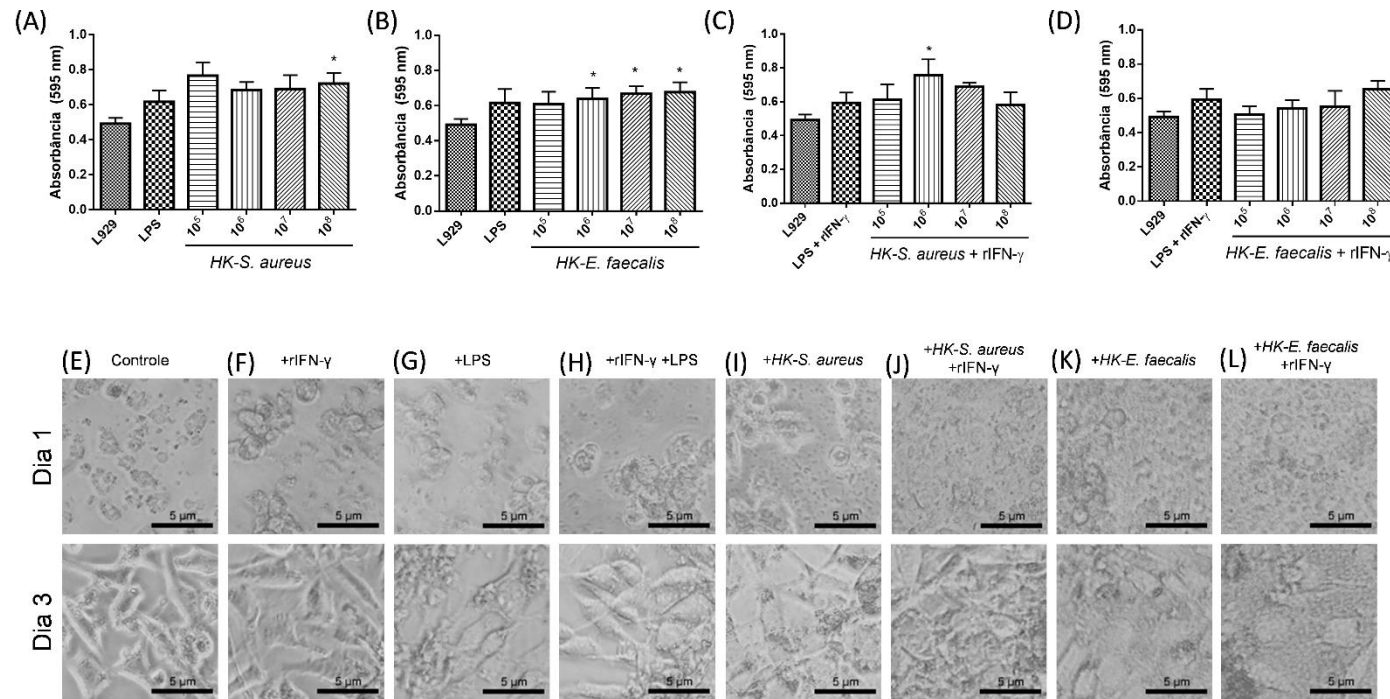


Figura 11 - Viabilidade celular de células L929. Os gráficos representam as culturas celulares estimuladas com diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* (A) com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro padrão na absorbância de 595 nm, realizadas em 3 réplicas biológicas. As diferenças estatísticas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas com o grupo controle (A-C); Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹ (C); e \$ comparadas com 10^6 UFC.mL⁻¹ (C). A microscopia óptica (20x) demonstra os aspectos morfológicos celulares (E-L) iniciais (dia 1) e finais (dia 3) de cultura de células L929 estimuladas com e sem rIFN- γ , LPS, LPS e rIFN- γ , *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹, *HK-S. aureus* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ , *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ e *HK-E. faecalis* 10^6 UFC.mL⁻¹ com rIFN- γ .

5.3.4 Avaliação da produção de NO em L929 estimulada com diferentes concentrações de *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis*

Nas culturas de células L929, a presença de LPS ou de diferentes concentrações de *HK-S. aureus* foi capaz de estimular a produção de nitrito de sódio, com ou sem rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figuras 12A e 12C). Apenas a maior concentração (10^8 UFC.mL⁻¹) de *HK-E. faecalis* foi capaz de estimular a produção de nitrito de sódio sem rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 12B). No entanto, quando o rIFN- γ foi adicionado, todos os grupos induziram a produção de nitrito de sódio nestas células ($p < 0,05$) (Figura 12D).

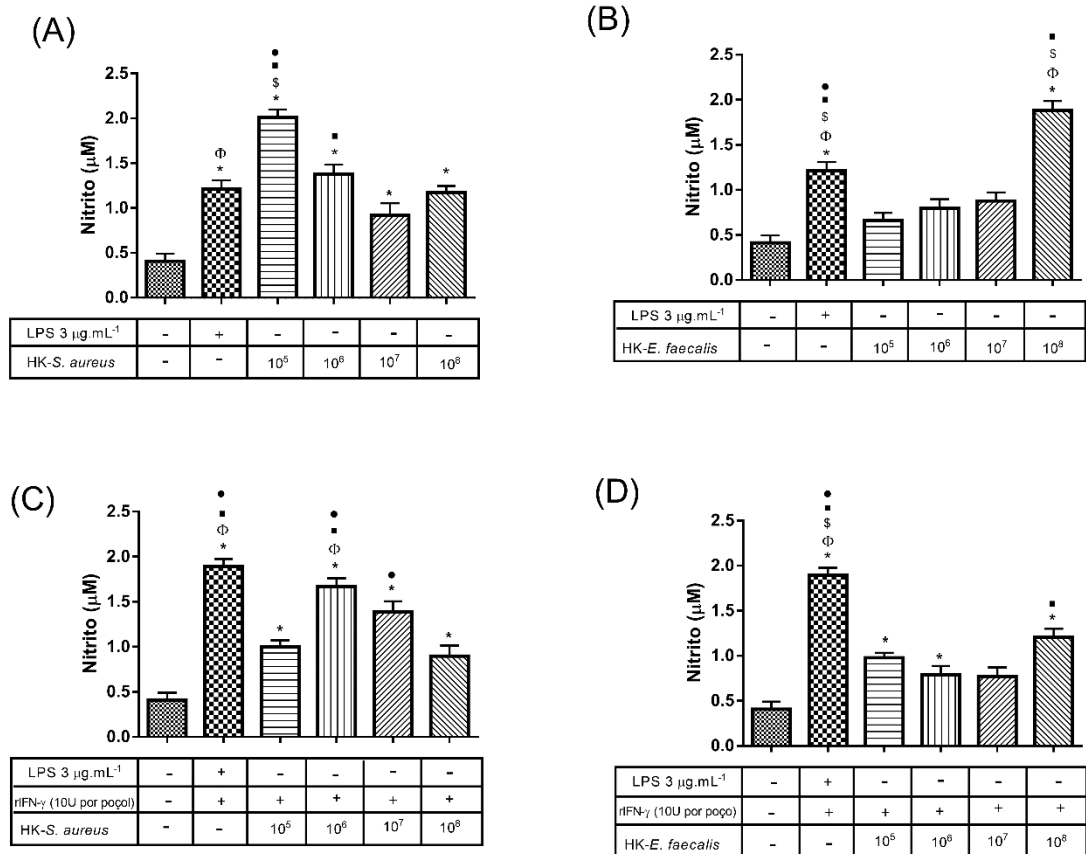


Figura 12 - Produção de NO pelas células L929. Os gráficos representam os valores da produção de nitrito na presença de diferentes concentrações (10^5 - 10^8 UFC.mL⁻¹) de antígenos *HK-S. aureus* sem (A) ou com rIFN- γ (C) ou antígenos *HK-E. faecalis* sem (B) com rIFN- γ (D), após 72h de incubação. As barras representam a média e erro padrão da produção de nitrito em μ M realizadas em triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas pelo teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) foram representadas por * comparadas com o controle; Φ comparadas com 10^5 UFC.mL⁻¹; $\$$ comparadas com 10^6 UFC.mL⁻¹; ■ comparadas com 10^7 UFC.mL⁻¹; e ● comparadas com 10^8 UFC.mL⁻¹.

5.3.5 Avaliação da capacidade imunomodulatória da TAP, DAP, CIP, LL-37, IDR-1002 e CIP + IDR-1002

Frente ao teste com diferentes concentrações de antígenos, a concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹ + rIFN- γ foi eleita para a avaliação da produção de citocinas. Essa concentração de *HK-E. faecalis* e de *HK-S. aureus* associada ao rIFN- γ foi

responsável por estimular a produção de nitrito, tanto em células RAW 264.7, quanto em células L929.

5.3.5.1 Avaliação da viabilidade de macrófagos RAW 264.7 na presença de TAP, DAP, CIP, LL-37, IDR-1002 e CIP + IDR-1002, em 24 e 72 h

A TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi responsável por reduzir para 61% a viabilidade celular em RAW 264.7 ($p < 0,05$) (Figura 13A). Os outros grupos não apresentaram diferença estatística em relação ao controle (Figura 13A). A TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) também reduziu a viabilidade celular na presença estímulo de *HK-S. aureus* e rIFN- γ em 55% (figura 13B), além de reduzir a viabilidade em 58 % na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 13C). Tanto na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ (Figura 13B), quanto na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ (Figura 13C), os outros grupos não apresentaram diferença estatística em relação aos grupos com apenas células RAW (sem estímulo adicional).

Nenhum dos grupos contendo as pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), os peptídeos LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e a associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) alteraram a viabilidade celular significativamente (Figura 14A). Com a adição de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , o grupo contendo TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a proliferação celular ($p < 0,05$) (Figura 14B). Com a adição de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ nenhum dos grupos aparentemente alterou significativamente a viabilidade celular (Figura 14C).

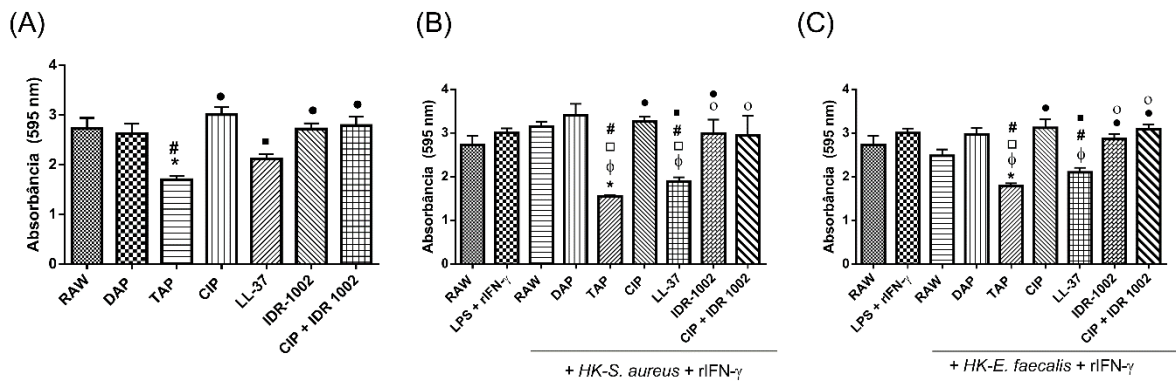


Figura 13 - Viabilidade celular de células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. Diferenças estatísticas realizadas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); • comparadas aos grupos TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ■ comparadas ao grupo CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ○ comparadas com LL-37 (B e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).

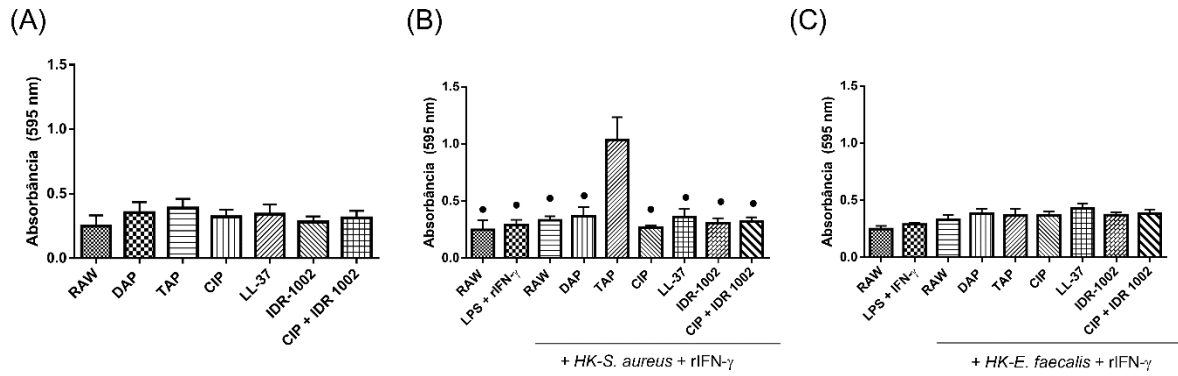


Figura 14 - Viabilidade celular de células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. Diferenças estatísticas realizadas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por • comparadas ao grupo TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B).

5.3.5.2 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória IL-1 α em macrófagos RAW 264.7

A produção de IL-1 α foi avaliada após 24h de incubação. DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foram responsáveis por aumentar a produção de desta citocina em relação ao controle e também em relação aos grupos contendo IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 15A). No que diz respeito aos grupos estimulados com *HK-S. aureus* + rIFN- γ , apenas o grupo contendo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) estimulou a produção de IL-1 α em relação ao controle RAW (sem estímulo) ($p < 0,05$), em valores comparáveis aos produzidos na presença de LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) (Figura 15B). Em relação à adição de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , os grupos contendo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e LL-37 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram a produção desta citocina em relação ao controle RAW (sem estímulo) ($p < 0,05$) (Figura 15C). Além disso, os grupos contendo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) diminuíram a produção de IL-1 α em relação aos grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-E. faecalis* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 15C).

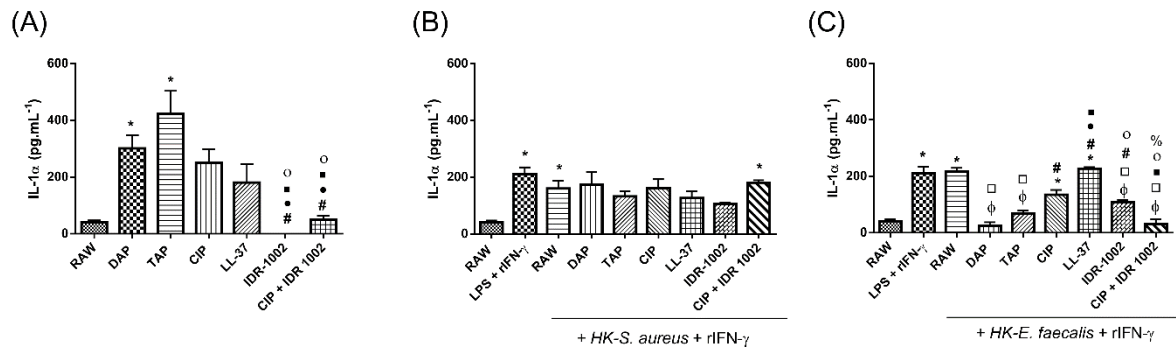


Figura 15 – Produção da citocina IL-1 α por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL⁻¹ de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); • comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ■ comparadas ao grupo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ○ comparadas com LL-37 (A e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).

5.3.5.3 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 em macrófagos RAW 264.7

A produção de IL-6 foi avaliada após 24h de incubação. DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) induziram a produção desta citocina em relação ao controle (RAW) ($p < 0,05$) (Figura 16A). Com a adição de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) estimularam a produção de IL-6 em relação ao controle RAW (sem estímulo) ($p < 0,05$) (Figura 16B). Além disso, CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$), DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), IDR-1002 ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziram a produção desta, em relação aos grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 16B). Com a adição de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , todos os grupos estimularam a produção de IL-6 em relação ao grupo controle RAW (sem estímulo) (Figura 16C). Ademais, todos os grupos reduziram a produção desta citocina em relação ao grupo LPS + rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 16C). Os grupos contendo TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diminuíram a produção desta citocina em relação ao grupo contendo RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 16C).

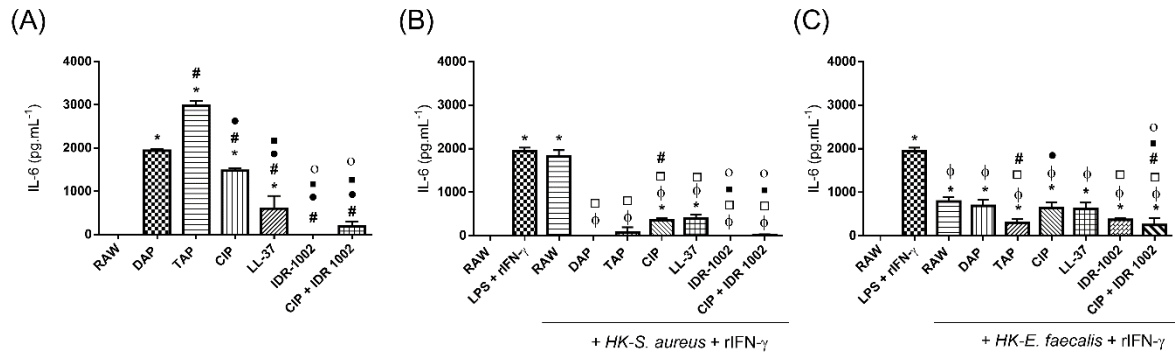


Figura 16 - Produção da citocina IL-6 por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ● comparadas aos grupos TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ■ comparadas ao grupo CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ○ comparadas com LL-37 (A, B e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).

5.3.5.4 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória TNF- α em macrófagos RAW 264.7

A produção de TNF- α foi avaliada após 24h de incubação. As pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram a produção desta citocina em relação ao controle (RAW) e também em relação aos demais grupos ($p < 0,05$) (Figura 17A). Com a adição do estímulo de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , os grupos contendo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) induziram a produção desta citocina em relação ao controle RAW (sem estímulo) ($p < 0,05$), mas não apresentaram diferenças para os grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) (Figura 17B). Todos os outros grupos diminuíram a produção de TNF- α em relação a LPS + rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 17B). Com a adição de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção desta citocina em relação a todos os grupos ($p < 0,05$), exceto em comparação com o grupo contendo LPS + rIFN- γ (Figura 17C).

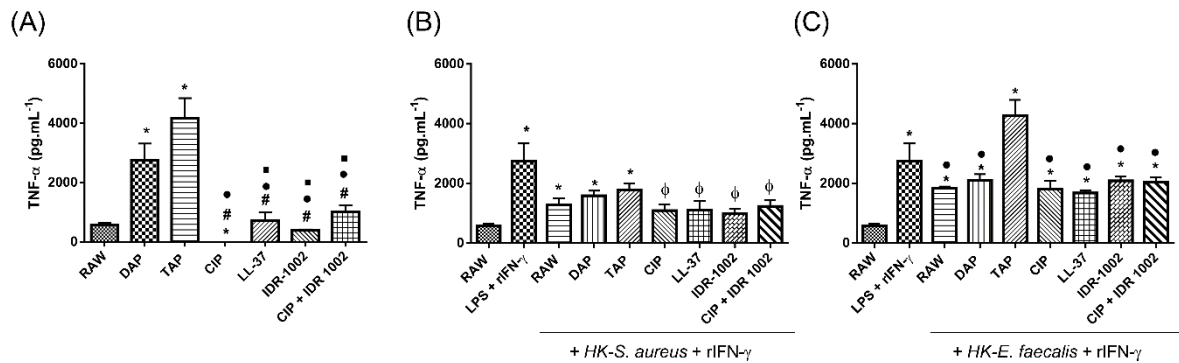


Figura 17 - Produção da citocina TNF- α por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 μ g.mL⁻¹) e TAP (2 μ g.mL⁻¹), CIP (0,015 μ g.mL⁻¹), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 μ g.mL⁻¹) e associação de CIP (0,015 μ g.mL⁻¹) + IDR-1002 (32 μ g.mL⁻¹); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL⁻¹ de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 μ g.mL⁻¹) (A); • comparadas aos grupos TAP (2 μ g.mL⁻¹) (A e C); ■ comparadas ao grupo CIP (0,015 μ g.mL⁻¹) (A); e Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B).

5.3.5.5 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória perfil M1 (IL-12) em macrófagos RAW 264.7

A produção de IL-12 foi avaliada após 24h de incubação. TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) induziu a produção desta citocina em relação ao controle (RAW) ($p < 0,05$). LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a síntese de IL-12 em relação ao grupo controle (RAW) e em relação a todos os outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 18A). Com a adição de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , os grupos contendo DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram a produção desta citocina em relação ao controle ($p < 0,05$) RAW (sem estímulo), a valores semelhantes aos estimulados na presença de LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) (Figura 18B). Os grupos contendo TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziram a produção de IL-12 em relação aos grupos estimulados com LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 18B). A associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a síntese de IL-12 em relação ao grupo contendo LPS + rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 18B). Com a adição de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção de IL-12 em relação ao controle RAW (sem estímulo) ($p < 0,05$) (Figura 18C). Em adição, DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção desta, em relação a todos os grupos ($p < 0,05$) (Figura 18C). Ademais, TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziram a produção de IL-12 quando comparados aos grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-E. faecalis* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 18C).

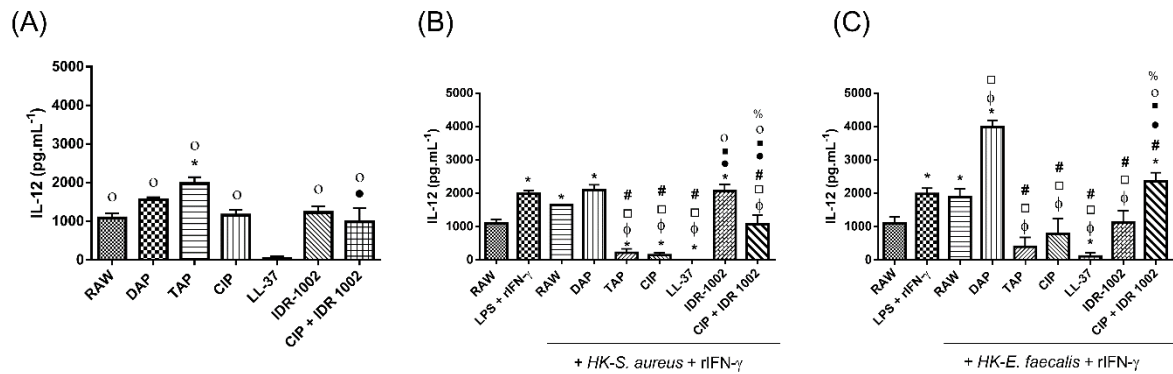


Figura 18 - Produção da citocina IL-12 por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (B e C); # comparadas ao grupo DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B e C); • comparadas aos grupos TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C); ■ comparadas ao grupo CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B e C); ○ comparadas com LL-37 (A, B e C); % comparadas com IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B e C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).

5.3.5.6 Avaliação da produção da citocina anti-inflamatória perfil M2 (IL-10) em macrófagos RAW 264.7

A produção de IL-10 foi avaliada após 72h de incubação. Nenhum dos grupos estudados apresentou diferença estatística em relação ao controle (RAW) na ausência dos estímulos de antígenos e rIFN- γ (Figura 19A). Com a adição de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , o grupo contendo CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), reduziu a produção desta citocina em relação aos grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 19B). Na presença do estímulo de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , a associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção desta citocina em relação ao controle (RAW) e às pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) ($p < 0,05$) (Figura 19C). Em contrapartida, DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diminuíram a síntese desta citocina quando comparadas aos grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-E. faecalis* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 19C).

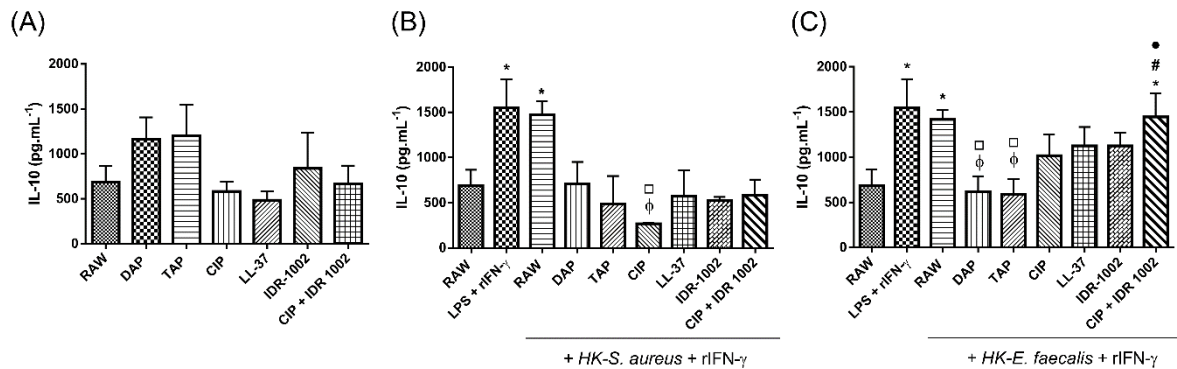


Figura 19 - Produção da citocina IL-10 por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (B e C); # comparadas ao grupo DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C); • comparadas aos grupos TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a RAW (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (B) ou RAW (+ *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) (C).

5.3.5.7 Avaliação da produção do mediador NO por macrófagos RAW 264.7

A produção de NO foi avaliada após 72h. DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) estimularam a produção deste mediador em relação ao controle (RAW) ($p < 0,05$) (Figura 20A). Com a adição de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção de NO em relação ao controle RAW (sem estímulo) ($p < 0,05$) mas não foi significativamente diferente dos grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) (Figura 20B). Ademais, os grupos contendo CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IDR-1002 diminuíram a produção de NO quando comparados aos grupos contendo LPS + rIFN- γ e RAW (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 20B). Com a adição de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção deste mediador quando comparado a todos os outros grupos e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentou a produção de NO quando comparado ao controle RAW (sem estímulo) ($p < 0,05$) (Figura 20C).

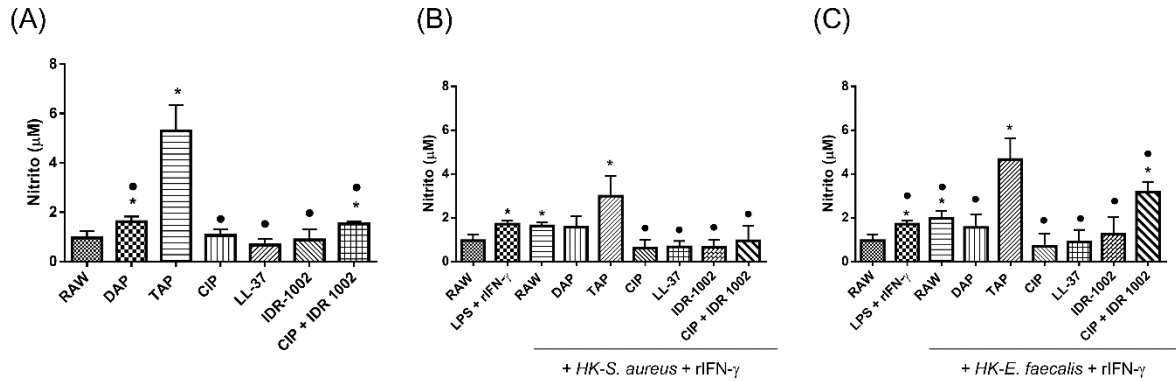


Figura 20 – Produção do mediador NO por células RAW 264.7 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em μM da produção de nitrito de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (RAW) (A, B e C); e • comparadas aos grupos TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C).

5.3.5.8 Avaliação da viabilidade de fibroblastos L929 na presença de TAP, DAP, CIP, LL-37, IDR-1002 e CIP + IDR-1002, em 48 e 72 h.

A viabilidade celular de células L929 foi avaliada inicialmente após 48h. A presença de LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a viabilidade celular para 38% quando comparada ao controle (L929) ($p < 0,05$) (Figura 21A). Todos os outros grupos não alteraram significamente a viabilidade celular, em comparação com o controle (L929) (Figura 21A). Com a adição tanto de *HK-S. aureus* + rIFN- γ (Figura 21B), quanto de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ (Figura 21C), o padrão de redução de viabilidade celular de LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi ainda mais expressivo, reduzindo a viabilidade celular para 25% ($p < 0,05$). Ademais, os outros grupos não alteram significamente a viabilidade celular.

A avaliação da viabilidade celular final para fibroblastos L929 foi realizada após 72h. A presença de LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diminuiu a viabilidade celular para 60%, quando comparada ao controle (L929) ($p < 0,05$) (Figura 22A). Os outros grupos não apresentaram diferenças estatísticas em relação ao controle (L929) (Figura 22A). Com a adição tanto de *HK-S. aureus* + rIFN- γ (Figura 22B) quanto de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ (Figura 22C), a presença da LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) continuou reduzindo a viabilidade celular, ao nível de 34% em comparação com o controle L929 (sem estímulo) ($p < 0,05$). Em adição, os outros grupos não alteraram a viabilidade celular em relação ao controle L929 (sem estímulo).

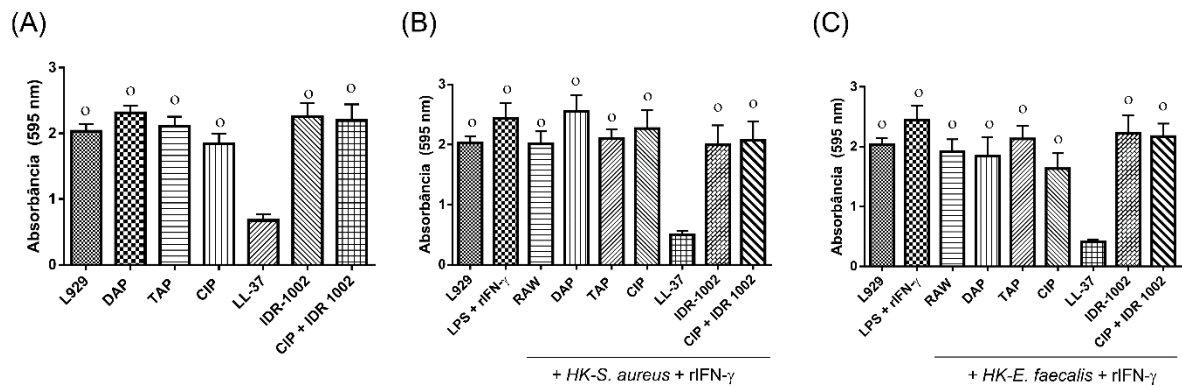


Figura 21 – Viabilidade celular de L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 48h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por ○ em comparação com LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C) .

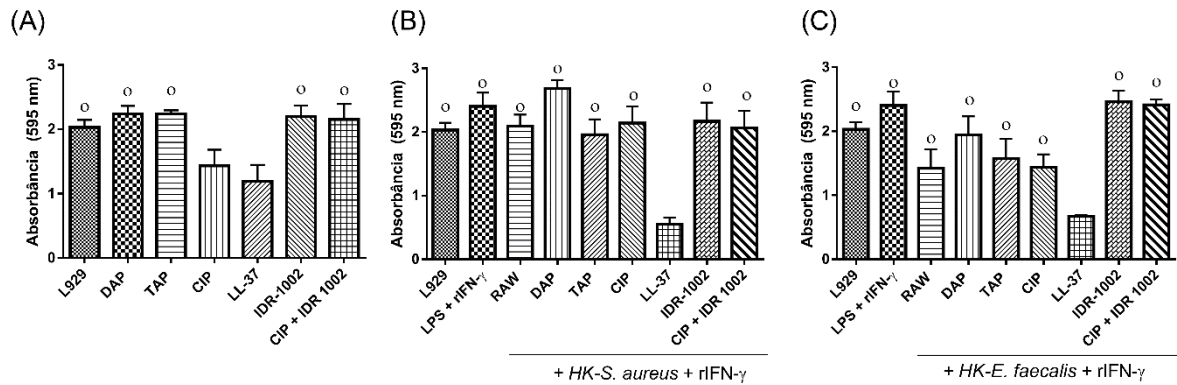


Figura 22 – Viabilidade celular de L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (595 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por \circ em comparação com LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (A, B e C) .

5.3.5.9 Avaliação da produção da citocina pró-inflamatória IL-6 em fibroblastos L929

A produção de IL-6 foi avaliada após 48h de incubação. As pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram consideravelmente a produção desta citocina em relação ao controle (L929) e em relação a todos os outros grupos ($p < 0,05$) (Figura 23A). Em contrapartida, os estímulos de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$), IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziram a produção desta citocina em relação ao controle L929 (sem estímulo) ($p < 0,05$) (Figura 23A). Com a adição de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram a produção de IL-6 em relação ao controle L929 (sem estímulo) e ao grupo L929 (+ *HK-S. aureus* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 23B). Ademais, todos os grupos reduziram a produção desta citocina quando comparados ao grupo contendo LPS + rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 23B). Com a adição de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , todos os grupos aumentaram a produção de IL-6 em relação ao controle L929 (sem estímulo) ($p < 0,05$) e DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a síntese desta citocina em relação ao grupo contendo LPS + rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 23C).

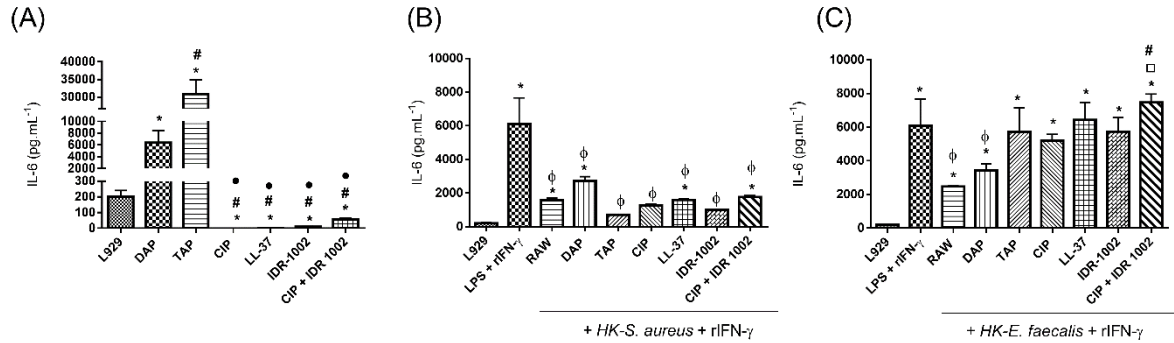


Figura 23 - Produção da citocina IL-6 por células L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 48h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em pg.mL^{-1} de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (L929) (A, B e C); # comparadas ao grupo DAP (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A e C); ● comparadas aos grupos TAP (2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (A); Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (B e C); e □ comparadas a L929 (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (C).

5.3.5.10 Avaliação da produção do mediador NO em fibroblastos L929

A produção de NO por L929 foi avaliada após 72h de incubação. Nenhum dos estímulos induziu a produção deste mediador na ausência dos antígenos e rIFN- γ (Figura 24A). Com a adição de *HK-S. aureus* + rIFN- γ , todos os grupos reduziram a produção deste mediador ($p < 0,05$), padrão também observado quando comparado aos grupos estimulados com LPS + rIFN- γ ($p < 0,05$) (Figura 24B). LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a produção deste mediador em relação ao grupo controle L929 (sem estímulo) e em relação a todos os outros grupos testados ($p < 0,05$) (Figura 24B). Já com a adição de *HK-E. faecalis* + rIFN- γ , os grupos contendo DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) aumentaram a produção de NO em relação ao controle L929 (sem estímulo) ($p < 0,05$) (Figura 24C). Ademais, CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziram a produção de NO quando comparados aos grupos contendo LPS + rIFN- γ e L929 (+ *HK-E. faecalis* + rIFN- γ) ($p < 0,05$) (Figura 24C).

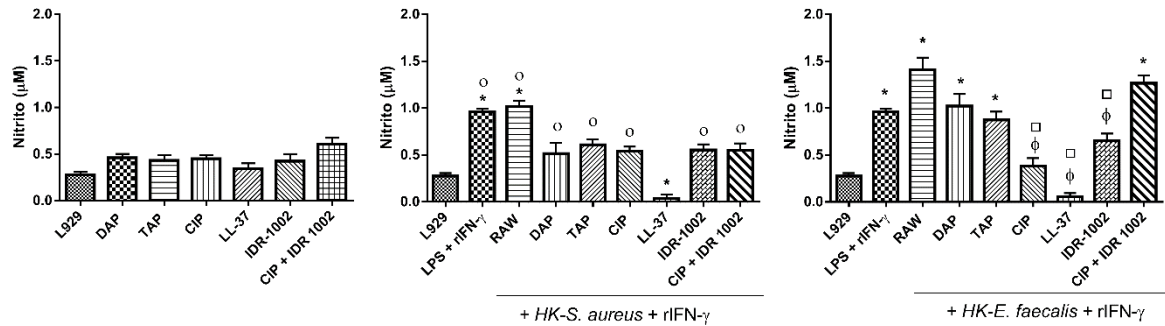


Figura 24 - Produção do mediador NO por células L929 na presença dos estímulos: (A) pastas DAP ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$), peptídeos LL-37 e IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e associação de CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) + IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$); (B) dos mesmos estímulos na presença de *HK-S. aureus* e rIFN- γ ; e (C) dos mesmos estímulos na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ , após 72h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão em μM da produção de nitrito de triplicatas técnicas e biológicas. As diferenças estatísticas após o teste *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni ($p < 0,05$) são representadas por * comparadas ao grupo controle (L929) (B e C); \circ comparadas com LL-37 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B); e Φ comparadas ao grupo contendo LPS + rIFN- γ (C); \square comparadas a L929 (+ *HK-S. aureus* e rIFN- γ) (C).

Tabela 5 – Resumo da fase imunomodulatória da etapa 3. Os diferentes tempos experimentais para células RAW 264.7 (24 e 72h) e L929 (48 e 72h), além das citocinas IL-1 α , IL-6, TNF- α , IL-12 IL-10 e o mediador NO, em RAW 264.7 e IL-6 e o mediador NO, em L929 são representados na horizontal. – representa células sem estímulos antigênicos, S representa os estímulos HK-*S. aureus* 106 UFC.mL-1 e E representa os estímulos com HK-*E. faecalis* 106 UFC.mL-1 também na horizontal. Os estímulos de DAP (1 μ g.mL-1), TAP (2 μ g.mL-1), CIP (0,015 μ g.mL-1), LL-37 (32 μ g.mL-1), IDR-1002 (32 μ g.mL-1) e CIP (0,015 μ g.mL-1) + IDR-1002 (32 μ g.mL-1) são representados na vertical. \uparrow representa aumento, = representa indiferença estatística e \downarrow representa diminuição.

Estímulo	Viab. RAW 24h (fig. 13 pág. 100)			Viab. RAW 72h (fig.14 pág. 101)			IL-1 α RAW (fig.15 pág. 103)			IL-6 RAW (fig. 16 pág. 105)			TNF- α RAW (fig. 17 pág.107)			IL-12 RAW (fig. 18 pág. 109)			IL-10 RAW (fig. 19 pág. 111)			NO RAW (fig. 20 pág. 113)			Viab. L929 48h (fig. 21 pág. 115)			Viab. L929 72h (fig. 22 pág. 116)			IL-6 L929 (fig. 23 pág. 118)			NO L929 (fig. 24 pág. 120)					
	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E	-	S	E
	DAP	=	=	=	=	=	=	\uparrow	=	\downarrow	\uparrow	\downarrow	=	\uparrow	=	=	=	=	\uparrow	=	=	\downarrow	\uparrow	=	=	=	=	=	=	=	=	\uparrow	=	=	=	=	=		
TAP	\downarrow	\downarrow	\downarrow	=	\uparrow	=	\uparrow	=	\downarrow	\uparrow	\downarrow	\downarrow	\uparrow	=	\uparrow	\uparrow	\downarrow	\downarrow	=	=	=	\uparrow	=	\uparrow	=	=	=	=	=	=	=	=	=	\uparrow	=	=	=	=	=
CIP	=	=	=	=	=	=	=	=	=	\uparrow	\downarrow	=	\downarrow	=	=	=	\downarrow	\downarrow	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	\downarrow	=	=	=	=	\downarrow
LL-37	=	\downarrow	=	=	=	=	=	=	=	\uparrow	\downarrow	=	=	=	=	\downarrow	\downarrow	\downarrow	=	=	=	=	=	=	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	\downarrow	=	=	=	=	\downarrow			
IDR-1002	=	=	=	=	=	=	=	=	\downarrow	=	\downarrow	\downarrow	=	=	=	=	=	\downarrow	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	=	\downarrow	=	=	=	=	\downarrow			
CIP + IDR-1002	=	=	=	=	=	=	=	=	\downarrow	=	\downarrow	\downarrow	=	=	=	=	\downarrow	=	=	=	=	\uparrow	=	=	=	=	=	=	=	=	\downarrow	=	\uparrow	=	=	=			

6 DISCUSSÃO

O tecido pulpar pode desempenhar uma série de funções no órgão dentário e como já discutido, possui capacidade de se auto-reparar (15). Quando a invasão microbiana ou o trauma dental podem causar a destruição deste tecido, todos os processos de deposição dentinária e suprimento fisiológico de odontoblastos podem ser rompidos (60). Em DPLs, a destruição do tecido pulpar pode gerar consequências ainda piores, como a estagnação da apicigênese e do espessamento da dentina radicular (62). A busca por ideias e teorias regenerativas não só em DPLs, mas em um âmbito endodôntico, se baseiam na odontologia do futuro, que se preocupa ao máximo em manter o maior número de dentes na cavidade bucal.

Diante disso, a busca por uma alternativa para o tratamento de DPLs se torna contínua. Porém, para o aprimoramento da busca de novas terapias que sejam eficazes e que promovam o sucesso, tornam-se necessários estudos sobre como as células do remanescente apical podem agir frente à presença de microrganismos comumente encontrados nos túbulos dentinários. Estes microrganismos podem colonizar os espaços intertubulares, mesmo após a utilização de soluções químicas irrigadoras, tratamentos mecânicos (minimamente invasivos em DPLs) e até mesmo a utilização de uma medicação intracanal (48).

Neste contexto, a medicação intracanal tem um papel essencial na ação conjunta antimicrobiana após a utilização de uma solução química irrigadora (415). No tratamento endodôntico convencional, o objetivo é proporcionar a redução do maior número de microrganismos possível, antes do vedamento radicular com um material inerte, associado a um cimento obturador (415). Em DPLs, o papel da medicação intracanal é crucial para evitar uma infecção movida por microrganismos presentes no SCR, e proporcionar um “ambiente ideal” para a apicigênese, apicificação ou até mesmo a revascularização/regeneração do tecido (215). Além de proporcionar um “ambiente ideal” no SCR para os procedimentos de revascularização/regeneração, a medicação intracanal não deve ser citotóxica. Na construção do novo tecido pulpar, a produção de biomoléculas, citocinas, fatores de crescimento e proteínas produzidas por células presentes no remanescente apical podem estar envolvidas. Estas células

podem ser as SCAPs, macrófagos, fibroblastos, dentre outras células, que podem desempenhar papel regenerativo (254).

Com toda esta problemática, além da complexidade de encontrar uma medicação intracanal eficiente, especialmente para a revascularização pulpar, poucas alternativas tem sido descritas até o momento. A discussão baseada em críticas envolvendo as pastas antimicrobianas TAP e DAP abrem caminhos para novas possibilidades. Logo, estas foram escolhidas para este trabalho, por serem difundidas nos processos de revascularização pulpar e por já serem utilizadas clinicamente como padrão-ouro.

Os PDHs então, podem surgir como uma opção para a revascularização pulpar apesar de até a presente data, estes não terem sido explorados neste contexto. A LL-37 por exemplo, pode ser encontrada na cavidade bucal e em neutrófilos (leucócitos mais presentes no tecido sanguíneo), exercendo diversas atividades antimicrobianas, imunomodulatórias e de reparo tecidual (372). Os PDHs IDRs (IDR-1018 e IDR-1002) e o peptídeo DJK-6, também são descritos na literatura como biomoléculas responsáveis por diversas ações antimicrobianas e imunomoduladoras e possivelmente podem contribuir para o reparo tecidual (11, 387, 399). Frente a todas essas características, estes PDHs foram selecionados para etapa inicial deste trabalho, que envolveu a avaliação antimicrobiana de DJK-6, IDR-1018, IDR-1002 e LL-37 em comparação com os antimicrobianos da pasta DAP (MTZ e CIP) e TAP (MTZ, CIP e MNC) juntos ou separados contra *E. faecalis* e *S. aureus*.

O *E. faecalis* foi selecionado para este estudo, por ser prevalente em infecções endodônticas persistentes e especialmente, quadros em necrose de DPIs (9, 69). O gênero *Enterococci* pode sobreviver em diversas condições adversas incluindo pH alcalino extremo (9, 6) e em altas concentrações de sal (6, 9) (416). Este gênero, pode resistir a sais biliares, detergentes, metais pesados, etanol e sal azida (416). Além disso, tal gênero pode crescer no intervalo de 10 a 45 °C e sobreviver em uma temperatura de 60 °C, durante 30 min (417). O *E. faecalis* está associado a diferentes formas de doença perirradicular, incluindo infecções endodônticas primárias e também infecções persistentes (418). Na categoria de infecções endodônticas primárias, o *E. faecalis* está presente em 40% delas (418). Além disso, esta bactéria foi encontrada no SCR de DPIs, mesmo após a utilização de TAP e de uma associação de Ca(OH)₂ e clorexidina 2% (9). O *E. faecalis* ainda possui certos fatores

de virulência, incluindo enzimas líticas, citolisina, substância de agregação e ácido lipotecóico (419).

Já o *S. aureus*, pode ser outra bactéria encontrado em quadros de pulpíte, podendo ter como principal mecanismo de virulência o *quorum-sensing* (420). Este fator contribui para o controle da patogênese deste microrganismo, que está envolvida com a densidade que ocorre através das comunicações celulares (421). O *S. aureus* possui forma arredondada, o que facilita sua adesão e conformação de seu biofilme (422). Além disso, o *S. aureus* foi relacionado com lesões endo-perio refratárias de origem apical, o que dificulta os processos de regeneração e revascularização em DPIs (423).

Nos achados deste estudo, tanto CIP, quanto a MNC apresentaram os melhores resultados entre os antimicrobianos de DAP e TAP, tanto para a bactéria *S. aureus*, quanto para *E. faecalis*. Em contrapartida, o metronidazol não apresentou ação contra estes microrganismos na maior concentração testada (256 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O CIP, pode ser caracterizado como uma fluoroquinona e pode atuar principalmente em três enzimas: DNA-girase, a topoisomerase do tipo IIA e a topoisomerase IV (319). Apesar deste fármaco ser indicado principalmente para bactérias Gram-negativas, alguns estudos relatam o potencial desta medicação contra diversas bactérias Gram-positivas (424-426). Em seu efeito antimicrobiano especificamente em Gram-positivas, o CIP atua em bactérias que estejam realizando divisão celular, bem como realizando a síntese de proteínas oriundas de RNA, sendo este último, o principal mecanismo de ação relacionado com bactérias do gênero *Staphylococci* (427). O potencial do CIP contra *S. aureus in vitro* foi avaliado e foram encontrados valores em um intervalo de 0,1 a 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (428). Já os valores encontrados de concentração inibitória mínima de CIP para *E. faecalis* na literatura, variam entre 0,125 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (429-431). O potencial dos antimicrobianos utilizados na pasta tripla antibiótica isoladamente foi avaliado e percebeu-se que os melhores resultados foram encontrados para CIP, tanto para *E. faecalis*, quanto para *S. aureus*, sendo constatados os valores de 0,5 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Neste mesmo estudo, a associação de CIP com propilenoglicol reduziu ainda mais a CIM encontrada para o *E. faecalis*, caindo para 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (432). Diante de seus resultados positivos em relação aos outros fármacos da TAP, algumas aplicações bionanotecnológicas com CIP no contexto da revascularização pulpar vem sendo estudadas (277, 325). Um estudo demonstrou uma considerável redução do biofilme de *E. faecalis* na

presença de nanofibras compostas pelo polímero polidioxanona em 25% em peso de CIP (325).

Por outro lado, a MNC pode ser caracterizada como uma tetraciclina de segunda geração e pode apresentar ação antimicrobiana, tanto contra bactérias Gram-positivas, quanto bactérias Gram-negativas (338). Em comparação com outras tetraciclinas, a MNC possui sua melhor ação em pH neutro, resultando em lipofilicidade aumentada (433). Essa característica lipofílica da MNC resulta em um composto com uma maior meia-vida, melhor absorção oral, maior penetração do tecido comparada com outras tetraciclinas (434). Dentre as tetraciclinas, a MNC é uma das que apresenta menores mecanismos de resistência relatados na literatura (434). Semelhante a outros fármacos desta classe, a MNC inibe a síntese de proteínas bacterianas (435). Esta classe ainda pode exibir os seus efeitos antibacterianos por ligação reversível a um único local de alta afinidade de subunidade 30S ribossomal, resultando em mudanças conformacionais no RNA ribossômico 16S (436). Devido a estas alterações ribossomais, a MNC pode apresentar tanto efeito bacteriostático, quanto bactericida (437). As ações antimicrobianas deste fármaco estão bem estabelecidos tanto sobre *E. faecalis*, quanto sobre *S. aureus*. O potencial deste antimicrobiano foi avaliado contra diferentes cepas de *E. faecalis* ATCC tanto em caldo, quanto em biofilme, e foi constatado que a concentração de $0,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ era eficaz para uma ação bacteriostática e ao mesmo tempo, redução do biofilme de todas as cepas testadas (438). Outros trabalhos relatam uma CIM $\leq 4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o gênero *Enterococci* (439). Já em relação a *S. aureus*, a MNC apresentou ação antimicrobiana contra cepas resistentes à metilina com concentrações abaixo de $8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (440). Porém, apesar de seus resultados antimicrobianos favoráveis, este fármaco tem sido relatado com o escurecimento da dentina (233). Assim, muitos protocolos atuais para utilização de associação de antibióticos para a revascularização pulpar, descartam a agregação desta molécula (216). Tetraciclinas possuem uma forte atração química por íons de cálcio (Ca^{2+}) e sabe-se que uma reação de quelatação está associada com a descoloração dentinária (337). Através dos túbulos dentinários, a MNC consegue atingir as camadas mais externas do dente (312). Um estudo *in vitro* comprovou a formação espontânea de um precipitado, quando uma solução de MNC foi adicionada à uma solução de apatita sob condições de forte acidez (441). Portanto, o uso da MNC e de outros fármacos pertencentes à classe das tetraciclinas supostamente podem

ser descartados em DPIs, a fim de evitar a degradação do principal componente da dentina e do esmalte dentinário, a hidroxiapatita (62).

O MTZ pode ser considerado um nitroimidazólico que possui ação contra protozoários como *T. vaginalis*, mas também apresenta diversas ações antimicrobianas contra microrganismos anaeróbios restritos e facultativos (334, 442). Como a restrição de oxigênio é evidente no SCR, o uso deste fármaco foi defendido para infecções pulpares por Hoshino e colaboradores, após avaliar o potencial do MTZ contra diversas bactérias causadoras da cárie (443). Os mecanismos de ação relacionados com o MTZ ainda não estão elucidados, mas sugere-se que sua atividade antimicrobiana esteja relacionada com os metabólitos ativos, produzidos após a ação enzimática bacteriana (332). Sendo assim, há muitas controvérsias sobre a real atividade antimicrobiana deste fármaco, envolvida com bactérias do gênero *Enterococci* (335). Além disso, diversos mecanismos de resistência tem sido apresentados para este fármaco, tais como a formação de bombas de efluxo, induzidas principalmente por bactérias formadoras de biofilme (444). O potencial do MTZ *in vitro* foi avaliado, e mesmo a maior concentração (16 mg.mL⁻¹) testada, este fármaco não foi capaz de inibir cepas ATCCs das espécies de *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *C. tropicalis*, e *C. albicans* (432). Em um outro trabalho, o MTZ se apresentou como o pior antimicrobiano da TAP, apresentando valores de CIM >1024 µg.mL⁻¹ para bactérias *E. faecalis*, tanto ATCC, quanto isoladas de lesões endodônticas refratárias (445).

Neste presente estudo, a DAP apresentou valores semelhantes de CIM em relação à TAP contra *E. faecalis* e um valor 2x menor para *S. aureus*. O primeiro trabalho a avaliar o potencial antimicrobiano da TAP, sugeriu a utilização de 25 µg.mL⁻¹ de cada antimicrobiano (CIP, MTZ e MNC) para os procedimentos de revascularização pulpar (227). Após este trabalho, outros poucos demonstraram o potencial destas pastas contra um grande número de microrganismos. Sato e colaboradores observaram que a utilização da combinação de 0,5 mg.mL⁻¹ de cada antimicrobiano era suficiente para remover a maior parte das UFCs presentes na dentina de dentes extraídos por pulpíte (446). A grande maioria dos trabalhos publicados *in vitro* ou *ex vivo* com DAP e TAP, estão direcionados principalmente a ação destas pastas sobre a espécie *E. faecalis* (6, 447, 448). Sendo assim, o potencial antimicrobiano residual de DAP e TAP foi avaliado em discos de dentina contra *E. faecalis*. Este, verificou que concentrações maiores de 1000 mg.mL⁻¹ testadas, foram

responsáveis por diminuir igualmente o biofilme desta bactéria (449). A atuação direta de DAP e TAP também foi semelhante, uma vez que foi observada a redução do biofilme de *E. faecalis* na concentração de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ao avaliar o efeito residual sobre UFCs presentes nas amostras, não houve diferença estatística nos grupos contendo TAP e DAP (450). Essa condição foi discutida pelos autores, baseando-se no fato da TAP possuir proporções iguais dos três fármacos, sendo sua atividade antimicrobiana voltada principalmente para CIP e MNC. A DAP possui concentrações de CIP maiores do que em TAP, o que pode explicar a ação semelhante destas moléculas (450). Em nosso estudo, as combinações dos fármacos não foram sinérgicas e o CIP sozinho, apresentou os menores valores de CIM. Um trabalho *in vitro*, observou que a CIM do CIP contra *E. Faecalis*, em combinação com MNC ou MTZ era tão eficaz quanto sua atuação sozinha. Logo, para este microrganismo especificamente, a associação dos três fármacos ou dois fármacos parece não representar uma melhora na ação antimicrobiana, já que a combinação foi considerada indiferente (447).

Em relação aos PDHs testados neste trabalho, DJK-6, LL-37 e IDR-1018 apresentaram CIMs superiores a 128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e IDR-1002 apresentou os menores valores de CIM, para ambas as bactérias (128 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *S. aureus* e 64 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *E. faecalis*). O DJK-6 pode ser considerado um PDH sintético D-enantiômero, criado para ser mais resistente que IDR-1018 (L-enantiômero), em relação à degradação enzimática (11). Até então, nenhum trabalho avaliou o potencial deste peptídeo contra *E. faecalis* e contra *S. aureus*. O DJK-6, assim como seu semelhante DJK-5, são peptídeos com considerável ação anti-biofilme (11). Tal biomolécula foi capaz de reduzir significativamente o biofilme de *P. aeruginosa* na concentração de 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Ademais, este peptídeo demonstrou ação antimicrobiana contra diversas espécies multiresistentes, tais como *K. pneumoniae*, *S. enterica*, *E. coli* e *A. baumannii* (11, 379). O mecanismo de ação de DJK-6 pode estar relacionado com a degradação do sinal para a formação de biofilme e manutenção GPGPP. O potencial do similar de DJK-6 (DJK-5) foi avaliado e demonstrou a redução em 80% do biofilme de *E. faecalis* e *S. mutans* na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (374).

O potencial antimicrobiano de LL-37 tem sido amplamente explorado (451). Esta catelicidina apresenta ação antimicrobiana contra diversas bactérias tanto Gram-positivas, quanto Gram-negativas, como já descrito (352). A análise da estrutura de LL-37 indica que peptídeos catiônicos desta classe possuem elementos que podem

interagir com a carga negativa da parede bacteriana. Além disso, a LL-37 pode formar poros toroidais na membrana plasmática, com consequente desequilíbrio osmótico intracelular (452). A interação membranar de LL-37 em bactérias Gram-negativas pode estar relacionada com o LPS e em Gram-positivas, com o ácido lipotecóico (13). O potencial da LL-37 foi avaliado sobre diversas bactérias da cavidade oral e encontrou uma CIM de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *E. faecalis* (372). Em um outro trabalho, esta catelicidina apresentou uma CIM de $40 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para este microrganismo (453). Em relação à *S. aureus*, a LL-37 se apresentou de forma ineficaz contra esta bactéria *in vitro*, apresentando valores de CIM $> 512 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (454). Porém, outro estudo avaliou o potencial deste peptídeo contra *S. aureus* ATCC e encontrou valores de CIM de $14 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (455). Diante dos resultados controversos da atividade antimicrobiana de LL-37, alguns estudos já relatam mecanismos de resistência para este peptídeo. O *S. aureus* por exemplo, pode produzir proteinases tais como aureolisina e V8 proteinase, que estão relacionadas com a degradação de LL-37 (456). A gelatinase produzida por *E. faecalis* também foi relacionada a degradação deste peptídeo (457).

O peptídeo sintético IDR-1018 vem sendo estudado pelo seu potencial antimicrobiano e imunomodulador (382). Esta biomolécula pode atuar tanto contra bactérias Gram-positivas, quanto Gram-negativas (382). As ações antimicrobianas relacionadas com IDR-1018, estão principalmente associadas com a redução do biofilme (11). O potencial anti-biofilme deste peptídeo foi avaliado demonstrando que a concentração de $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi capaz de reduzir o número de UFCs do biofilme de *E. faecalis* e de *S. mutans* (458). Além disso, este peptídeo apresentou uma CIM de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para *S. aureus* (380). Todavia, foi constatado que mesmo na maior concentração testada ($80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), esta biomolécula não foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis in vitro* (458). O mecanismo de ação de IDR-1018, assim como de DJK-6 pode estar relacionado com a degradação do sinal para a formação de biofilme e manutenção GPGPP (382). Outro mecanismo de ação deste peptídeo pode estar envolvido com uma desestruturação da parede celular, devido as suas características lipofílicas (380). Diante disso, o perfil imunomodulador deste PDH sintético pode ser mais relevante, comparada a sua ação antimicrobiana (459). O IDR-1018 pode ser capaz de reduzir citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α na presença de LPS, atrair leucócitos e direcionar uma resposta de macrófagos M2 (384).

O peptídeo IDR-1002 pode apresentar ação antimicrobiana direta, ou indireta (385). A ação direta de IDR-1002 pode estar envolvida com redução do biofilme

bacteriano (376). O potencial antimicrobiano desta biomolécula foi demonstrado, quando foi capaz de reduzir o biofilme de *S. aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, na concentração de $2,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (376). Além disso, o IDR-1002 foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus in vitro* com uma concentração de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (376). Até então, este trabalho foi o primeiro a avaliar o potencial desta biomolécula contra a bactéria *E. faecalis*. O mecanismo de ação do IDR-1002 especificamente ainda não está totalmente claro, porém, assim como IDR-1018 e DJK-6, este peptídeo pode atuar na desestruturação e comunicação celular durante os processos de formação e manutenção do biofilme (376). Para mais, através de seu potencial imunomodulador, o IDR-1002 pode contribuir para a proteção do organismo contra infecções por *S. aureus* e *E. coli*, através do recrutamento de leucócitos e diminuição de citocinas pró-inflamatórias (385).

Para a etapa da avaliação da combinação do melhor antimicrobiano (CIP) com o melhor peptídeo antimicrobiano (IDR-1002), foram encontradas associações sinérgicas, tanto para *E. faecalis*, quanto para *S. aureus* neste estudo. A interação do CIP com peptídeos antimicrobianos já havia sido descrita na literatura (11, 460). Uma combinação aditiva de CIP com nisina foi capaz de inibir o crescimento de *E. faecalis in vitro* (ICIF = 1) (461). Uma associação entre CIP com os peptídeos antimicrobianos DJK-5 e DJK-6 foi considerada sinérgica contra a bactéria *P. aeruginosa* (ICIF = 0,14 em combinação com DJK-6 e ICIF = 0,46 em combinação com DJK-6) (11). A combinação de DJK-6 com os fármacos imipenem (ICIF = 0,4) e meropenem (ICIF = 0,4) apresentou-se sinérgica contra isolados resistentes de *K. pneumoniae* (379). Contudo, um outro estudo avaliou o potencial de diversos antimicrobianos como CIP, clindamicina e gentamicina, em combinação com os PDHs temporim e citropin 1.1. Todas as interações entre os antimicrobianos e os peptídeos foram consideradas indiferentes (ICIFs entre 1,2 e 2) (462). Até então, nenhum estudo havia descrito a interação de IDR-1002 com qualquer outro antimicrobiano. A combinação entre duas biomoléculas antimicrobianas pode reduzir os riscos de resistência, problema que só tem crescido nos últimos anos (463). Frente a esse paradigma, os PDHs podem reduzir os índices de resistência em junção com antimicrobianos convencionais (464). A ação membrana dos PDHs pode aumentar a permeabilidade celular e potencializar a ação de outros fármacos (465). Ademais, essas associações podem colaborar para o desenvolvimento de novas medicações intracanalais, candidatas para a revascularização pulpar.

A partir dos resultados encontrados na etapa antimicrobiana (etapa 1) deste estudo, apenas os peptídeos LL-37 e IDR-1002 (sozinho ou em combinação com CIP), o CIP (sozinho) e as pastas DAP e TAP prosseguiram para a etapa 2. Além disso, as concentrações clínicas de DAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e TAP ($75 \mu\text{g.mL}^{-1}$) também foram testadas nesta etapa, que envolveu a viabilidade celular e a produção do mediador NO em linhagem de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929.

Deste modo, durante os processos de revascularização pulpar, células-tronco são essenciais para a formação de uma nova polpa (290). Porém, o papel de macrófagos e fibroblastos nestas condições ainda não está elucidado, e pode ser um diferencial para a regeneração deste tecido (466). Nas condições de necrose pulpar, os macrófagos estão presentes na porção perirradicular e durante a etapa de sobreinstrumentação (que gera uma agressão mecânica), são atraídos para o SCR (467). Um maior número de macrófagos no SCR até os 14 primeiros dias foi observado, após a indução de revascularização pulpar em camundongos (467). Por outro lado, os fibroblastos, assim como as SCAP, são as células mais abundantes na região apical e serão responsáveis pela migração e estabelecimento de um novo tecido conjuntivo no SCR (468). Sendo assim, uma medicação intracanal não deve destruir estas células (469). Nesse sentido, a ausência de toxicidade se torna fundamental para a biocompatibilidade e consequentemente aplicação clínica de uma nova molécula (470).

A viabilidade celular foi definida a partir do ensaio de MTT. Tal método se baseia na capacidade das células viáveis reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo no produto formazan (409). Consistindo o MTT a avaliação da atividade da enzima desidrogenase mitocondrial, a quantidade de produto é detectada pela leitura da absorbância. Já a produção de NO através do método de Green, baseia-se na mensuração deste mediador através de uma curva padrão de nitrito (413). Nenhum dos grupos contendo os PDHs (IDR-1002 e LL-37), as pastas DAP e TAP (tanto nas concentrações de CIM encontradas neste estudo, quanto clínicas), CIP (sozinho) e a associação de IDR-1002 com CIP reduziram a viabilidade celular em monócitos RAW 264.7 e fibroblastos L929, após 72 h.

O uso da TAP e DAP tem sido questionado pelo seu potencial efeito citotóxico (228). Porém, não há um consenso na literatura sobre as concentrações consideradas antimicrobianas e ao mesmo tempo citotóxicas (471). Até então, nenhum trabalho havia descrito a viabilidade celular destas pastas sobre macrófagos RAW 264.7 ou

sobre fibroblastos L929. No entanto, a capacidade citotóxica de DAP e TAP já vem sendo discutida sobre outras células, tais como SCAPs, DSCs e fibroblastos gengivais (8, 314, 315). O potencial citotóxico residual de TAP e DAP sobre SCAPs foi avaliado em blocos de dentina. A concentração de 1000 mg.mL⁻¹ destas pastas foi responsável por eliminar 100% das células após 7 dias de incubação. Concentrações de 1 mg.mL⁻¹ não foram consideradas citotóxicas para a TAP e DAP neste mesmo período e ademais, não houve diferenças estatísticas nos grupos contendo DAP ou TAP (8). Já o efeito citotóxico direto de DAP e TAP sobre as SCAPs foi testado em diferentes concentrações (0,01; 0,1; 1 e 100 mg.ml⁻¹). As concentrações a partir de 1 mg.ml⁻¹ foram consideradas citotóxicas para estas células para ambas pastas, após um período de 72 h (314). TAP e DAP também foram testadas em culturas de DSCs. As concentrações até 0,3 mg.ml⁻¹ de DAP não foram consideradas citotóxicas, enquanto que as concentrações até 2 mg.ml⁻¹ de TAP, também não foram consideradas citotóxicas (308). Tal estudo sugeriu que DAP apresenta um efeito mais citotóxico do que TAP (308). Possíveis explicações para as diferenças entre as concentrações citotóxicas destas pastas em vários estudos poderiam ser: a utilização de diferentes ensaios citotóxicos, diferentes fontes de antibióticos, o uso de diferentes tipo de células (SCAPs ou DSCs), ou ainda as diferentes técnicas empregadas para a preparação das amostras. Outra questão importante, é que os protocolos de utilização da TAP sugeridos, por Hoshino e colaboradores e DAP, sugeridos por Iwaya e colaboradores, não são fielmente seguidos clinicamente (305). As concentrações clínicas realmente usadas para os processos de revascularização pulpar são de aproximadamente 1000 mg.mL⁻¹ (8).

As quinolonas podem ser consideradas fármacos seguros e com número reduzidos de efeitos colaterais (472). A ação citotóxica do CIP sobre uma linhagem de macrófagos foi avaliada *in vitro*, baseando-se na CIM encontrada (0,014 µg.mL⁻¹) para as bactérias *Legionella pneumophila* e *Acanthamoeba castellanii*. Após 24 de incubação, este fármaco não alterou a viabilidade celular dos macrófagos (473). Em um outro estudo, a concentração do CIP capaz de inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (0,25 µg.mL⁻¹) não alterou a viabilidade de uma linhagem de células epiteliais pulmonares, após 24 h de incubação (474). Em contrapartida, um outro estudo constatou a citotoxicidade de CIP na concentração de 50 µg.mL⁻¹ em linhagem de linfócitos murinos, após 72 h de incubação. A citotoxicidade de CIP neste trabalho, foi relacionada as alterações na estrutura dos cromossomos das células

estudadas (475). Ademais, nanofibras de polidioxanona contendo CIP 5 % em peso não reduzem a viabilidade de DPSCs *in vitro*, após 72 de incubação (476). Outro estudo envolvendo nanofibras de poliálcoolvinil (PVA) com CIP 2,5 % estimulou a proliferação celular da linhagem de fibroblastos L929, após 72h de incubação (477).

Os PDHs podem apresentar atividade antimicrobiana e ao mesmo tempo não reduzem a viabilidade celular (478). O IDR-1002 tem sido considerado um potencial imunomodulador biocompatível (385). Foi constatado que concentrações de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não foram capazes de reduzir a viabilidade celular em fibroblastos sinoviais humanos *in vitro*, após 24 h de incubação (479). A concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 também não alterou significativamente a viabilidade de macrófagos humanos *in vitro*, após 24 h de incubação (480). Sendo assim, a associação de IDR-1002 (16 ou 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com o CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentada neste estudo, não foi capaz de reduzir a viabilidade celular tanto de macrófagos RAW 264.7, quanto fibroblastos L929.

Em relação à produção de NO, DAP (1 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), TAP (2 e 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e as associações de IDR-1002 (16 ou 32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) induziram a produção do mediador NO, em macrófagos RAW 264.7. Em fibroblastos L929, o grupo contendo DAP (75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) reduziu a produção deste mediador. O NO é um radical livre gasoso produzido pela NO-sintase, convertendo L-arginina em L-citrulina (156). Altas concentrações do óxido nítrico indutível (NO_2) podem ser danosas aos tecidos (158). Até o presente momento, este é o primeiro estudo que avalia a produção de NO em macrófagos induzida por DAP e TAP. Em relação aos componentes da TAP ou DAP, um outro estudo observou a indução de NO por CIP (0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em macrófagos murinos após 20 h de incubação (481). Em contrapartida, a MNC pode inibir a síntese de nitrito. A diminuição da produção de nitrito em células RAW 264.7 foi observada, na presença de 100 μM de MTZ ou de MNC, após 20 h de incubação (482). Estudos envolvendo a produção de NO induzido pela presença de IDR-1002 ainda não foram aparentemente publicados, mas o aumento da produção deste mediador nas combinações deste peptídeo com CIP, podem estar relacionadas com este último, que possui capacidade de induzir a produção de NO em macrófagos (481).

Os experimentos subsequentes deste trabalho (etapa 3) envolveram a construção de um modelo de infecção endodôntica *in vitro* com a utilização de duas linhagens celulares de macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929. A resposta imune

inata gera uma ação contra patógenos presentes no SCRs que atraem macrófagos teciduais ativados até o local da inflamação, para o combate dos microrganismos (483). Já os fibroblastos, se apresentam como as células mais abundantes na região apical e podem estar diretamente envolvidas com os processos de reconstrução tecidual após a revascularização pulpar (484). Com o estímulo do *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis* e a utilização do recombinante de IFN- γ foi possível mimetizar uma situação de infecção *in vitro*, por ambos microrganismos.

Sendo assim, várias concentrações de *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis* foram testadas. Neste estudo, os estímulos de *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis* não foram capazes de diminuir a viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7, mesmo nas concentrações testadas mais altas. No entanto, ambos os antígenos alteraram a morfologia celular com ou sem rIFN- γ . Estes resultados foram também observados em um trabalho anterior, após macrófagos RAW 264.7 permanecerem viáveis mesmo em concentrações mais elevadas de *HK-S. aureus* (10^8 UFC.mL⁻¹), após 48 h de incubação (485). Ademais, em nosso trabalho, a presença de diferentes concentrações de antígenos de *S. aureus* e *E. faecalis* também não reduziu a viabilidade dos fibroblastos L929. Nesse sentido, foi constatado que a presença de *HK-P. gingivalis* não foi considerada citotóxica em fibroblastos do ligamento periodontal, após 48 h de incubação, mesmo na proporção bactérias/células de 1:100 (486).

Os principais eventos relatados com a presença de antígenos no SCR estão relacionados a mudanças no padrão de resposta e produção de mediadores por essas células (135). Diante disso, o presente estudo demonstrou que ambos os estímulos (*S. aureus* e *E. faecalis*) foram capazes de induzir a produção de NO em macrófagos RAW 264.7. A produção de NO em macrófagos na presença de estímulos de *S. aureus* parece ser dose-dependente. No entanto, na maior concentração, a síntese deste mediador específico não foi aumentada. Neste contexto, os macrófagos são considerados a primeira linha de defesa e em contato com antígenos, podem produzir NO, via enzima NO indutível (487). Fatores de virulência como LTA de bactérias Gram-positivas, o peptídeo glicol e fatores de adesão são geralmente associados com a indução de NO sintase em macrófagos (488). Aqui, as concentrações mais elevadas de antígenos, na presença de IFN- γ , não estimularam a produção de NO em macrófagos RAW 264.7. Em situações de supersaturação do antígeno, as células

imunológicas podem perder seu padrão de atuação e agir sem resposta, devido aos mecanismos de regulação imune mediada por linfócitos Treg (489, 490).

A presença de antígenos de *S. aureus* estimulou a produção de NO em todas as concentrações testadas, com ou sem IFN- γ em fibroblastos L929. Na presença de *E. faecalis*, a maior concentração de antígeno foi significativamente importante para induzir a produção de NO. Sabe-se que os fibroblastos apresentam um papel fundamental na reparação tecidual, mas também na resposta contra os antígenos pela produção de IL-6, MCS-F, TGF- β e NO (491, 492). Até então, os estímulos clássicos estudados para a avaliação da produção de NO em L929 são IFN- γ , LPS ou ambos (493). Desta forma, a produção de NO em fibroblastos de polpa humana em resposta a *HK-E. faecalis* pode aumentar a fosfatase alcalina em fibroblastos e conseqüentemente, a calcificação da polpa (162). Além disso, altas concentrações de NO e outras citocinas pró-inflamatórias em fibroblastos pode favorecer a expressão de OPG nessas células e conseqüentemente a formação de um tecido pulpar calcificado (494).

Para a etapa imunomodulatória, a viabilidade celular envolveu os peptídeos LL-37 e IDR-1002, as pastas TAP e DAP e a associação de IDR-1002 e CIP com ou sem os estímulos *HK-S. aureus* ou *HK-E. faecalis* com rIFN- γ . Estes dados foram compilados após 24 e 72 h, em macrófagos RAW 264.7 e 48 e 72 h, em fibroblastos L929. Em relação a célula RAW 264.7, apenas a TAP reduziu a viabilidade em 24 h de incubação destas células, sem a presença dos estímulos testados. Já em 72 h, esta pasta elevou a proliferação celular na presença dos estímulo de *HK-S. aureus* com rIFN- γ . Como já discutido, a citotoxicidade da TAP vem sendo estudada, principalmente relacionada com as concentrações que realmente são utilizadas clinicamente (8). Frente as desvantagens relacionadas a sua citotoxicidade, alguns trabalhos discutem a melhor forma da remoção desta medicação do SCR após a sua ação antimicrobiana (495, 496). O objetivo pode ser a diminuição ao máximo do contato desta, com o novo tecido formado (497). Nesse sentido, diferentes protocolos de irrigação para a remoção da TAP em blocos de dentina foram avaliados e nenhum deles foi completamente efetivo. A irrigação ultrassônica passiva associada ao hipoclorito de sódio a 1% seria o mais eficaz (498).

Em relação à célula L929, apenas a LL-37 reduziu a viabilidade celular em 48 e 72 h tanto na ausência de estímulos, quanto na presença de *HK-S. aureus* com rIFN- γ ou *HK-E. faecalis* com rIFN- γ . Nos dados apresentados pela literatura, a LL-37

não se apresentou citotóxica até a concentração de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em células do músculo liso (499). Um outro estudo avaliou o potencial citotóxico desta catelecidina em células mesenquimais indiferenciadas da placenta. Neste estudo, $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram inseridos a cada dia, durante 3 dias e ao final, o ensaio de MTT revelou que esta concentração não foi citotóxica e ainda estimulou a proliferação celular (500). No entanto, um outro estudo observou que a utilização de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ deste peptídeo, inibe a migração de cardiomiócitos e fibroblastos de ratos. A inibição da migração nestas células foi relacionada com a ativação da via de sinalização 2X7R –MAPK (501). Para mais, a LL-37 ($8 \mu\text{M}$) foi responsável por induzir a apoptose em fibroblastos do ligamento periodontal (502).

A resposta imune pode ter um papel essencial na regeneração do tecido pulpar em DPIs (503). Uma resposta mediada por TH1 e macrófagos M1 pode contribuir para a exacerbação da inflamação e consequente destruição tecidual (504). Ao passo que uma resposta mediada por TH2 e macrófagos M2 pode contribuir para a resolução na inflamação tecidual e migração de células de reparo como fibroblastos (504).

Em relação à produção de citocinas por macrófagos RAW 264.7, a TAP apresentou um caráter pró-inflamatório (perfil M1), aumentando a síntese de IL-1 α , IL-6, IL-12 e TNF- α , além de aumentar a síntese do mediador NO, na ausência dos estímulos antigênicos. A pasta DAP aumentou a produção de IL-1 α , IL-6, TNF- α e o mediador NO, na ausência dos estímulos antigênicos. Este é o primeiro trabalho que avalia a ação destas pastas especificamente em macrófagos. Até então, alguns estudos haviam relatado o papel pró-inflamatório de TAP através de achados histológicos (48, 505). Pesquisadores inseriram tubos de polietireno contendo TAP na região dorsal subcutânea de camundongos. Após 21 dias, os achados histológicos demonstraram uma camada espessa de intensa resposta inflamatória, com a infiltração de leucócitos (principalmente neutrófilos) e fibroblastos. A avaliação da produção de citocinas por reação de polimerase em cadeia (PCR), demonstrou um aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias tais como: IL-17, TNF- α , IL-1 α e IL-1 β (505). O fato de TAP ter estimulado a produção de IL-12 e DAP não, pode estar relacionado com a presença da MNC. A MNC foi relatada como pró-inflamatória em macrófagos, induzindo a expressão de IL-12 e consequentemente, um perfil M1 de macrófagos (506). Em relação aos fibroblastos L929, em nosso trabalho, ambas as pastas aumentaram consideravelmente a produção de IL-6, na ausência dos estímulos antigênicos. A capacidade imunomodulatória foi de TAP e DAP em

fibroblastos gengivais foi avaliada através da mensuração das citocinas IL-1 α , IL-6, IL-12, IL-10 por PCR. Após 24h de incubação, apenas a citocina IL-6 no grupo contendo TAP encontrou-se aumentada em relação ao controle (315).

Com a adição dos antígenos e rIFN- γ nas culturas de macrófagos RAW 264.7, a TAP diminuiu a produção de IL-6 e IL-12, na presença de *HK-S. aureus*. Na presença de *HK-E. faecalis*, esta pasta foi responsável pela diminuição da produção de IL-1 α , IL-6 e IL-12 e aumento de TNF- α e do mediador NO. A DAP diminuiu a produção de IL-6 na presença de *HK-S. aureus*. Com a adição de *HK-E. faecalis*, a DAP diminuiu a produção de IL-1 α e aumentou a produção de IL-12. A atuação imunomodulatória destas pastas em situações de estímulos microbianos ainda não está clara, porém uma competição entre os antígenos e as pastas por receptores presentes em macrófagos RAW 264.7, tais como TLR-2, TLR-4 e CD14, pode mudar o padrão de resposta imunológica destas células (507).

A ação do CIP (sozinho), aparentemente promoveu um aumento na expressão de IL-6 e diminuiu na expressão de TNF- α em cultura de macrófagos RAW 264.7, na ausência de estímulos. Alguns estudos relatam que concentrações de até 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ deste fármaco podem estimular a produção de IL-6, ao passo que concentrações acima de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ podem inibir a síntese desta citocina em macrófagos (508, 509). Foi constatada a expressão de IL-6 e IL-8 em linhagem de células bronco-epiteliais na presença de 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de CIP, após 24 h de incubação (510). Em nossos resultados, o CIP foi responsável por reduzir a expressão de IL-6 em macrófagos RAW 264.7, na presença de *HK-S. aureus* e de IL-12, na presença de ambos os antígenos. Em fibroblastos L929, o CIP reduziu a produção de IL-6 sem estímulo e reduziu a expressão de NO, na presença de *HK-E. faecalis*. As quinolonas apresentam geralmente uma característica anti-inflamatória sobre monócitos e macrófagos na presença de estímulos bacterianos (511). Nestas condições, o efeito imunossupressor de CIP parece ser dose-dependente (512). O CIP (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pode ser capaz de aumentar a produção de IL-6 e diminuir TNF- α em macrófagos, na presença de LPS (510). O CIP (0,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) também foi capaz de inibir a produção de IL-12 na presença de IL-18, após 24 h de incubação (512). O papel imunomodulatório do CIP pode estar relacionado com a atuação deste fármaco sobre a enzima topoisomerase 2, ou através da ativação das vias de sinalização JNK e NF- κB (513).

A LL-37 aparentemente foi responsável por aumentar a produção de IL-6 e diminuir TNF- α , em macrófagos RAW 264.7 sem estímulos. Estes dados corroboram

com um outro estudo presente na literatura, que observou que $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ deste peptídeo aumentou a produção de IL-6 em uma linhagem de micróglia, na ausência de estímulos adicionais (514). Já na presença dos antígenos e rIFN- γ , este PDH foi responsável pela diminuição da produção de IL-6 e IL-12 na presença de *HK-S. aureus* e IL-12, na presença de *HK-E. faecalis*. Neste sentido, sabe-se que LL-37 pode interagir com membranas celulares, afetar a superfície celular, além de atuar em diversos receptores (390). Além disso, a LL-37 pode exercer efeitos tanto pró, quanto anti-inflamatórios diretos, pela estimulação das células do sistema imune, ou indiretos, através da quimiotaxia ou modulação de uma citocina específica (13). Assim, a LL-37 (na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pode estimular um perfil de macrófagos M2, na presença de LPS e IFN- γ , com a liberação de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 e a diminuição de TNF- α (515). O LTA presente em ambos os antígenos estudados pode ser reconhecido por macrófagos através dos receptores TLR-2 e TLR-4 e gerar uma resposta pró-inflamatória (516). Um estudo também demonstrou que a LL-37 (na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pode inibir a resposta pró-inflamatória de macrófagos RAW 264.7 na presença de LTA, através da diminuição das citocinas TNF- α e IL-6 (517). A imunomodulação induzida por LL-37 foi relacionada com as vias de sinalização p38 e MAPK (517). Ademais, a LL-37 ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) pode aumentar a fagocitose de macrófagos sobre antígenos de *S. aureus*, pela ativação do receptor $\alpha\text{M}\beta_2$ (Mac-1,CD11b/CD18) (518). No mais, a associação da LL-37 (na concentração de $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e IL-1 β pode atenuar a resposta inflamatória em macrófagos humanos *in vitro*, aumentando a expressão das citocinas IL-6, MCP-1 e MCP3. A associação entre a LL-37 e a IL-1 β estimulou macrófagos a produzir IL-12 na mesma proporção que o rIFN- γ (519). Essa associação pró-inflamatória foi relacionada com as vias de sinalização NF- κB , p50 e p65 (519). Em outro trabalho com macrófagos humanos, a LL-37 (na concentração de $2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi capaz de inibir a expressão de TNF- α , IL-6 e o mediador NO nesta linhagem, na presença de polissacarídeo oriundo de *Neisseria meningitidis*. Essa ação anti-inflamatória da LL-37 foi associada com a ativação dos receptores TLR2 e TLR4 (520). Em um outro trabalho, a LL-37 (na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) associada ao fator estimulador de colônia de macrófagos (MCS-F) foi responsável por polarizar macrófagos humanos *in vitro*, em perfil M2. A atividade pró-M2 de LL-37 com MCS-F, foi envolvida com a ativação do receptor de peptídeo formil 2 (FPR2) (521). Para mais, a catelicidina LL-37 (na concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foi capaz de inibir a expressão de genes das citocinas de TNF- α e IL-1 β pela ativação de

TLR-2, TLR-4 e TLR-9 em macrófagos, na presença de LPS. Esta ativação foi relacionada com a via de sinalização NF- κ B (522). Ademais, a LL-37 (na concentração de 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pode estimular macrófagos quando estes são infectados com este *Mycobacterium tuberculosis*, contribuindo para o aumento das citocinas IL-10 e TGF- β e TNF- α e diminuição de IL-17. Essa ação imunomodulatória da LL-37 foi independente do receptor P2X7 (523).

Em culturas dos fibroblastos L929, a LL-37 diminuiu a produção de IL-6 na ausência de estímulos e diminuiu a produção de NO, na presença de *HK-E. faecalis*. O papel da LL-37 nesta linhagem de fibroblastos ainda não foi descrita. Porém, a ação imunomodulatória desta catelicidina pode envolver fibroblastos gengivais, fibroblastos epiteliais e fibroblastos do ligamento periodontal. Fibroblastos gengivais humanos foram estimulados com LPS e as concentrações de 0,1, 1 e 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LL-37. A avaliação da produção das citocinas IL-6 e IL-8, após 18 h de incubação demonstrou que 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ deste PDH, foi capaz de reduzir a níveis basais a expressão de ambas citocinas. Vários mecanismos de ação foram apresentados pela ação anti-inflamatória deste peptídeo, tais como os receptores TLR2 e TLR1 e também as vias de sinalização p38, MAPK e IRF3 (524). Além do LPS, o antígeno *HK-P. gingivalis* foi adicionado em culturas de fibroblastos gengivais na presença de 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de LL-37 e as citocinas IL-6 e IL-8 foram avaliadas por ELISA, após 24 h de incubação. A presença da LL-37 foi responsável por reduzir significativamente a produção de ambas as citocinas. A inibição da síntese de IL-6 e IL-8 foi associada com a via de sinalização p38 e ERK (525). O potencial anti-inflamatório da LL-37 (8 μM) em fibroblastos do ligamento periodontal foi avaliado. Assim como no presente estudo, a LL-37 foi responsável por reduzir a expressão de IL-6 nestas células. A diminuição da expressão desta citocina foi relacionada com a ação apoptótica e a redução da síntese de DNA, induzida por este peptídeo (502). Na presença de IL-1 β , a LL-37 (10 μM) pode apresentar um caráter pró-inflamatório em fibroblastos gengivais, aumentando a síntese de IL-8. Essa ação pró-inflamatória pode estar relacionada com o receptor celular P2X7 e a via de sinalização p44/MAPK (526). Ademais, a LL-37 (16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) pode estar envolvida com a inibição da produção de IL-6 em fibroblastos epiteliais humanos, infectados com *S. aureus* (527).

O PDH IDR-1002 não alterou a produção de nenhuma das citocinas avaliadas em macrófagos RAW 264.7, na ausência de estímulos. No entanto, na presença dos antígenos e rIFN- γ , este PDH apresentou um caráter imunoprotetor, reduzindo a

expressão de IL-6 na presença de *HK-S. aureus*, além de IL-1 α , IL-6 e IL-12 na presença de *HK-E. faecalis* por estas células. Estes dados imunomoduladores estão condizentes com as características imunoprotetoras apresentadas por este PDH na literatura. Em um estudo realizado com macrófagos RAW 264.7 estimulados com LPS e IDR-1002 (20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), este PDH foi responsável por reduzir a expressão de TNF- α após 24h de incubação. A ação imunomodulatória desta biomolécula foi relacionada com a inibição da via de sinalização NF-kB e ativação das vias de sinalização p38, ERK1/2-MSK1 (480). Outro trabalho demonstrou que 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ deste peptídeo eram suficientes para aumentar a expressão do receptor CCR5, responsável pela quimiotaxia de monócitos através das citocinas CCL3 e CCL5. A ativação de CCR5 por IDR-1002, foi relacionada com a via de sinalização p38/MAPK. Além disso, este peptídeo está envolvido com o aumento da expressão de citocinas associadas com a quimiotaxia, como CCL2, CCL7, CXCL1 e CXCL8 (388). Para mais, a utilização *in vitro* de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 aumentou consideravelmente a expressão destas citocinas em monócitos humanos, quando comparados ao controle (sem IDR-1002) e ao grupo contendo LL-37. Esta ação imunomoduladora foi relacionada com as vias de sinalização NF-kB e MAPK (385). Além de sua ação em macrófagos e monócitos, o IDR-1002 (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi responsável por aumentar *in vitro* a presença de fatores de adesão (CD11b e CD62L) e ativação (CD64 e CD66b), em neutrófilos humanos estimulados com LPS. Ademais, este PDH foi responsável por reduzir a expressão de ROS e de TNF- α nestas células estimuladas com LPS. Os efeitos imunomoduladores em neutrófilos por IDR-1002 foram relatados com a via de sinalização MAPK (12). Em nosso estudo, o IDR-1002 foi responsável por reduzir IL-6 (na ausência de estímulos) e o mediador NO (na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ) em fibroblastos L929. Em um outro trabalho, o IDR-1002 (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi responsável pela diminuição da produção de IL-1 β , por fibroblastos sinoviais humanos *in vitro*, estimulados com MMP-3. Esse evento foi associado com o bloqueio das vias de sinalização JNK, MAPK e p38 (479).

Por fim, a associação de CIP e IDR-1002 não modificou sua ação imunoprotetora, aumentando apenas a produção de NO na ausência de estímulo. Na presença dos antígenos e rIFN- γ , essa associação reduziu a expressão de IL-6 e IL-12, na presença de *HK-S. aureus* e IL-1 α e IL-6, na presença de *HK-E. faecalis*. Em cultura de fibroblastos L929, essa associação aumentou (na ausência de estímulos) e reduziu (na presença de *HK-E. faecalis* e rIFN- γ), a expressão de IL-6. Pesquisadores

associaram CIP (na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com cloroquina (na concentração de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e observaram uma ação conjunta destes fármacos, aumentando a expressão de peróxido de oxigênio e o mediador NO, em macrófagos murinos infectados com *S. aureus* (528). Um outro estudo *in vitro* considerou sinérgica a combinação de $0,1 \mu\text{M}$ LL-37 e $20 \mu\text{M}$ HDB, que potencializou significativamente a capacidade de reduzir a expressão das citocinas GRO- α , IP-10, IL-6 e MCP-1 em fibroblastos gengivais humanos estimulados com LPS (529).

Diante dos diversos questionamentos sobre DAP e TAP nos processos de revascularização pulpar, os dados aqui apresentados podem contribuir para o entendimento sobre como elas atuam sobre bactérias comumente encontradas no SCR. Além disso, compreender como linhagens de macrófagos e fibroblastos podem reagir frente aos antígenos destas bactérias, na presença destas pastas ou PDHs. Vale ressaltar, que este trabalho é apenas um estudo *in vitro*, com diversas limitações que fogem às condições reais na cavidade bucal, sendo necessários outros estudos *in vivo* para a confirmação destes dados. Sendo assim, a sugestão da junção de um antimicrobiano (CIP) com um imunoprotetor (IDR-1002) pode cooperar para futuras construções de arcabouços com liberação controlada desta associação para terapias endodônticas em DPLs.

7 CONCLUSÕES

A partir do desfecho comportamental *in vitro* dos grupos experimentais testados, é possível concluir:

- O CIP apresentou o melhor resultado antimicrobiano dentre os fármacos das pastas DAP e TAP, contra *S. aureus* e *E. Faecalis*, enquanto o MTZ não apresentou ação antimicrobiana, mesmo nas maiores concentrações testadas.
- O IDR-1002 apresentou os melhores resultados antimicrobianos dentre os PDHs, além de atuar em sinergismo com CIP, em ambas bactérias estudadas.
- Os antígenos *HK-S. aureus* e *HK-E. faecalis* não diminuíram a viabilidade, porém alteraram a morfologia celular dos macrófagos RAW 264.7 e fibroblastos L929.
- A TAP ($2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) se apresentou citotóxica em monócitos RAW 264.7, após 24 h e a LL-37, diminuiu a viabilidade de fibroblastos L929 (em 48 e 72 h).
- As pastas DAP e TAP apresentaram um perfil pró-inflamatório na ausência de estímulos antigênicos, aumentando a produção de IL-1 α , IL-6, IL-12, TNF- α e NO em RAW 264.7, além de aumentar IL-6, em L929.
- As pastas DAP e TAP apresentaram um perfil e pró e anti-inflamatório na presença dos antígenos e rIFN- γ reduzindo a produção de IL-1 α , IL-10 e IL-6 e aumentando IL-12 e TNF- α , em RAW 264.7.
- O CIP, o IDR-1002 ou a associação de CIP e IDR-1002 apresentaram um perfil anti-inflamatório na presença dos antígenos e rIFN- γ , reduzindo IL-6 e IL-12, em RAW 264.7, além do NO, em L929.

Sendo assim, o CIP sozinho obteve os melhores resultados antimicrobianos, em comparação com DAP e TAP. Além disso, a associação de CIP e IDR-1002, se apresentou mais favorável em relação à capacidade imunomodulatória, quando comparada a estas pastas. Esses resultados sugerem estudos *in vivo*, para a confirmação do potencial destas moléculas em aplicações biotecnológicas para a revascularização/regeneração pulpar.

8 REFERÊNCIAS

1. Al-Ghamdi NS, Al-Nazhan S. Pulp revascularization of immature maxillary first premolar. *Journal of conservative dentistry : JCD*. 2015;18(6):496-9.
2. Alrahabi MK, Ali MM. Root canal revascularization. The beginning of a new era in endodontics. *Saudi medical journal*. 2014;35(5):429-34.
3. Andreasen JO, Bakland LK. Pulp regeneration after non-infected and infected necrosis, what type of tissue do we want? A review. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2012;28(1):13-8.
4. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *Journal of endodontics*. 2011;37(2):265-8.
5. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S52-7.
6. Abbaszadegan A, Dadolahi S, Gholami A, Moein MR, Hamedani S, Ghasemi Y, et al. Antimicrobial and Cytotoxic Activity of *Cinnamomum zeylanicum*, Calcium Hydroxide, and Triple Antibiotic Paste as Root Canal Dressing Materials. *The journal of contemporary dental practice*. 2016;17(2):105-13.
7. Vijayaraghavan R, Mathian VM, Sundaram AM, Karunakaran R, Vinodh S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2012;4(Suppl 2):S230-3.
8. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *Journal of endodontics*. 2014;40(4):521-5.
9. Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *Journal of endodontics*. 2014;40(6):778-83.
10. Lima SM, de Padua GM, Sousa MG, Freire Mde S, Franco OL, Rezende TM. Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections--biotechnological innovation in endodontics. *Biotechnology advances*. 2015;33(1):203-13.

11. de la Fuente-Nunez C, Reffuveille F, Mansour SC, Reckseidler-Zenteno SL, Hernandez D, Brackman G, et al. D-enantiomeric peptides that eradicate wild-type and multidrug-resistant biofilms and protect against lethal *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Chemistry & biology*. 2015;22(2):196-205.
12. Niyonsaba F, Madera L, Afacan N, Okumura K, Ogawa H, Hancock RE. The innate defense regulator peptides IDR-HH2, IDR-1002, and IDR-1018 modulate human neutrophil functions. *Journal of leukocyte biology*. 2013;94(1):159-70.
13. Xhindoli D, Pacor S, Benincasa M, Scocchi M, Gennaro R, Tossi A. The human cathelicidin LL-37--A pore-forming antibacterial peptide and host-cell modulator. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1858(3):546-66.
14. Jontell M, Okiji T, Dahlgren U, Bergenholtz G. Immune defense mechanisms of the dental pulp. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists*. 1998;9(2):179-200.
15. Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *Journal of anatomy*. 2003;202(2):195-203.
16. Goldberg M, Farges JC, Lacerda-Pinheiro S, Six N, Jegat N, Decup F, et al. Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. *Pharmacological research*. 2008;58(2):137-47.
17. Mitsiadis TA, Woloszyk A. Odyssey of human dental pulp stem cells and their remarkable ability to survive in extremely adverse conditions. *Frontiers in physiology*. 2015;6:99.
18. Glasstone S. The development of halved tooth germs; a study in experimental embryology. *Journal of anatomy*. 1952;86(1):12-5.
19. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in dermatology*. 2000;18(5):499-511.
20. Applebaum E. Oral histology and embryology. I. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology. 1951;4(8):1057-69.
21. Applebaum E. Oral histology and embryology. II. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology. 1951;4(9):1185-99.
22. Peled A, Sarig O, Samuelov L, Bertolini M, Ziv L, Weissglas-Volkov D, et al. Mutations in TSPEAR, Encoding a Regulator of Notch Signaling, Affect Tooth and Hair Follicle Morphogenesis. *PLoS genetics*. 2016;12(10):e1006369.

23. Koda N, Sato T, Shinohara M, Ichinose S, Ito Y, Nakamichi R, et al. Mohawk transcription factor regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Development*. 2016.
24. Martins JN, Marques D, Mata A, Carames J. Root and root canal morphology of the permanent dentition in a Caucasian population: A CBCT study. *International endodontic journal*. 2016.
25. Baldassari-Cruz LA, Walton RE, Johnson WT. Scanning electron microscopy and histologic analysis of an apexification "cap": a case report. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1998;86(4):465-8.
26. Rufas P, Jeanneau C, Rombouts C, Laurent P, About I. Complement C3a Mobilizes Dental Pulp Stem Cells and Specifically Guides Pulp Fibroblast Recruitment. *Journal of endodontics*. 2016;42(9):1377-84.
27. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1994;78(4):494-502.
28. Matsushita K, Motani R, Sakuta T, Nagaoka S, Matsuyama T, Abeyama K, et al. Lipopolysaccharide enhances the production of vascular endothelial growth factor by human pulp cells in culture. *Infection and immunity*. 1999;67(4):1633-9.
29. Sipert CR, Morandini AC, Modena KC, Dionisio TJ, Machado MA, Oliveira SH, et al. CCL3 and CXCL12 production in vitro by dental pulp fibroblasts from permanent and deciduous teeth stimulated by *Porphyromonas gingivalis* LPS. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2013;21(2):99-105.
30. Colombo JS, Moore AN, Hartgerink JD, D'Souza RN. Scaffolds to control inflammation and facilitate dental pulp regeneration. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S6-12.
31. Rizzi M, Migliario M, Rocchetti V, Tonello S, Reno F. Pre-odontoblast proliferation induced by near-infrared laser stimulation. *European review for medical and pharmacological sciences*. 2016;20(5):794-800.
32. Lesot H. Odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Journal of dental research*. 2000;79(9):1640-4.
33. Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H. Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connective tissue research*. 2003;44 Suppl 1:167-70.

34. Teti G, Salvatore V, Ruggeri A, Manzoli L, Gesi M, Orsini G, et al. In vitro reparative dentin: a biochemical and morphological study. *European journal of histochemistry : EJH*. 2013;57(3):e23.
35. Abrahao IJ, Martins MD, Katayama E, Antoniazzi JH, Segmentilli A, Marques MM. Collagen analysis in human tooth germ papillae. *Brazilian dental journal*. 2006;17(3):208-12.
36. Morrier JJ, Romeas A, Lacan E, Farges JC. A clinical and histological study of dental defects in a 10-year-old girl with pseudoxanthoma elasticum and amelogenesis imperfecta. *International journal of paediatric dentistry*. 2008;18(5):389-95.
37. Nikiforuk G. Posteruptive effects of nutrition on teeth. *Journal of dental research*. 1970;49(6):1252-62.
38. Tuculina MJ, Raescu M, Dascalu IT, Popescu M, Andreescu CF, Daguci C, et al. Indirect pulp capping in young patients: immunohistological study of pulp-dentin complex. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2013;54(4):1081-6.
39. Hilkens P, Fanton Y, Martens W, Gervois P, Struys T, Politis C, et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. *Stem cell research*. 2014;12(3):778-90.
40. Austah ON, Ruparel NB, Henry MA, Fajardo RJ, Schmitz JE, Diogenes A. Capsaicin-sensitive Innervation Modulates the Development of Apical Periodontitis. *Journal of endodontics*. 2016;42(10):1496-502.
41. Vacek Z, Plackova A, Bures H. Electron microscopy of innervation of human dental pulp. *Folia morphologica*. 1969;17(2):97-101.
42. Harris R, Griffin CJ. Fine structure of nerve endings in the human dental pulp. *Archives of oral biology*. 1968;13(7):773-8.
43. England MC, Pellis EG, Michanowicz AE. Histopathologic study of the effect of pulpal disease upon nerve fibers of the human dental pulp. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1974;38(5):783-90.
44. Abd-Elmeguid A, Yu DC. Dental pulp neurophysiology: part 1. Clinical and diagnostic implications. *Journal*. 2009;75(1):55-9.
45. Zhao Y, Wang L, Jin Y, Shi S. Fas ligand regulates the immunomodulatory properties of dental pulp stem cells. *Journal of dental research*. 2012;91(10):948-54.

46. Yu T, Volponi AA, Babb R, An Z, Sharpe PT. Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration. *Current topics in developmental biology*. 2015;115:187-212.
47. Patel R, Cohenca N. Maturogenesis of a cariously exposed immature permanent tooth using MTA for direct pulp capping: a case report. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2006;22(6):328-33.
48. Lin LM, Shimizu E, Gibbs JL, Loghin S, Ricucci D. Histologic and histobacteriologic observations of failed revascularization/revitalization therapy: a case report. *Journal of endodontics*. 2014;40(2):291-5.
49. Jadhav GR, Shah N, Logani A. Platelet-rich plasma supplemented revascularization of an immature tooth associated with a periapical lesion in a 40-year-old man. *Case reports in dentistry*. 2014;2014:479584.
50. Meschi N, Hilkens P, Lambrichts I, Van den Eynde K, Mavridou A, Strijbos O, et al. Regenerative endodontic procedure of an infected immature permanent human tooth: an immunohistological study. *Clinical oral investigations*. 2016;20(4):807-14.
51. Deliu IC, Neagoe CD, Bezna M, Genunche-Dumitrescu AV, Toma SC, Ungureanu BS, et al. Correlations between endothelial cell markers CD31, CD34 and CD105 in colorectal carcinoma. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2016;57(3):1025-30.
52. Maruyama T, Jeong J, Sheu TJ, Hsu W. Stem cells of the suture mesenchyme in craniofacial bone development, repair and regeneration. *Nature communications*. 2016;7:10526.
53. Aguilar P, Lertchirakarn V. Comparison of stem cell behaviors between indigenous high and low-CD24 percentage expressing cells of stem cells from apical papilla (SCAPs). *Tissue & cell*. 2016;48(5):397-406.
54. Scelza MZ, Campos CA, Scelza P, Adeodato CS, Barbosa IB, de Noronha F, et al. Evaluation of Inflammatory Response to Endodontic Sealers in a Bone Defect Animal Model. *The journal of contemporary dental practice*. 2016;17(7):536-41.
55. Keller JF, Carrouel F, Colomb E, Durand SH, Baudouin C, Msika P, et al. Toll-like receptor 2 activation by lipoteichoic acid induces differential production of pro-inflammatory cytokines in human odontoblasts, dental pulp fibroblasts and immature dendritic cells. *Immunobiology*. 2010;215(1):53-9.

56. Staquet MJ, Durand SH, Colomb E, Romeas A, Vincent C, Bleicher F, et al. Different roles of odontoblasts and fibroblasts in immunity. *Journal of dental research*. 2008;87(3):256-61.
57. Farges JC. Understanding dental pulp innate immunity--a basis for identifying new targets for therapeutic agents that dampen inflammation. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2009;17(3).
58. Martens L, Rajasekharan S, Cauwels R. Endodontic treatment of trauma-induced necrotic immature teeth using a tricalcium silicate-based bioactive cement. A report of 3 cases with 24-month follow-up. *European journal of paediatric dentistry : official journal of European Academy of Paediatric Dentistry*. 2016;17(1):24-8.
59. Blokland A, Watt RG, Tsakos G, Heilmann A. Traumatic dental injuries and socioeconomic position - findings from the Children's Dental Health Survey 2013. *Community dentistry and oral epidemiology*. 2016;44(6):586-91.
60. Ricucci D, Siqueira JF, Jr., Loghin S, Lin LM. Pulp and apical tissue response to deep caries in immature teeth: A histologic and histobacteriologic study. *Journal of dentistry*. 2017;56:19-32.
61. Barnett F. The role of endodontics in the treatment of luxated permanent teeth. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2002;18(2):47-56.
62. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *International endodontic journal*. 2012;45(3):294-305.
63. Wade WG. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacological research*. 2013;69(1):137-43.
64. Simon-Soro A, Mira A. Solving the etiology of dental caries. *Trends in microbiology*. 2015;23(2):76-82.
65. Edens MH, Khaled Y, Napenas JJ. Intraoral Pain Disorders. *Oral and maxillofacial surgery clinics of North America*. 2016;28(3):275-88.
66. Mantoku A, Chatani M, Aono K, Inohaya K, Kudo A. Osteoblast and osteoclast behaviors in the turnover of attachment bones during medaka tooth replacement. *Developmental biology*. 2016;409(2):370-81.

67. Mao JJ, Kim SG, Zhou J, Ye L, Cho S, Suzuki T, et al. Regenerative endodontics: barriers and strategies for clinical translation. *Dental clinics of North America*. 2012;56(3):639-49.
68. Murad CF, Sassone LM, Faveri M, Hirata R, Jr., Figueiredo L, Feres M. Microbial diversity in persistent root canal infections investigated by checkerboard DNA-DNA hybridization. *Journal of endodontics*. 2014;40(7):899-906.
69. Lins RX, de Oliveira Andrade A, Hirata Junior R, Wilson MJ, Lewis MA, Williams DW, et al. Antimicrobial resistance and virulence traits of *Enterococcus faecalis* from primary endodontic infections. *Journal of dentistry*. 2013;41(9):779-86.
70. Costalonga M, Herzberg MC. The oral microbiome and the immunobiology of periodontal disease and caries. *Immunology letters*. 2014;162(2 Pt A):22-38.
71. Archer NK, Mazaitis MJ, Costerton JW, Leid JG, Powers ME, Shirtliff ME. *Staphylococcus aureus* biofilms: properties, regulation, and roles in human disease. *Virulence*. 2011;2(5):445-59.
72. Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. Effectiveness of endodontic disinfecting solutions against young and old *Enterococcus faecalis* biofilms in dentin canals. *Journal of endodontics*. 2012;38(10):1376-9.
73. McConoughey SJ, Howlin R, Granger JF, Manring MM, Calhoun JH, Shirtliff M, et al. Biofilms in periprosthetic orthopedic infections. *Future microbiology*. 2014;9(8):987-1007.
74. Hoiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(4):322-32.
75. Laureti L, Matic I, Gutierrez A. Bacterial Responses and Genome Instability Induced by Subinhibitory Concentrations of Antibiotics. *Antibiotics*. 2013;2(1):100-14.
76. Ballal N, Kundabala M, Bhat K, Acharya S, Ballal M, Kumar R, et al. Susceptibility of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* to Chitosan, Chlorhexidine gluconate and their combination in vitro. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2009;35(1):29-33.
77. Lee P, Tan KS. Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Archives of oral biology*. 2015;60(3):393-9.
78. Al-Nazhan S, Al-Sulaiman A, Al-Rasheed F, Alnajjar F, Al-Abdulwahab B, Al-Badah A. Microorganism penetration in dentinal tubules of instrumented and retreated root canal walls. In vitro SEM study. *Restorative dentistry & endodontics*. 2014;39(4):258-64.

79. Siqueira JF, Jr. Endodontic infections: concepts, paradigms, and perspectives. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2002;94(3):281-93.
80. Lebeaux D, Ghigo JM, Beloin C. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 2014;78(3):510-43.
81. Sousa RP, Zanin IC, Lima JP, Vasconcelos SM, Melo MA, Beltrao HC, et al. In situ effects of restorative materials on dental biofilm and enamel demineralisation. *Journal of dentistry*. 2009;37(1):44-51.
82. Jiang W, Lv H, Wang H, Wang D, Sun S, Jia Q, et al. Activation of the NLRP3/caspase-1 inflammasome in human dental pulp tissue and human dental pulp fibroblasts. *Cell and tissue research*. 2015;361(2):541-55.
83. Schmalz G, Krifka S, Schweikl H. Toll-like receptors, LPS, and dental monomers. *Advances in dental research*. 2011;23(3):302-6.
84. Zhou Y, Qian M, Liang Y, Liu Y, Yang X, Jiang T, et al. Effects of leukemia inhibitory factor on proliferation and odontoblastic differentiation of human dental pulp cells. *Journal of endodontics*. 2011;37(6):819-24.
85. Renard E, Gaudin A, Bienvenu G, Amiaud J, Farges JC, Cuturi MC, et al. Immune Cells and Molecular Networks in Experimentally Induced Pulpitis. *Journal of dental research*. 2016;95(2):196-205.
86. Stabholz A, McArthur WP. Cellular immune response of patients with periapical pathosis to necrotic dental pulp antigens determined by release of LIF. *Journal of endodontics*. 1978;4(9):282-7.
87. Hui T, Wang C, Chen D, Zheng L, Huang D, Ye L. Epigenetic regulation in dental pulp inflammation. *Oral diseases*. 2017;23(1):22-8.
88. Farges JC, Alliot-Licht B, Renard E, Ducret M, Gaudin A, Smith AJ, et al. Dental Pulp Defence and Repair Mechanisms in Dental Caries. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:230251.
89. Kokkas A, Goulas A, Stavrianos C, Anogianakis G. The role of cytokines in pulp inflammation. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2011;25(3):303-11.
90. Toda N, Ayajiki K, Okamura T. Neurogenic and endothelial nitric oxide regulates blood circulation in lingual and other oral tissues. *Journal of cardiovascular pharmacology*. 2012;60(1):100-8.

91. Fouad AF, Verma P. Healing after regenerative procedures with and without pulpal infection. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S58-64.
92. Awawdeh L, Lundy FT, Shaw C, Lamey PJ, Linden GJ, Kennedy JG. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonin gene-related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *International endodontic journal*. 2002;35(1):30-6.
93. Caviedes-Bucheli J, Lombana N, Azuero-Holguin MM, Munoz HR. Quantification of neuropeptides (calcitonin gene-related peptide, substance P, neurokinin A, neuropeptide Y and vasoactive intestinal polypeptide) expressed in healthy and inflamed human dental pulp. *International endodontic journal*. 2006;39(5):394-400.
94. Caviedes-Bucheli J, Camargo-Beltran C, Gomez-la-Rotta AM, Moreno SC, Abello GC, Gonzalez-Escobar JM. Expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in irreversible acute pulpitis. *Journal of endodontics*. 2004;30(4):201-4.
95. Caviedes-Bucheli J, Arenas N, Guiza O, Moncada NA, Moreno GC, Diaz E, et al. Calcitonin gene-related peptide receptor expression in healthy and inflamed human pulp tissue. *International endodontic journal*. 2005;38(10):712-7.
96. Eba H, Murasawa Y, Iohara K, Isogai Z, Nakamura H, Nakamura H, et al. The anti-inflammatory effects of matrix metalloproteinase-3 on irreversible pulpitis of mature erupted teeth. *PloS one*. 2012;7(12):e52523.
97. Wehner C, Janjic K, Agis H. Relevance of the plasminogen system in physiology, pathology, and regeneration of oral tissues - From the perspective of dental specialties. *Archives of oral biology*. 2017;74:136-45.
98. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S46-51.
99. Hahn CL, Liewehr FR. Update on the adaptive immune responses of the dental pulp. *Journal of endodontics*. 2007;33(7):773-81.
100. Hahn CL, Best AM, Tew JG. Cytokine induction by *Streptococcus mutans* and pulpal pathogenesis. *Infection and immunity*. 2000;68(12):6785-9.
101. Sasaki H, Balto K, Kawashima N, Eastcott J, Hoshino K, Akira S, et al. Gamma interferon (IFN-gamma) and IFN-gamma-inducing cytokines interleukin-12 (IL-12) and IL-18 do not augment infection-stimulated bone resorption in vivo. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*. 2004;11(1):106-10.

102. Dong C. Diversification of T-helper-cell lineages: finding the family root of IL-17-producing cells. *Nature reviews Immunology*. 2006;6(4):329-33.
103. Takimoto K, Kawashima N, Suzuki N, Koizumi Y, Yamamoto M, Nakashima M, et al. Down-regulation of inflammatory mediator synthesis and infiltration of inflammatory cells by MMP-3 in experimentally induced rat pulpitis. *Journal of endodontics*. 2014;40(9):1404-9.
104. Gaffen SL. Biology of recently discovered cytokines: interleukin-17--a unique inflammatory cytokine with roles in bone biology and arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2004;6(6):240-7.
105. Omi M, Hata M, Nakamura N, Miyabe M, Kobayashi Y, Kamiya H, et al. Transplantation of dental pulp stem cells suppressed inflammation in sciatic nerves by promoting macrophage polarization towards anti-inflammation phenotypes and ameliorated diabetic polyneuropathy. *Journal of diabetes investigation*. 2016;7(4):485-96.
106. Brown BN, Ratner BD, Goodman SB, Amar S, Badylak SF. Macrophage polarization: an opportunity for improved outcomes in biomaterials and regenerative medicine. *Biomaterials*. 2012;33(15):3792-802.
107. Laskin DL. Macrophages and inflammatory mediators in chemical toxicity: a battle of forces. *Chemical research in toxicology*. 2009;22(8):1376-85.
108. Benoit M, Desnues B, Mege JL. Macrophage polarization in bacterial infections. *Journal of immunology*. 2008;181(6):3733-9.
109. Di Paolo NC, Shayakhmetov DM. Interleukin 1alpha and the inflammatory process. *Nature immunology*. 2016;17(8):906-13.
110. Huang FM, Tsai CH, Chen YJ, Chou MY, Chang YC. Examination of the signal transduction pathways leading to upregulation of tissue type plasminogen activator by interleukin-1alpha in human pulp cells. *Journal of endodontics*. 2006;32(1):30-3.
111. Fouad AF. IL-1 alpha and TNF-alpha expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice. *Journal of dental research*. 1997;76(9):1548-54.
112. Bom-van Noorloos AA, van der Meer JW, van de Gevel JS, Schepens E, van Steenberghe TJ, Burger EH. *Bacteroides gingivalis* stimulates bone resorption via interleukin-1 production by mononuclear cells. The relative role for *B. gingivalis* endotoxin. *Journal of clinical periodontology*. 1990;17(7 Pt 1):409-13.

113. Martinez ZR, Naruishi K, Yamashiro K, Myokai F, Yamada T, Matsuura K, et al. Gene profiles during root canal treatment in experimental rat periapical lesions. *Journal of endodontics*. 2007;33(8):936-43.
114. Wisithphrom K, Murray PE, Windsor LJ. Interleukin-1 alpha alters the expression of matrix metalloproteinases and collagen degradation by pulp fibroblasts. *Journal of endodontics*. 2006;32(3):186-92.
115. Cvikl B, Lussi A, Moritz A, Sawada K, Gruber R. Differential inflammatory response of dental pulp explants and fibroblasts to saliva. *International endodontic journal*. 2016;49(7):655-62.
116. Hunter CA, Jones SA. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nature immunology*. 2015;16(5):448-57.
117. Wisithphrom K, Windsor LJ. The effects of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, interleukin-6, and transforming growth factor-beta1 on pulp fibroblast mediated collagen degradation. *Journal of endodontics*. 2006;32(9):853-61.
118. Kim KW, Kim BM, Moon HW, Lee SH, Kim HR. Role of C-reactive protein in osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Arthritis research & therapy*. 2015;17:41.
119. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochimica et biophysica acta*. 2014;1843(11):2563-82.
120. Xiong H, Wei L, Peng B. IL-17 stimulates the production of the inflammatory chemokines IL-6 and IL-8 in human dental pulp fibroblasts. *International endodontic journal*. 2015;48(6):505-11.
121. Zheng SX, Vrindts Y, Lopez M, De Groote D, Zangerle PF, Collette J, et al. Increase in cytokine production (IL-1 beta, IL-6, TNF-alpha but not IFN-gamma, GM-CSF or LIF) by stimulated whole blood cells in postmenopausal osteoporosis. *Maturitas*. 1997;26(1):63-71.
122. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infection and immunity*. 2001;69(2):744-50.
123. Azuma MM, Samuel RO, Gomes-Filho JE, Dezan-Junior E, Cintra LT. The role of IL-6 on apical periodontitis: a systematic review. *International endodontic journal*. 2014;47(7):615-21.
124. Bisping G, Leo R, Wenning D, Dankbar B, Padro T, Kropff M, et al. Paracrine interactions of basic fibroblast growth factor and interleukin-6 in multiple myeloma. *Blood*. 2003;101(7):2775-83.

125. Nowwarote N, Sukarawan W, Pavasant P, Osathanon T. Basic Fibroblast Growth Factor Regulates REX1 Expression Via IL-6 In Stem Cells Isolated from Human Exfoliated Deciduous Teeth. *Journal of cellular biochemistry*. 2016.
126. Ko YJ, Kwon KY, Kum KY, Lee WC, Baek SH, Kang MK, et al. The Anti-Inflammatory Effect of Human Telomerase-Derived Peptide on *P. gingivalis* Lipopolysaccharide-Induced Inflammatory Cytokine Production and Its Mechanism in Human Dental Pulp Cells. *Mediators of inflammation*. 2015;2015:385127.
127. Wang X, Sha XJ, Li GH, Yang FS, Ji K, Wen LY, et al. Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Archives of oral biology*. 2012;57(9):1231-40.
128. Zhang J, Zhang Y, Lv H, Yu Q, Zhou Z, Zhu Q, et al. Human stem cells from the apical papilla response to bacterial lipopolysaccharide exposure and anti-inflammatory effects of nuclear factor I C. *Journal of endodontics*. 2013;39(11):1416-22.
129. Kalliolias GD, Ivashkiv LB. TNF biology, pathogenic mechanisms and emerging therapeutic strategies. *Nature reviews Rheumatology*. 2016;12(1):49-62.
130. Hall BE, Zhang L, Sun ZJ, Utreras E, Prochazkova M, Cho A, et al. Conditional TNF-alpha Overexpression in the Tooth and Alveolar Bone Results in Painful Pulpitis and Osteitis. *Journal of dental research*. 2016;95(2):188-95.
131. Fachin EV, Scarparo RK, Pezzi AP, Luisi SB, Sant'ana Filho M. Effect of betamethasone on the pulp after topical application to the dentin of rat teeth: vascular aspects of the inflammation. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2009;17(4):335-9.
132. Kim N, Kadono Y, Takami M, Lee J, Lee SH, Okada F, et al. Osteoclast differentiation independent of the TRANCE-RANK-TRAF6 axis. *The Journal of experimental medicine*. 2005;202(5):589-95.
133. Graves DT, Oates T, Garlet GP. Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *Journal of oral microbiology*. 2011;3.
134. Cardoso FG, Chung A, Martinho FC, Camargo CH, Carvalho CA, Gomes BP, et al. Investigation of Bacterial Contents From Persistent Endodontic Infection and Evaluation of Their Inflammatory Potential. *Brazilian dental journal*. 2016;27(4):412-8.
135. Lima SM, Sousa MG, Freire Mde S, de Almeida JA, Cantuaria AP, Silva TA, et al. Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro. *Journal of endodontics*. 2015;41(7):1061-5.

136. Henriques LC, de Brito LC, Tavares WL, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Cytokine analysis in lesions refractory to endodontic treatment. *Journal of endodontics*. 2011;37(12):1659-62.
137. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis and rheumatism*. 2005;52(1):128-35.
138. Lin SK, Wang CC, Huang S, Lee JJ, Chiang CP, Lan WH, et al. Induction of dental pulp fibroblast matrix metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 gene expression by interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha through a prostaglandin-dependent pathway. *Journal of endodontics*. 2001;27(3):185-9.
139. Assas BM, Levison SE, Little M, England H, Battrick L, Bagnall J, et al. Anti-inflammatory effects of infliximab in mice are independent of tumour necrosis factor alpha neutralization. *Clinical and experimental immunology*. 2016.
140. Shirasugi M, Nishioka K, Yamamoto T, Nakaya T, Kanamura N. Normal human gingival fibroblasts undergo cytoapoptosis and apoptosis after long-term exposure to butyric acid. *Biochemical and biophysical research communications*. 2016.
141. Ueda M, Fujisawa T, Ono M, Hara ES, Pham HT, Nakajima R, et al. A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem cell research & therapy*. 2014;5(1):31.
142. Liu YK, Zhou ZY, Liu F. Transcriptome changes during TNF-alpha promoted osteogenic differentiation of dental pulp stem cells (DPSCs). *Biochemical and biophysical research communications*. 2016;476(4):426-30.
143. Zundler S, Neurath MF. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine & growth factor reviews*. 2015;26(5):559-68.
144. Seitz M, Loetscher P, Dewald B, Towbin H, Baggiolini M. Opposite effects of interleukin-13 and interleukin-12 on the release of inflammatory cytokines, cytokine inhibitors and prostaglandin E from synovial fibroblasts and blood mononuclear cells. *European journal of immunology*. 1996;26(9):2198-202.
145. Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity*. 2003;19(5):641-4.
146. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *Journal of leukocyte biology*. 1996;59(4):505-11.

147. Ribeiro Sobrinho AP, de Melo Maltos SM, Farias LM, de Carvalho MA, Nicoli JR, de Uzeda M, et al. Cytokine production in response to endodontic infection in germ-free mice. *Oral microbiology and immunology*. 2002;17(6):344-53.
148. Freitas P, Novaretti CP, Rodini CO, Batista AC, Lara VS. Mast cells and lymphocyte subsets in pulps from healthy and carious human teeth. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2007;103(5):e95-102.
149. Sattari M, Haghighi AK, Tamijani HD. The relationship of pulp polyp with the presence and concentration of immunoglobulin E, histamine, interleukin-4 and interleukin-12. *Australian endodontic journal : the journal of the Australian Society of Endodontology Inc*. 2009;35(3):164-8.
150. Mingomataj EC, Bakiri AH. Regulator Versus Effector Paradigm: Interleukin-10 as Indicator of the Switching Response. *Clinical reviews in allergy & immunology*. 2016;50(1):97-113.
151. Rood JE, Canna SW, Weaver LK, Tobias JW, Behrens EM. IL-10 distinguishes a unique population of activated, effector-like CD8+ T cells in murine acute liver inflammation. *Journal of leukocyte biology*. 2016.
152. Bazzoni F, Tamassia N, Rossato M, Cassatella MA. Understanding the molecular mechanisms of the multifaceted IL-10-mediated anti-inflammatory response: lessons from neutrophils. *European journal of immunology*. 2010;40(9):2360-8.
153. Maciel KF, Neves de Brito LC, Tavares WL, Moreira G, Nicoli JR, Vieira LQ, et al. Cytokine expression in response to root canal infection in gnotobiotic mice. *International endodontic journal*. 2012;45(4):354-62.
154. Nakamuta M, Morizono S, Tsuruta S, Kohjima M, Kotoh K, Enjoji M. Remote delivery and expression of soluble type II TGF-beta receptor in muscle prevents hepatic fibrosis in rats. *International journal of molecular medicine*. 2005;16(1):59-64.
155. Al-Sharabi N, Mustafa M, Ueda M, Xue Y, Mustafa K, Fristad I. Conditioned medium from human bone marrow stromal cells attenuates initial inflammatory reactions in dental pulp tissue. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2016.
156. Arthur JS, Ley SC. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nature reviews Immunology*. 2013;13(9):679-92.

157. Farges JC, Alliot-Licht B, Baudouin C, Msika P, Bleicher F, Carrouel F. Odontoblast control of dental pulp inflammation triggered by cariogenic bacteria. *Frontiers in physiology*. 2013;4:326.
158. Shimauchi H, Takayama S, Narikawa-Kiji M, Shimabukuro Y, Okada H. Production of interleukin-8 and nitric oxide in human periapical lesions. *Journal of endodontics*. 2001;27(12):749-52.
159. Di Nardo Di Maio F, Lohinai Z, D'Arcangelo C, De Fazio PE, Speranza L, De Lutiis MA, et al. Nitric oxide synthase in healthy and inflamed human dental pulp. *Journal of dental research*. 2004;83(4):312-6.
160. Silva Mendez LS, Allaker RP, Hardie JM, Benjamin N. Antimicrobial effect of acidified nitrite on cariogenic bacteria. *Oral microbiology and immunology*. 1999;14(6):391-2.
161. Farges JC, Bellanger A, Ducret M, Aubert-Foucher E, Richard B, Alliot-Licht B, et al. Human odontoblast-like cells produce nitric oxide with antibacterial activity upon TLR2 activation. *Frontiers in physiology*. 2015;6:185.
162. Sipert CR, Moraes IG, Bernardinelli N, Garcia RB, Bramante CM, Gasparoto TH, et al. Heat-killed *Enterococcus faecalis* alters nitric oxide and CXCL12 production but not CXCL8 and CCL3 production by cultured human dental pulp fibroblasts. *Journal of endodontics*. 2010;36(1):91-4.
163. Kaushik SN, Kim B, Walma AM, Choi SC, Wu H, Mao JJ, et al. Biomimetic microenvironments for regenerative endodontics. *Biomaterials research*. 2016;20:14.
164. Gruetter CA, Barry BK, McNamara DB, Gruetter DY, Kadowitz PJ, Ignarro L. Relaxation of bovine coronary artery and activation of coronary arterial guanylate cyclase by nitric oxide, nitroprusside and a carcinogenic nitrosoamine. *Journal of cyclic nucleotide research*. 1979;5(3):211-24.
165. Kimura H, Esumi H. Reciprocal regulation between nitric oxide and vascular endothelial growth factor in angiogenesis. *Acta biochimica Polonica*. 2003;50(1):49-59.
166. Speranza L, Pesce M, Franceschelli S, Mastrangelo F, Patruno A, De Lutiis MA, et al. The role of inducible nitric oxide synthase and haem oxygenase 1 in growth and development of dental tissue'. *Cell biochemistry and function*. 2012;30(3):217-23.
167. Shirvani A, Shamszadeh S, Eghbal MJ, Marvasti LA, Asgary S. Effect of preoperative oral analgesics on pulpal anesthesia in patients with irreversible pulpitis- a systematic review and meta-analysis. *Clinical oral investigations*. 2016.

168. Laureys WG, Cuvelier CA, Dermaut LR, De Pauw GA. The critical apical diameter to obtain regeneration of the pulp tissue after tooth transplantation, replantation, or regenerative endodontic treatment. *Journal of endodontics*. 2013;39(6):759-63.
169. Diogenes A, Ruparel NB. Regenerative Endodontic Procedures: Clinical Outcomes. *Dental clinics of North America*. 2017;61(1):111-25.
170. Plascencia H, Cruz A, Diaz M, Jimenez AL, Solis R, Bernal C. Root Canal Filling after Revascularization/Revitalization. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2016;40(6):445-9.
171. Kreter F. [Endodontic surgery in immature tooth roots]. *Zahnärztliche Praxis*. 1975;26(4):78-80.
172. Chugal N, Mallya SM, Kahler B, Lin LM. Endodontic Treatment Outcomes. *Dental clinics of North America*. 2017;61(1):59-80.
173. Shabahang S. Treatment options: apexogenesis and apexification. *Journal of endodontics*. 2013;39(3 Suppl):S26-9.
174. Vojinovic O. Induction of apical formation in immature teeth by different endodontic methods of treatment. Experimental pathohistological study. *Journal of oral rehabilitation*. 1974;1(1):85-97.
175. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odontologisk revy*. 1972;23(1):27-44.
176. Friend LA. The treatment of immature teeth with non-vital pulps. *Journal of the British Endodontic Society*. 1967;1(2):28-33.
177. Breillat J. [Apexification. Apexogenesis]. *Revue d'odonto-stomatologie*. 1990;19(6):483-92.
178. Ritter AL, Ritter AV, Murrah V, Sigurdsson A, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2004;20(2):75-84.
179. Bansal R, Jain A, Mittal S, Kumar T, Kaur D. Regenerative endodontics: a road less travelled. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014;8(10):ZE20-4.

180. Corbella S, Ferrara G, El Kabbaney A, Taschieri S. Apexification, apexogenesis and regenerative endodontic procedures: a review of the literature. *Minerva stomatologica*. 2014;63(11-12):375-89.
181. Torneck CD, Smith J. Biologic effects of endodontic procedures on developing incisor teeth. I. Effect of partial and total pulp removal. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1970;30(2):258-66.
182. Bouchon F. Apex formation following treatment of necrotized immature permanent incisor. *Journal of dentistry for children*. 1966;33(6):378-80.
183. Zeldow LL. Endodontic treatment of vital and non-vital immature teeth. *The New York state dental journal*. 1967;33(6):327-35.
184. Niranjana B, Shashikiran ND, Dubey A, Singla S, Gupta N. Biodentine-A New Novel Bio-Inductive Material For Treatment of Traumatically Injured Tooth (Single Visit Apexification). *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2016;10(9):ZJ03-ZJ4.
185. Gawthaman M, Vinodh S, Mathian VM, Vijayaraghavan R, Karunakaran R. Apexification with calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate: Report of two cases. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*. 2013;5(Suppl 2):S131-4.
186. Chen SJ, Chen LP. Radiographic outcome of necrotic immature teeth treated with two endodontic techniques: A retrospective analysis. *Biomedical journal*. 2016;39(5):366-71.
187. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *Journal of the American Dental Association*. 1966;72(1):87-93.
188. Heithersay GS. Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1970;29(4):620-30.
189. Steiner JC, Van Hassel HJ. Experimental root apexification in primates. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;31(3):409-15.
190. Dylewski JJ. Apical closure of nonvital teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;32(1):82-9.
191. Ghose LJ, Baghdady VS, Hikmat YM. Apexification of immature apices of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide. *Journal of endodontics*. 1987;13(6):285-90.
192. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *Journal of the British Endodontic Society*. 1975;8(2):74-93.

193. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L, Riis I. pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *Journal of endodontics*. 1981;7(1):17-21.
194. Siqueira JF, Jr., Lopes HP. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *International endodontic journal*. 1999;32(5):361-9.
195. Silva L, Nelson-Filho P, Leonardo MR, Rossi MA, Pansani CA. Effect of calcium hydroxide on bacterial endotoxin in vivo. *Journal of endodontics*. 2002;28(2):94-8.
196. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2003;11(4):269-82.
197. Soares J, Santos S, Cesar C, Silva P, Sa M, Silveira F, et al. Calcium hydroxide induced apexification with apical root development: a clinical case report. *International endodontic journal*. 2008;41(8):710-9.
198. Holland GR. Periapical response to apical plugs of dentin and calcium hydroxide in ferret canines. *Journal of endodontics*. 1984;10(2):71-4.
199. Brady JE, Himel VT, Weir JC. Periapical response to an apical plug of dentin filings intentionally placed after root canal overinstrumentation. *Journal of endodontics*. 1985;11(8):323-9.
200. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2002;18(3):134-7.
201. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *Journal of endodontics*. 1999;25(1):1-5.
202. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *Journal of endodontics*. 2010;36(1):16-27.
203. Fridland M, Rosado R. Mineral trioxide aggregate (MTA) solubility and porosity with different water-to-powder ratios. *Journal of endodontics*. 2003;29(12):814-7.
204. Tanomaru-Filho M, Tanomaru JM, Barros DB, Watanabe E, Ito IY. In vitro antimicrobial activity of endodontic sealers, MTA-based cements and Portland cement. *Journal of oral science*. 2007;49(1):41-5.
205. Huang TH, Yang CC, Ding SJ, Yeng M, Kao CT, Chou MY. Inflammatory cytokines reaction elicited by root-end filling materials. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2005;73(1):123-8.

206. Rezende TM, Vieira LQ, Sobrinho AP, Oliveira RR, Taubman MA, Kawai T. The influence of mineral trioxide aggregate on adaptive immune responses to endodontic pathogens in mice. *Journal of endodontics*. 2008;34(9):1066-71.
207. Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H, Okiji T. Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *Journal of endodontics*. 2008;34(8):970-4.
208. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *Journal of endodontics*. 2006;32(5):425-8.
209. Damle SG, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2012;36(3):263-8.
210. Chala S, Abouqal R, Rida S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: systematic review and meta-analysis. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;112(4):e36-42.
211. Moore A, Howley MF, O'Connell AC. Treatment of open apex teeth using two types of white mineral trioxide aggregate after initial dressing with calcium hydroxide in children. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2011;27(3):166-73.
212. Kumar A, Yadav A, Shetty N. One-step apexification using platelet rich fibrin matrix and mineral trioxide aggregate apical barrier. *Indian journal of dental research : official publication of Indian Society for Dental Research*. 2014;25(6):809-12.
213. Bonte E, Beslot A, Boukpepsi T, Lasfargues JJ. MTA versus Ca(OH)₂ in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. *Clinical oral investigations*. 2015;19(6):1381-8.
214. Huang GT, Garcia-Godoy F. Missing Concepts in De Novo Pulp Regeneration. *Journal of dental research*. 2014;93(8):717-24.
215. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *Journal of endodontics*. 2008;34(5):611-6.
216. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2001;17(4):185-7.

217. Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *Journal of endodontics*. 2006;32(12):1205-13.
218. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *Journal of endodontics*. 2004;30(4):196-200.
219. Moreno-Hidalgo MC, Caleza-Jimenez C, Mendoza-Mendoza A, Iglesias-Linares A. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis. *International endodontic journal*. 2014;47(4):321-31.
220. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of endodontics*. 2007;33(4):377-90.
221. Deeb E, Prietto PP, McKenna RC. Reimplantation of Luxated Teeth in Humans. *Journal - Southern California Dental Association*. 1965;33(4):194-206.
222. Skoglund A. Vascular changes in replanted and autotransplanted apicoectomized mature teeth of dogs. *International journal of oral surgery*. 1981;10(2):100-10.
223. Skoglund A. Pulpal survival in replanted and autotransplanted apicoectomized mature teeth of dogs with prepared nutritional canals. *International journal of oral surgery*. 1983;12(1):31-8.
224. Kristerson L. Autotransplantation of human premolars. A clinical and radiographic study of 100 teeth. *International journal of oral surgery*. 1985;14(2):200-13.
225. Castelli WA, Nasijeti CE, Caffesse RG, Diaz-Perez R. Vascular response of the periodontal membrane after replantation of teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1980;50(5):390-7.
226. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta odontologica Scandinavica*. 1961;19:324-53.
227. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *International endodontic journal*. 1996;29(2):125-30.
228. Conde MC, Chisini LA, Sarkis-Onofre R, Schuch HS, Nor JE, Demarco FF. A scoping review of root canal revascularization: relevant aspects for clinical success and tissue formation. *International endodontic journal*. 2016.

229. Li L, Pan Y, Mei L, Li J. Clinical and Radiographic Outcomes in Immature Permanent Necrotic Evaginated Teeth Treated with Regenerative Endodontic Procedures. *Journal of endodontics*. 2016.
230. Claus I, Laureys W, Cornelissen R, Dermaut LR. Histologic analysis of pulpal revascularization of autotransplanted immature teeth after removal of the original pulp tissue. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2004;125(1):93-9.
231. Casagrande L, Demarco FF, Zhang Z, Araujo FB, Shi S, Nor JE. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *Journal of dental research*. 2010;89(6):603-8.
232. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *Journal of endodontics*. 2014;40(1):133-9.
233. Kahler B, Rossi-Fedele G. A Review of Tooth Discoloration after Regenerative Endodontic Therapy. *Journal of endodontics*. 2016;42(4):563-9.
234. Zhang J, Lian M, Cao P, Bao G, Xu G, Sun Y, et al. Effects of Nerve Growth Factor and Basic Fibroblast Growth Factor Promote Human Dental Pulp Stem Cells to Neural Differentiation. *Neurochemical research*. 2016.
235. de Oliveira da Rosa WL, da Silva TM, Demarco FF, Piva E, da Silva AF. Could the application of bioactive molecules improve vital pulp therapy success? A systematic review. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2016.
236. Rosa V, Dubey N, Islam I, Min KS, Nor JE. Pluripotency of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth for Tissue Engineering. *Stem cells international*. 2016;2016:5957806.
237. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(25):13625-30.
238. He Y, Gan Y, Lu J, Feng Q, Wang H, Guan H, et al. Pulpal Tissue Inflammatory Reactions after Experimental Pulpal Exposure in Mice. *Journal of endodontics*. 2017;43(1):90-5.
239. Laino G, Graziano A, d'Aquino R, Pirozzi G, Lanza V, Valiante S, et al. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering. *Journal of cellular physiology*. 2006;206(3):693-701.

240. Papaccio G, Graziano A, d'Aquino R, Graziano MF, Pirozzi G, Menditti D, et al. Long-term cryopreservation of dental pulp stem cells (SBP-DPSCs) and their differentiated osteoblasts: a cell source for tissue repair. *Journal of cellular physiology*. 2006;208(2):319-25.
241. Nosrat IV, Widenfalk J, Olson L, Nosrat CA. Dental pulp cells produce neurotrophic factors, interact with trigeminal neurons in vitro, and rescue motoneurons after spinal cord injury. *Developmental biology*. 2001;238(1):120-32.
242. Zhang W, Walboomers XF, Shi S, Fan M, Jansen JA. Multilineage differentiation potential of stem cells derived from human dental pulp after cryopreservation. *Tissue engineering*. 2006;12(10):2813-23.
243. Perry BC, Zhou D, Wu X, Yang FC, Byers MA, Chu TM, et al. Collection, cryopreservation, and characterization of human dental pulp-derived mesenchymal stem cells for banking and clinical use. *Tissue engineering Part C, Methods*. 2008;14(2):149-56.
244. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal of endodontics*. 2008;34(6):645-51.
245. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *Journal of endodontics*. 2008;34(2):166-71.
246. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiftoglou A, Garefis P, Koidis P, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Archives of oral biology*. 2011;56(7):709-21.
247. Ma L, Makino Y, Yamaza H, Akiyama K, Hoshino Y, Song G, et al. Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *PloS one*. 2012;7(12):e51777.
248. Somerman MJ, Young MF, Foster RA, Moehring JM, Imm G, Sauk JJ. Characteristics of human periodontal ligament cells in vitro. *Archives of oral biology*. 1990;35(3):241-7.
249. Mantovani A, Biswas SK, Galdiero MR, Sica A, Locati M. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *The Journal of pathology*. 2013;229(2):176-85.

250. Brown BN, Badylak SF. Expanded applications, shifting paradigms and an improved understanding of host-biomaterial interactions. *Acta biomaterialia*. 2013;9(2):4948-55.
251. Spiller KL, Nassiri S, Witherel CE, Anfang RR, Ng J, Nakazawa KR, et al. Sequential delivery of immunomodulatory cytokines to facilitate the M1-to-M2 transition of macrophages and enhance vascularization of bone scaffolds. *Biomaterials*. 2015;37:194-207.
252. Fink J, Fuhrmann R, Scharnweber T, Franke RP. Stimulation of monocytes and macrophages: possible influence of surface roughness. *Clinical hemorheology and microcirculation*. 2008;39(1-4):205-12.
253. Kim SG. Biological Molecules for the Regeneration of the Pulp-Dentin Complex. *Dental clinics of North America*. 2017;61(1):127-41.
254. Dhillon H, Kaushik M, Sharma R. Regenerative endodontics--Creating new horizons. *Journal of biomedical materials research Part B, Applied biomaterials*. 2016;104(4):676-85.
255. Tziafas D. The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries research*. 2004;38(3):314-20.
256. De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, et al. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Current molecular medicine*. 2012;12(5):574-91.
257. Aberg T, Wozney J, Thesleff I. Expression patterns of bone morphogenetic proteins (Bmps) in the developing mouse tooth suggest roles in morphogenesis and cell differentiation. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*. 1997;210(4):383-96.
258. Nakashima M, Toyono T, Akamine A, Joyner A. Expression of growth/differentiation factor 11, a new member of the BMP/TGFbeta superfamily during mouse embryogenesis. *Mechanisms of development*. 1999;80(2):185-9.
259. Nayef L, Mekhail M, Benameur L, Rendon JS, Hamdy R, Tabrizian M. A combinatorial approach towards achieving an injectable, self-contained, phosphate-releasing scaffold for promoting biomineralization in critical size bone defects. *Acta biomaterialia*. 2016;29:389-97.
260. Yadlapati M, Biguetti C, Cavalla F, Nieves F, Bessey C, Bohluli P, et al. Characterization of a Vascular Endothelial Growth Factor-loaded Bioresorbable Delivery System for Pulp Regeneration. *Journal of endodontics*. 2017;43(1):77-83.

261. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Archives of oral biology*. 2000;45(11):1013-6.
262. Li X, Ma C, Xie X, Sun H, Liu X. Pulp regeneration in a full-length human tooth root using a hierarchical nanofibrous microsphere system. *Acta biomaterialia*. 2016;35:57-67.
263. Carnevale G, Pisciotta A, Riccio M, Bertoni L, De Biasi S, Gibellini L, et al. Human dental pulp stem cells expressing STRO-1, c-Kit and CD34 markers in peripheral nerve regeneration. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2016.
264. Heng BC, Lim LW, Wu W, Zhang C. An Overview of Protocols for the Neural Induction of Dental and Oral Stem Cells In Vitro. *Tissue engineering Part B, Reviews*. 2016;22(3):220-50.
265. Iohara K, Zheng L, Ito M, Tomokiyo A, Matsushita K, Nakashima M. Side population cells isolated from porcine dental pulp tissue with self-renewal and multipotency for dentinogenesis, chondrogenesis, adipogenesis, and neurogenesis. *Stem cells*. 2006;24(11):2493-503.
266. Ishizaka R, Hayashi Y, Iohara K, Sugiyama M, Murakami M, Yamamoto T, et al. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*. 2013;34(8):1888-97.
267. Osathanon T, Nowwarote N, Pavasant P. Basic fibroblast growth factor inhibits mineralization but induces neuronal differentiation by human dental pulp stem cells through a FGFR and PLCgamma signaling pathway. *Journal of cellular biochemistry*. 2011;112(7):1807-16.
268. Bakopoulou A, About I. Stem Cells of Dental Origin: Current Research Trends and Key Milestones towards Clinical Application. *Stem cells international*. 2016;2016:4209891.
269. Albuquerque MT, Valera MC, Nakashima M, Nor JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *Journal of dental research*. 2014;93(12):1222-31.
270. Lu J, Hao Y, Zhao W, Lv C, Zou D. Molecular, cellular and pharmaceutical aspects of autologous grafts for peri-implant hard and soft tissue defects. *Current pharmaceutical biotechnology*. 2016.

271. Lolato A, Bucchi C, Taschieri S, Kabbaney AE, Fabbro MD. Platelet concentrates for revitalization of immature necrotic teeth: a systematic review of the clinical studies. *Platelets*. 2016;27(5):383-92.
272. Vahabi S, Vaziri S, Torshabi M, Rezaei Esfahrood Z. Effects of Plasma Rich in Growth Factors and Platelet-Rich Fibrin on Proliferation and Viability of Human Gingival Fibroblasts. *J Dent (Tehran)*. 2015;12(7):504-12.
273. Lu Q, Pandya M, Rufaihah AJ, Rosa V, Tong HJ, Seliktar D, et al. Modulation of Dental Pulp Stem Cell Odontogenesis in a Tunable PEG-Fibrinogen Hydrogel System. *Stem cells international*. 2015;2015:525367.
274. Drury JL, Mooney DJ. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*. 2003;24(24):4337-51.
275. Suh JK, Matthew HW. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*. 2000;21(24):2589-98.
276. Malafaya PB, Silva GA, Reis RL. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications. *Advanced drug delivery reviews*. 2007;59(4-5):207-33.
277. Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, et al. Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *Journal of dental research*. 2013;92(11):963-9.
278. Sampaio-Maia B, Caldas IM, Pereira ML, Perez-Mongiovi D, Araujo R. The Oral Microbiome in Health and Its Implication in Oral and Systemic Diseases. *Advances in applied microbiology*. 2016;97:171-210.
279. Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp Regeneration: Current Approaches and Future Challenges. *Frontiers in physiology*. 2016;7:58.
280. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *Journal of endodontics*. 2009;35(10):1343-9.
281. Akgun OM, Altun C, Guven G. Use of triple antibiotic paste as a disinfectant for a traumatized immature tooth with a periapical lesion: a case report. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2009;108(2):e62-5.
282. Hoshino E, Iwaku M, Sato M, Ando N, Kota K. Bactericidal efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentin in vivo. *Caries research*. 1989;23(2):78-80.

283. Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H. Effects of a triple antibiotic solution on pulpal dynamics after intentionally delayed tooth replantation in mice. *Journal of endodontics*. 2014;40(10):1566-72.
284. Mishra N, Narang I, Mittal N. Platelet-rich fibrin-mediated revitalization of immature necrotic tooth. *Contemporary clinical dentistry*. 2013;4(3):412-5.
285. Sonmez IS, Akbay Oba A, Erkmen Almaz M. Revascularization/Regeneration performed in immature molars: case reports. *The Journal of clinical pediatric dentistry*. 2013;37(3):231-4.
286. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Texas dental journal*. 2012;129(6):601-16.
287. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *Journal of endodontics*. 2011;37(2):133-8.
288. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *Journal of endodontics*. 2009;35(5):745-9.
289. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Journal of endodontics*. 2008;34(7):876-87.
290. Saoud TM, Zaazou A, Nabil A, Moussa S, Aly HM, Okazaki K, et al. Histological observations of pulpal replacement tissue in immature dog teeth after revascularization of infected pulps. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2015;31(3):243-9.
291. Raju SM, Yadav SS, Kumar MS. Revascularization of immature mandibular premolar with pulpal necrosis - a case report. *Journal of clinical and diagnostic research : JCDR*. 2014;8(9):ZD29-31.
292. Kaya-Buyukbayram I, Ozalp S, Aytugur E, Aydemir S. Regenerative endodontic treatment of an infected immature dens invaginatus with the aid of cone-beam computed tomography. *Case reports in dentistry*. 2014;2014:403045.
293. Nagaveni NB, Poornima P, Joshi JS, Pathak S, Nandini DB. Revascularization of immature, nonvital permanent tooth using platelet-rich fibrin in children. *Pediatric dentistry*. 2015;37(1):1-6.

294. Bakhtiar H, Vatanpour M, Rayani A, Navi F, Asna-Ashari E, Ahmadi A, et al. The plasma-rich in growth factor as a suitable matrix in regenerative endodontics: a case series. *The New York state dental journal*. 2014;80(4):49-53.
295. Johns DA, Shivashankar VY, Krishnamma S, Johns M. Use of photoactivated disinfection and platelet-rich fibrin in regenerative Endodontics. *Journal of conservative dentistry : JCD*. 2014;17(5):487-90.
296. Guven Polat G, Yildirim C, Akgun OM, Altun C, Dincer D, Ozkan CK. The use of platelet rich plasma in the treatment of immature tooth with periapical lesion: a case report. *Restorative dentistry & endodontics*. 2014;39(3):230-4.
297. Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, Sonmez H. Concentrated platelet-rich plasma used in root canal revascularization: 2 case reports. *International endodontic journal*. 2014;47(1):41-9.
298. Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *International endodontic journal*. 2013;46(10):910-22.
299. Yassen GH, Vail MM, Chu TG, Platt JA. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *International endodontic journal*. 2013;46(7):688-95.
300. Gelman R, Park H. Pulp revascularization in an immature necrotic tooth: a case report. *Pediatric dentistry*. 2012;34(7):496-9.
301. Dabbagh B, Alvaro E, Vu DD, Rizkallah J, Schwartz S. Clinical complications in the revascularization of immature necrotic permanent teeth. *Pediatric dentistry*. 2012;34(5):414-7.
302. Shivashankar VY, Johns DA, Vidyanath S, Kumar MR. Platelet Rich Fibrin in the revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex. *Journal of conservative dentistry : JCD*. 2012;15(4):395-8.
303. Tobias Duarte PC, Gomes-Filho JE, Ervolino E, Marcal Mazza Sundefeld ML, Tadahirowayama M, Lodi CS, et al. Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. *Journal of endodontics*. 2014;40(4):538-42.
304. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *Journal of endodontics*. 2011;37(4):562-7.

305. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *Journal of endodontics*. 2010;36(3):536-41.
306. Taneja S, Kumari M, Parkash H. Nonsurgical healing of large periradicular lesions using a triple antibiotic paste: A case series. *Contemporary clinical dentistry*. 2010;1(1):31-5.
307. Windley W, 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *Journal of endodontics*. 2005;31(6):439-43.
308. Sabrah AH, Yassen GH, Liu WC, Goebel WS, Gregory RL, Platt JA. The effect of diluted triple and double antibiotic pastes on dental pulp stem cells and established *Enterococcus faecalis* biofilm. *Clinical oral investigations*. 2015;19(8):2059-66.
309. Akcay M, Arslan H, Yasa B, Kavrik F, Yasa E. Spectrophotometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *Journal of endodontics*. 2014;40(6):845-8.
310. Mohammadi Z. Strategies to manage permanent non-vital teeth with open apices: a clinical update. *International dental journal*. 2011;61(1):25-30.
311. Arslan H, Akcay M, Cakir M, Gok A, Yasa B, Dalli M. Comparison of bond strength of self-etch adhesive to pulp chamber dentin after placement of calcium hydroxide and various antibiotic pastes. *Acta odontologica Scandinavica*. 2015;73(3):226-31.
312. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *Journal of endodontics*. 2010;36(6):1086-91.
313. Alghilan MA, Windsor LJ, Palasuk J, Yassen GH. Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *International endodontic journal*. 2016.
314. Labban N, Yassen GH, Windsor LJ, Platt JA. The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dental traumatology : official publication of International Association for Dental Traumatology*. 2014;30(6):429-34.
315. Yadlapati M, Souza LC, Dorn S, Garlet GP, Letra A, Silva RM. Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *International endodontic journal*. 2014;47(8):769-75.

316. Ji C, Miller PA, Miller MJ. Syntheses and Antibacterial Activity of N-Acylated Ciprofloxacin Derivatives Based on the Trimethyl Lock. *ACS medicinal chemistry letters*. 2015;6(6):707-10.
317. Chan PF, Srikannathasan V, Huang J, Cui H, Fosberry AP, Gu M, et al. Structural basis of DNA gyrase inhibition by antibacterial QPT-1, anticancer drug etoposide and moxifloxacin. *Nature communications*. 2015;6:10048.
318. Sharma PC, Jain A, Jain S, Pahwa R, Yar MS. Ciprofloxacin: review on developments in synthetic, analytical, and medicinal aspects. *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry*. 2010;25(4):577-89.
319. Oppegard LM, Schwanz HA, Towle TR, Kerns RJ, Hiasa H. Fluoroquinolones stimulate the DNA cleavage activity of topoisomerase IV by promoting the binding of Mg(2+) to the second metal binding site. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1860(3):569-75.
320. Bax BD, Chan PF, Eggleston DS, Fosberry A, Gentry DR, Gorrec F, et al. Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature*. 2010;466(7309):935-40.
321. Foerster S, Unemo M, Hathaway LJ, Low N, Althaus CL. Time-kill curve analysis and pharmacodynamic modelling for in vitro evaluation of antimicrobials against *Neisseria gonorrhoeae*. *BMC microbiology*. 2016;16:216.
322. Silva F, Lourenco O, Queiroz JA, Domingues FC. Bacteriostatic versus bactericidal activity of ciprofloxacin in *Escherichia coli* assessed by flow cytometry using a novel far-red dye. *The Journal of antibiotics*. 2011;64(4):321-5.
323. Maheshwari M, Yaser NH, Naz S, Fatima M, Ahmad I. Emergence of ciprofloxacin-resistant extended-spectrum beta-lactamase-producing enteric bacteria in hospital wastewater and clinical sources. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2016;5:22-5.
324. Latham J, Fong H, Jewett A, Johnson JD, Paranjpe A. Disinfection Efficacy of Current Regenerative Endodontic Protocols in Simulated Necrotic Immature Permanent Teeth. *Journal of endodontics*. 2016;42(8):1218-25.
325. Albuquerque MT, Valera MC, Moreira CS, Bresciani E, de Melo RM, Bottino MC. Effects of ciprofloxacin-containing scaffolds on *enterococcus faecalis* biofilms. *Journal of endodontics*. 2015;41(5):710-4.
326. de Freitas RP, Greatti VR, Alcalde MP, Cavenago BC, Vivan RR, Duarte MA, et al. Effect of the Association of Nonsteroidal Anti-inflammatory and Antibiotic Drugs on

- Antibiofilm Activity and pH of Calcium Hydroxide Pastes. *Journal of endodontics*. 2017;43(1):131-4.
327. Phumpatrakom P, Srisuwan T. Regenerative capacity of human dental pulp and apical papilla cells after treatment with a 3-antibiotic mixture. *Journal of endodontics*. 2014;40(3):399-405.
328. Dione N, Khelaifia S, Lagier JC, Raoult D. The aerobic activity of metronidazole against anaerobic bacteria. *International journal of antimicrobial agents*. 2015;45(5):537-40.
329. Dunne RL, Dunn LA, Upcroft P, O'Donoghue PJ, Upcroft JA. Drug resistance in the sexually transmitted protozoan *Trichomonas vaginalis*. *Cell research*. 2003;13(4):239-49.
330. Tsugawa H, Suzuki H, Muraoka H, Ikeda F, Hirata K, Matsuzaki J, et al. Enhanced bacterial efflux system is the first step to the development of metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Biochemical and biophysical research communications*. 2011;404(2):656-60.
331. Watanabe K, Gatanaga H, Escueta-de Cadiz A, Tanuma J, Nozaki T, Oka S. Amebiasis in HIV-1-infected Japanese men: clinical features and response to therapy. *PLoS neglected tropical diseases*. 2011;5(9):e1318.
332. Miyachi Y. Potential antioxidant mechanism of action for metronidazole: implications for rosacea management. *Advances in therapy*. 2001;18(6):237-43.
333. Sgolastra F, Petrucci A, Gatto R, Monaco A. Effectiveness of systemic amoxicillin/metronidazole as an adjunctive therapy to full-mouth scaling and root planing in the treatment of aggressive periodontitis: a systematic review and meta-analysis. *Journal of periodontology*. 2012;83(6):731-43.
334. Segura-Egea JJ, Gould K, Sen BH, Jonasson P, Cotti E, Mazzoni A, et al. Antibiotics in Endodontics: A review. *International endodontic journal*. 2016.
335. Lang PM, Jacinto RC, Dal Pizzol TS, Ferreira MB, Montagner F. Resistance profiles to antimicrobial agents in bacteria isolated from acute endodontic infections: systematic review and meta-analysis. *International journal of antimicrobial agents*. 2016;48(5):467-74.
336. Nelson ML, Levy SB. The history of the tetracyclines. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2011;1241:17-32.
337. Garrido-Mesa N, Zarzuelo A, Galvez J. Minocycline: far beyond an antibiotic. *British journal of pharmacology*. 2013;169(2):337-52.

338. Perret LJ, Tait CP. Non-antibiotic properties of tetracyclines and their clinical application in dermatology. *The Australasian journal of dermatology*. 2014;55(2):111-8.
339. Soares Ade J, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *Journal of endodontics*. 2013;39(3):417-20.
340. Simon SR, Tomson PL, Berdal A. Regenerative endodontics: regeneration or repair? *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S70-5.
341. Lopez-Abarrategui C, Alba A, Silva ON, Reyes-Acosta O, Vasconcelos IM, Oliveira JT, et al. Functional characterization of a synthetic hydrophilic antifungal peptide derived from the marine snail *Cenchritis muricatus*. *Biochimie*. 2012;94(4):968-74.
342. Zhao J, Zhao C, Liang G, Zhang M, Zheng J. Engineering antimicrobial peptides with improved antimicrobial and hemolytic activities. *Journal of chemical information and modeling*. 2013;53(12):3280-96.
343. Davidson DJ, Currie AJ, Reid GS, Bowdish DM, MacDonald KL, Ma RC, et al. The cationic antimicrobial peptide LL-37 modulates dendritic cell differentiation and dendritic cell-induced T cell polarization. *Journal of immunology*. 2004;172(2):1146-56.
344. Wang X, Wang K, He Y, Lu X, Wen D, Wu C, et al. The functions of serpin-3, a negative-regulator involved in prophenoloxidase activation and antimicrobial peptides expression of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi*. *Developmental and comparative immunology*. 2016;69:1-11.
345. Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS chemical biology*. 2010;5(10):905-17.
346. Kang HK, Kim C, Seo CH, Park Y. The therapeutic applications of antimicrobial peptides (AMPs): a patent review. *Journal of microbiology*. 2017;55(1):1-12.
347. Jiang X, Kang Y, Pan X, Yu J, Ouyang Q, Luo C. Studies of the drug resistance response of sensitive and drug-resistant strains in a microfluidic system. *Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro*. 2014;6(2):143-51.
348. Stedt J, Bonnedahl J, Hernandez J, McMahon BJ, Hasan B, Olsen B, et al. Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infection ecology & epidemiology*. 2014;4.

349. Nylen F, Bergman P, Gudmundsson GH, Agerberth B. Assays for Identifying Inducers of the Antimicrobial Peptide LL-37. *Methods in molecular biology*. 2017;1548:271-81.
350. Malik E, Dennison SR, Harris F, Phoenix DA. pH Dependent Antimicrobial Peptides and Proteins, Their Mechanisms of Action and Potential as Therapeutic Agents. *Pharmaceuticals*. 2016;9(4).
351. Jang JY, Song IS, Baek KJ, Choi Y, Ji S. Immunologic characteristics of human gingival fibroblasts in response to oral bacteria. *Journal of periodontal research*. 2016.
352. Herrera R, Morris M, Rosbe K, Feng Z, Weinberg A, Tugizov S. Human beta-defensins 2 and -3 coinfect with human immunodeficiency virus via heparan sulfate proteoglycans and reduce infectivity of intracellular virions in tonsil epithelial cells. *Virology*. 2016;487:172-87.
353. Martin L, van Meegern A, Doemming S, Schuerholz T. Antimicrobial Peptides in Human Sepsis. *Frontiers in immunology*. 2015;6:404.
354. Ebrahim MA. Expression of human beta defensins (HBDs) 1, 2 and 3 in gingival crevicular fluid of patients affected by localized aggressive periodontitis. *The Saudi dental journal*. 2013;25(2):75-82.
355. Diehnelt CW. Peptide array based discovery of synthetic antimicrobial peptides. *Frontiers in microbiology*. 2013;4:402.
356. Riedl S, Zweytick D, Lohner K. Membrane-active host defense peptides--challenges and perspectives for the development of novel anticancer drugs. *Chemistry and physics of lipids*. 2011;164(8):766-81.
357. Wang ZH, Wang YL, Zeng XY. Construction and expression of a heterologous protein in *Lactococcus lactis* by using the nisin-controlled gene expression system: the case of the PRRSV ORF6 gene. *Genetics and molecular research : GMR*. 2014;13(1):1088-96.
358. Scocchi M, Mardirossian M, Runti G, Benincasa M. Non-Membrane Permeabilizing Modes of Action of Antimicrobial Peptides on Bacteria. *Current topics in medicinal chemistry*. 2016;16(1):76-88.
359. Hu Z, Murakami T, Suzuki K, Tamura H, Kuwahara-Arai K, Iba T, et al. Antimicrobial cathelicidin peptide LL-37 inhibits the LPS/ATP-induced pyroptosis of macrophages by dual mechanism. *PloS one*. 2014;9(1):e85765.

360. Matsuzaki K. Why and how are peptide-lipid interactions utilized for self-defense? Magainins and tachyplesins as archetypes. *Biochimica et biophysica acta*. 1999;1462(1-2):1-10.
361. Brogden KA. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature reviews Microbiology*. 2005;3(3):238-50.
362. Li Y, Xiang Q, Zhang Q, Huang Y, Su Z. Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*. 2012;37(2):207-15.
363. Mangoni ML, Shai Y. Temporins and their synergism against Gram-negative bacteria and in lipopolysaccharide detoxification. *Biochimica et biophysica acta*. 2009;1788(8):1610-9.
364. Gkeka P, Sarkisov L. Interactions of phospholipid bilayers with several classes of amphiphilic alpha-helical peptides: insights from coarse-grained molecular dynamics simulations. *The journal of physical chemistry B*. 2010;114(2):826-39.
365. Lee SH, Jun HK, Lee HR, Chung CP, Choi BK. Antibacterial and lipopolysaccharide (LPS)-neutralising activity of human cationic antimicrobial peptides against periodontopathogens. *International journal of antimicrobial agents*. 2010;35(2):138-45.
366. Tamba Y, Yamazaki M. Single giant unilamellar vesicle method reveals effect of antimicrobial peptide magainin 2 on membrane permeability. *Biochemistry*. 2005;44(48):15823-33.
367. Nguyen LT, Haney EF, Vogel HJ. The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Trends in biotechnology*. 2011;29(9):464-72.
368. Mai S, Mauger MT, Niu LN, Barnes JB, Kao S, Bergeron BE, et al. Potential applications of antimicrobial peptides and their mimics in combating caries and pulpal infections. *Acta biomaterialia*. 2016.
369. Lee JK, Park YJ, Kum KY, Han SH, Chang SW, Kaufman B, et al. Antimicrobial efficacy of a human beta-defensin-3 peptide using an *Enterococcus faecalis* dentine infection model. *International endodontic journal*. 2013;46(5):406-12.
370. Lee SH, Baek DH. Antibacterial and neutralizing effect of human beta-defensins on *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* lipoteichoic acid. *Journal of endodontics*. 2012;38(3):351-6.

371. Rosen G, Sela MN, Bachrach G. The antibacterial activity of LL-37 against *Treponema denticola* is dentilisin protease independent and facilitated by the major outer sheath protein virulence factor. *Infection and immunity*. 2012;80(3):1107-14.
372. Thennarasu S, Tan A, Penumatchu R, Shelburne CE, Heyl DL, Ramamoorthy A. Antimicrobial and membrane disrupting activities of a peptide derived from the human cathelicidin antimicrobial peptide LL37. *Biophysical journal*. 2010;98(2):248-57.
373. Overhage J, Campisano A, Bains M, Torfs EC, Rehm BH, Hancock RE. Human host defense peptide LL-37 prevents bacterial biofilm formation. *Infection and immunity*. 2008;76(9):4176-82.
374. Zhang T, Wang Z, Hancock RE, de la Fuente-Nunez C, Haapasalo M. Treatment of Oral Biofilms by a D-Enantiomeric Peptide. *PloS one*. 2016;11(11):e0166997.
375. Katzenback BA. Antimicrobial Peptides as Mediators of Innate Immunity in Teleosts. *Biology*. 2015;4(4):607-39.
376. Haney EF, Mansour SC, Hilchie AL, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. High throughput screening methods for assessing antibiofilm and immunomodulatory activities of synthetic peptides. *Peptides*. 2015;71:276-85.
377. Zhang LJ, Gallo RL. Antimicrobial peptides. *Current biology : CB*. 2016;26(1):R14-9.
378. Rai A, Pinto S, Evangelista MB, Gil H, Kallip S, Ferreira MG, et al. High-density antimicrobial peptide coating with broad activity and low cytotoxicity against human cells. *Acta biomaterialia*. 2016;33:64-77.
379. Ribeiro SM, de la Fuente-Nunez C, Baquir B, Faria-Junior C, Franco OL, Hancock RE. Antibiofilm peptides increase the susceptibility of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates to beta-lactam antibiotics. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2015;59(7):3906-12.
380. Wieczorek M, Jenssen H, Kindrachuk J, Scott WR, Elliott M, Hilpert K, et al. Structural studies of a peptide with immune modulating and direct antimicrobial activity. *Chemistry & biology*. 2010;17(9):970-80.
381. Achtman AH, Pilat S, Law CW, Lynn DJ, Janot L, Mayer ML, et al. Effective adjunctive therapy by an innate defense regulatory peptide in a preclinical model of severe malaria. *Science translational medicine*. 2012;4(135):135ra64.
382. Mansour SC, de la Fuente-Nunez C, Hancock RE. Peptide IDR-1018: modulating the immune system and targeting bacterial biofilms to treat antibiotic-

resistant bacterial infections. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2015;21(5):323-9.

383. Pena OM, Afacan N, Pistolic J, Chen C, Madera L, Falsafi R, et al. Synthetic cationic peptide IDR-1018 modulates human macrophage differentiation. *PloS one*. 2013;8(1):e52449.

384. Steinstraesser L, Hirsch T, Schulte M, Kueckelhaus M, Jacobsen F, Mersch EA, et al. Innate defense regulator peptide 1018 in wound healing and wound infection. *PloS one*. 2012;7(8):e39373.

385. Nijnik A, Madera L, Ma S, Waldbrook M, Elliott MR, Easton DM, et al. Synthetic cationic peptide IDR-1002 provides protection against bacterial infections through chemokine induction and enhanced leukocyte recruitment. *Journal of immunology*. 2010;184(5):2539-50.

386. Garlapati S, Eng NF, Kiros TG, Kindrachuk J, Mutwiri GK, Hancock RE, et al. Immunization with PCEP microparticles containing pertussis toxoid, CpG ODN and a synthetic innate defense regulator peptide induces protective immunity against pertussis. *Vaccine*. 2011;29(38):6540-8.

387. Rivas-Santiago B, Castaneda-Delgado JE, Rivas Santiago CE, Waldbrook M, Gonzalez-Curiel I, Leon-Contreras JC, et al. Ability of innate defence regulator peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to protect against *Mycobacterium tuberculosis* infections in animal models. *PloS one*. 2013;8(3):e59119.

388. Madera L, Hancock RE. Anti-infective peptide IDR-1002 augments monocyte chemotaxis towards CCR5 chemokines. *Biochemical and biophysical research communications*. 2015;464(3):800-6.

389. Gudmundsson GH, Agerberth B, Odeberg J, Bergman T, Olsson B, Salcedo R. The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *European journal of biochemistry*. 1996;238(2):325-32.

390. Zanetti M. Cathelicidins, multifunctional peptides of the innate immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2004;75(1):39-48.

391. Bowdish DM, Davidson DJ, Lau YE, Lee K, Scott MG, Hancock RE. Impact of LL-37 on anti-infective immunity. *Journal of leukocyte biology*. 2005;77(4):451-9.

392. Duplantier AJ, van Hoek ML. The Human Cathelicidin Antimicrobial Peptide LL-37 as a Potential Treatment for Polymicrobial Infected Wounds. *Frontiers in immunology*. 2013;4:143.

393. Lin L, Nonejuie P, Munguia J, Hollands A, Olson J, Dam Q, et al. Azithromycin Synergizes with Cationic Antimicrobial Peptides to Exert Bactericidal and Therapeutic Activity Against Highly Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Pathogens. *EBioMedicine*. 2015;2(7):690-8.
394. Koneru L, Ksiazek M, Waligorska I, Straczek A, Lukasik M, Madej M, et al. Mirolysin, a Lysarginase from *Tannerella forsythia*, proteolytically inactivates the human cathelicidin, LL-37. *Biological chemistry*. 2016.
395. Huo Y, Wang F, Sun B, Yin LR, Zhang PP, Zhang YJ, et al. [Prokaryotic expression and purification of antimicrobial peptide LL-37 and the inhibiting effect against *Candida albicans*]. *Zhonghua fu chan ke za zhi*. 2016;51(2):120-5.
396. Hsieh IN, Hartshorn KL. The Role of Antimicrobial Peptides in Influenza Virus Infection and Their Potential as Antiviral and Immunomodulatory Therapy. *Pharmaceuticals*. 2016;9(3).
397. Kim SH, Kim YN, Jang YS. Cutting Edge: LL-37-Mediated Formyl Peptide Receptor-2 Signaling in Follicular Dendritic Cells Contributes to B Cell Activation in Peyer's Patch Germinal Centers. *Journal of immunology*. 2016.
398. Zhu S, Gao B. Positive selection in cathelicidin host defense peptides: adaptation to exogenous pathogens or endogenous receptors? *Heredity*. 2016.
399. Gonzalez-Curiel I, Trujillo V, Montoya-Rosales A, Rincon K, Rivas-Calderon B, deHaro-Acosta J, et al. 1,25-dihydroxyvitamin D3 induces LL-37 and HBD-2 production in keratinocytes from diabetic foot ulcers promoting wound healing: an in vitro model. *PloS one*. 2014;9(10):e111355.
400. Maggiora LL, Smith CW, Zhang ZY. A general method for the preparation of internally quenched fluorogenic protease substrates using solid-phase peptide synthesis. *J Med Chem*. 1992;35(21):3727-30.
401. Renkonen O. A note on spectrophotometric determination of acyl ester groups in lipids. *Biochimica et biophysica acta*. 1961;54:361-2.
402. NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada. NCCLS. 2009;19087-1898 Estados Unidos: NCCLS 2009.
403. Pillai SK MJR, and Eliopoulos GM. 2005. Antimicrobial combinations. In: Lorian, Victor. *Antibiotics in laboratory medicine*. 5th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. xiii, 889 p. p.

404. Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*. 1978;15(1):261-7.
405. Gomatos PJ. RNA synthesis in reovirus-infected L929 mouse fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1967;58(4):1798-805.
406. Zhu XM, Wang YX, Leung KC, Lee SF, Zhao F, Wang DW, et al. Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. *International journal of nanomedicine*. 2012;7:953-64.
407. Fransson H, Petersson K, Davies JR. Effects of bacterial products on the activity of odontoblast-like cells and their formation of type 1 collagen. *International endodontic journal*. 2014;47(4):397-404.
408. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*. 1983;65(1-2):55-63.
409. van de Loosdrecht AA, Nennie E, Ossenkoppele GJ, Beelen RH, Langenhuijsen MM. Cell mediated cytotoxicity against U 937 cells by human monocytes and macrophages in a modified colorimetric MTT assay. A methodological study. *Journal of immunological methods*. 1991;141(1):15-22.
410. Kwon DH, Cheon JM, Choi EO, Jeong JW, Lee KW, Kim KY, et al. The Immunomodulatory Activity of Mori folium, the Leaf of *Morus alba* L., in RAW 264.7 Macrophages In Vitro. *Journal of cancer prevention*. 2016;21(3):144-51.
411. Jozwiak J, Skopinski P, Malejczyk J. Production of interleukin-1 beta, interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha by a rat corneal epithelial cell line. *International journal of tissue reactions*. 2000;22(4):105-10.
412. Wang Z, Ding L, Zhang S, Jiang T, Yang Y, Li R. Effects of icariin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1beta-stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells. *International journal of molecular medicine*. 2014;34(6):1720-6.
413. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem*. 1982;126(1):131-8.
414. Scott MG, Davidson DJ, Gold MR, Bowdish D, Hancock RE. The human antimicrobial peptide LL-37 is a multifunctional modulator of innate immune responses. *Journal of immunology*. 2002;169(7):3883-91.

415. Zancan RF, Vivan RR, Milanda Lopes MR, Weckwerth PH, de Andrade FB, Ponce JB, et al. Antimicrobial Activity and Physicochemical Properties of Calcium Hydroxide Pastes Used as Intracanal Medication. *Journal of endodontics*. 2016;42(12):1822-8.
416. Werner G, Coque TM, Franz CM, Grohmann E, Hegstad K, Jensen L, et al. Antibiotic resistant enterococci-tales of a drug resistance gene trafficker. *International journal of medical microbiology : IJMM*. 2013;303(6-7):360-79.
417. Tendolkar PM, Baghdayan AS, Shankar N. Pathogenic enterococci: new developments in the 21st century. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2003;60(12):2622-36.
418. Rocas IN, Siqueira JF, Jr., Santos KR. Association of *Enterococcus faecalis* with different forms of periradicular diseases. *Journal of endodontics*. 2004;30(5):315-20.
419. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *International endodontic journal*. 2001;34(5):399-405.
420. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1174.
421. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*. 2013;64:175-88.
422. Brooks JL, Jefferson KK. Staphylococcal biofilms: quest for the magic bullet. *Advances in applied microbiology*. 2012;81:63-87.
423. Nirupama DN, Nainan MT, Ramaswamy R, Muralidharan S, Usha HH, Sharma R, et al. In Vitro Evaluation of the Antimicrobial Efficacy of Four Endodontic Biomaterials against *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, and *Staphylococcus aureus*. *International journal of biomaterials*. 2014;2014:383756.
424. Al-Dhaheer HS, Al-Tamimi MD, Khandekar RB, Khan M, Stone DU. Ocular Pathogens and Antibiotic Sensitivity in Bacterial Keratitis Isolates at King Khaled Eye Specialist Hospital, 2011 to 2014. *Cornea*. 2016;35(6):789-94.
425. Akhtar MS, Mohsin N, Zahak A, Ain MR, Pillai PK, Kapur P, et al. Antimicrobial sensitivity pattern of bacterial pathogens in urinary tract infections in South Delhi, India. *Reviews on recent clinical trials*. 2014;9(4):271-5.
426. Tato M, Lopez Y, Morosini MI, Moreno-Bofarull A, Garcia-Alonso F, Gargallo-Viola D, et al. Characterization of variables that may influence ozenoxacin in

susceptibility testing, including MIC and MBC values. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2014;78(3):263-7.

427. Ramon MS, Canton E, Peman J, Pastor A, Martinez JP. Mechanisms of action of quinolones against staphylococci and relationship with their in vitro bactericidal activity. *Chemotherapy*. 1999;45(3):175-82.

428. de Rapper S, Viljoen A, van Vuuren S. The In Vitro Antimicrobial Effects of *Lavandula angustifolia* Essential Oil in Combination with Conventional Antimicrobial Agents. *Evidence-based complementary and alternative medicine : eCAM*. 2016;2016:2752739.

429. Tong Z, Zhang Y, Ling J, Ma J, Huang L, Zhang L. An in vitro study on the effects of nisin on the antibacterial activities of 18 antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *PloS one*. 2014;9(2):e89209.

430. Guven N, Kaynak Onurdag F. [Investigation of antimicrobial and antibiofilm effects of some preservatives used in drugs, cosmetics and food products]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2014;48(1):94-105.

431. Lee EW, Huda MN, Kuroda T, Mizushima T, Tsuchiya T. EfrAB, an ABC multidrug efflux pump in *Enterococcus faecalis*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(12):3733-8.

432. Carreira Cde M, dos Santos SS, Jorge AO, Lage-Marques JL. Antimicrobial effect of intracanal substances. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2007;15(5):453-8.

433. Barza M, Brown RB, Shanks C, Gamble C, Weinstein L. Relation between lipophilicity and pharmacological behavior of minocycline, doxycycline, tetracycline, and oxytetracycline in dogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1975;8(6):713-20.

434. Bishburg E, Bishburg K. Minocycline--an old drug for a new century: emphasis on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and *Acinetobacter baumannii*. *International journal of antimicrobial agents*. 2009;34(5):395-401.

435. Colton B, McConeghy KW, Schreckenberger PC, Danziger LH. I.V. minocycline revisited for infections caused by multidrug-resistant organisms. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. 2016;73(5):279-85.

436. Oehler R, Polacek N, Steiner G, Barta A. Interaction of tetracycline with RNA: photoincorporation into ribosomal RNA of *Escherichia coli*. *Nucleic acids research*. 1997;25(6):1219-24.
437. Noah JW, Dolan MA, Babin P, Wollenzien P. Effects of tetracycline and spectinomycin on the tertiary structure of ribosomal RNA in the *Escherichia coli* 30 S ribosomal subunit. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(23):16576-81.
438. Maestre JR, Aguilar L, Mateo M, Gimenez MJ, Mendez ML, Alou L, et al. In vitro interference of tigecycline at subinhibitory concentrations on biofilm development by *Enterococcus faecalis*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012;67(5):1155-8.
439. Milatovic D, Schmitz FJ, Verhoef J, Fluit AC. Activities of the glycylycylglycine tigecycline (GAR-936) against 1,924 recent European clinical bacterial isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2003;47(1):400-4.
440. Saravolatz LD, Pawlak J, Johnson LB. In vitro susceptibilities and molecular analysis of vancomycin-intermediate and vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2012;55(4):582-6.
441. Dou XC, Zhu XP, Zhou J, Cai HQ, Tang J, Li QL. Minocycline-released hydroxyapatite-gelatin nanocomposite and its cytocompatibility in vitro. *Biomedical materials*. 2011;6(2):025002.
442. Howe K, Kissinger PJ. Single-Dose Compared With Multidose Metronidazole for the Treatment of Trichomoniasis in Women: A Meta-Analysis. *Sexually transmitted diseases*. 2017;44(1):29-34.
443. Hoshino E, Kota K, Sato M, Iwaku M. Bactericidal efficacy of metronidazole against bacteria of human carious dentin in vitro. *Caries research*. 1988;22(5):280-2.
444. Kim SY, Shin SJ, Song CH, Jo EK, Kim HJ, Park JK. Identification of novel metronidazole-inducible genes in *Mycobacterium smegmatis* using a customized amplification library. *FEMS microbiology letters*. 2008;282(2):282-9.
445. Barbosa-Ribeiro M, De-Jesus-Soares A, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Antimicrobial Susceptibility and Characterization of Virulence Genes of *Enterococcus faecalis* Isolates from Teeth with Failure of the Endodontic Treatment. *Journal of endodontics*. 2016;42(7):1022-8.

446. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *International endodontic journal*. 1996;29(2):118-24.
447. Adl A, Hamedi S, Sedigh Shams M, Motamedifar M, Sobhnamayan F. The ability of triple antibiotic paste and calcium hydroxide in disinfection of dentinal tubules. *Iranian endodontic journal*. 2014;9(2):123-6.
448. Devaraj S, Jagannathan N, Neelakantan P. Antibiofilm efficacy of photoactivated curcumin, triple and double antibiotic paste, 2% chlorhexidine and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in vitro. *Scientific reports*. 2016;6:24797.
449. Sabrah AH, Yassen GH, Spolnik KJ, Hara AT, Platt JA, Gregory RL. Evaluation of Residual Antibacterial Effect of Human Radicular Dentin Treated with Triple and Double Antibiotic Pastes. *Journal of endodontics*. 2015;41(7):1081-4.
450. Frough Reyhani M, Rahimi S, Fathi Z, Shakouie S, Salem Milani A, Soroush Barhaghi MH, et al. Evaluation of Antimicrobial Effects of Different Concentrations of Triple Antibiotic Paste on Mature Biofilm of *Enterococcus faecalis*. *Journal of dental research, dental clinics, dental prospects*. 2015;9(3):138-43.
451. Coorens M, Scheenstra MR, Veldhuizen EJ, Haagsman HP. Interspecies cathelicidin comparison reveals divergence in antimicrobial activity, TLR modulation, chemokine induction and regulation of phagocytosis. *Scientific reports*. 2017;7:40874.
452. Lee CC, Sun Y, Qian S, Huang HW. Transmembrane pores formed by human antimicrobial peptide LL-37. *Biophysical journal*. 2011;100(7):1688-96.
453. Krahulec J, Hyrsova M, Pepeliaev S, Jilkova J, Cerny Z, Machalkova J. High level expression and purification of antimicrobial human cathelicidin LL-37 in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*. 2010;88(1):167-75.
454. Kubicek-Sutherland JZ, Lofton H, Vestergaard M, Hjort K, Ingmer H, Andersson DI. Antimicrobial peptide exposure selects for *Staphylococcus aureus* resistance to human defence peptides. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2017;72(1):115-27.
455. Leszczynska K, Namiot D, Byfield FJ, Cruz K, Zendzian-Piotrowska M, Fein DE, et al. Antibacterial activity of the human host defence peptide LL-37 and selected synthetic cationic lipids against bacteria associated with oral and upper respiratory tract infections. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2013;68(3):610-8.

456. Sieprawska-Lupa M, Mydel P, Krawczyk K, Wojcik K, Puklo M, Lupa B, et al. Degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Staphylococcus aureus*-derived proteinases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004;48(12):4673-9.
457. Schmidtchen A, Frick IM, Andersson E, Tapper H, Bjorck L. Proteinases of common pathogenic bacteria degrade and inactivate the antibacterial peptide LL-37. *Molecular microbiology*. 2002;46(1):157-68.
458. Wang Z, de la Fuente-Nunez C, Shen Y, Haapasalo M, Hancock RE. Treatment of Oral Multispecies Biofilms by an Anti-Biofilm Peptide. *PloS one*. 2015;10(7):e0132512.
459. Bolouri H, Savman K, Wang W, Thomas A, Maurer N, Dullaghan E, et al. Innate defense regulator peptide 1018 protects against perinatal brain injury. *Annals of neurology*. 2014;75(3):395-410.
460. Lashua LP, Melvin JA, Deslouches B, Pilewski JM, Montelaro RC, Bomberger JM. Engineered cationic antimicrobial peptide (eCAP) prevents *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth on airway epithelial cells. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2016;71(8):2200-7.
461. Field D, Seisling N, Cotter PD, Ross RP, Hill C. Synergistic Nisin-Polymyxin Combinations for the Control of *Pseudomonas* Biofilm Formation. *Frontiers in microbiology*. 2016;7:1713.
462. Garbacz K, Kamysz W, Piechowicz L. Activity of antimicrobial peptides, alone or combined with conventional antibiotics, against *Staphylococcus aureus* isolated from the airways of cystic fibrosis patients. *Virulence*. 2016:1-7.
463. Yu G, Baeder DY, Regoes RR, Rolff J. Combination Effects of Antimicrobial Peptides. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2016;60(3):1717-24.
464. Walkenhorst WF. Using adjuvants and environmental factors to modulate the activity of antimicrobial peptides. *Biochimica et biophysica acta*. 2016;1858(5):926-35.
465. He J, Starr CG, Wimley WC. A lack of synergy between membrane-permeabilizing cationic antimicrobial peptides and conventional antibiotics. *Biochimica et biophysica acta*. 2015;1848(1 Pt A):8-15.
466. Torabinejad M, Faras H, Corr R, Wright KR, Shabahang S. Histologic examinations of teeth treated with 2 scaffolds: a pilot animal investigation. *Journal of endodontics*. 2014;40(4):515-20.

467. Ito T, Kaneko T, Sueyama Y, Kaneko R, Okiji T. Dental pulp tissue engineering of pulpotomized rat molars with bone marrow mesenchymal stem cells. *Odontology*. 2016.
468. Lee JH, Pryce BA, Schweitzer R, Ryder MI, Ho SP. Differentiating zones at periodontal ligament-bone and periodontal ligament-cementum entheses. *Journal of periodontal research*. 2015;50(6):870-80.
469. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *Journal of endodontics*. 2015;41(2):146-54.
470. Zaruba M, Rechenberg DK, Thurnheer T, Attin T, Schmidlin PR. Endodontic drug delivery for root surface disinfection: a laboratory feasibility evaluation. *Clinical oral investigations*. 2016;20(3):607-13.
471. Namour M, Theys S. Pulp revascularization of immature permanent teeth: a review of the literature and a proposal of a new clinical protocol. *TheScientificWorldJournal*. 2014;2014:737503.
472. Leyva-Ramos S, Hernandez-Lopez H. [Fluoroquinolones: Non-antibacterial properties]. *Revista española de quimioterapia : publicacion oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia*. 2017;30(1):1-8.
473. Luck PC, Schmitt JW, Hengerer A, Helbig JH. Subinhibitory concentrations of antimicrobial agents reduce the uptake of *Legionella pneumophila* into *Acanthamoeba castellanii* and U937 cells by altering the expression of virulence-associated antigens. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1998;42(11):2870-6.
474. Brillault J, Tewes F, Couet W, Olivier JC. In vitro biopharmaceutical evaluation of ciprofloxacin/metal cation complexes for pulmonary administration. *European journal of pharmaceutical sciences : official journal of the European Federation for Pharmaceutical Sciences*. 2017;97:92-8.
475. Gorla N, Garcia Ovando H, Larripa I. Chromosomal aberrations in human lymphocytes exposed in vitro to enrofloxacin and ciprofloxacin. *Toxicology letters*. 1999;104(1-2):43-8.
476. Kamocki K, Nor JE, Bottino MC. Effects of ciprofloxacin-containing antimicrobial scaffolds on dental pulp stem cell viability-In vitro studies. *Archives of oral biology*. 2015;60(8):1131-7.
477. Shankhwar N, Kumar M, Mandal BB, Robi PS, Srinivasan A. Electrospun polyvinyl alcohol-polyvinyl pyrrolidone nanofibrous membranes for interactive wound

dressing application. *Journal of biomaterials science Polymer edition*. 2016;27(3):247-62.

478. Ramesh S, Govender T, Kruger HG, de la Torre BG, Albericio F. Short AntiMicrobial Peptides (SAMPs) as a class of extraordinary promising therapeutic agents. *Journal of peptide science : an official publication of the European Peptide Society*. 2016;22(7):438-51.

479. Turner-Brannen E, Choi KY, Lippert DN, Cortens JP, Hancock RE, El-Gabalawy H, et al. Modulation of interleukin-1beta-induced inflammatory responses by a synthetic cationic innate defence regulator peptide, IDR-1002, in synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy*. 2011;13(4):R129.

480. Huante-Mendoza A, Silva-Garcia O, Oviedo-Boyso J, Hancock RE, Baizabal-Aguirre VM. Peptide IDR-1002 Inhibits NF-kappaB Nuclear Translocation by Inhibition of IkappaBalpha Degradation and Activates p38/ERK1/2-MSK1-Dependent CREB Phosphorylation in Macrophages Stimulated with Lipopolysaccharide. *Frontiers in immunology*. 2016;7:533.

481. Wong JP, Schnell G, Simpson M, Saravolac E. Effects of liposome-encapsulated ciprofloxacin on phagocytosis, nitric oxide and intracellular killing of *Staphylococcus aureus* by murine macrophages. *Artificial cells, blood substitutes, and immobilization biotechnology*. 2000;28(5):415-28.

482. Garrido-Mesa N, Camuesco D, Arribas B, Comalada M, Bailon E, Cueto-Sola M, et al. The intestinal anti-inflammatory effect of minocycline in experimental colitis involves both its immunomodulatory and antimicrobial properties. *Pharmacological research*. 2011;63(4):308-19.

483. Naqvi AR, Zhong S, Dang H, Fordham JB, Nares S, Khan A. Expression Profiling of LPS Responsive miRNA in Primary Human Macrophages. *Journal of microbial & biochemical technology*. 2016;8(2):136-43.

484. Ricucci D, Loghin S, Lin LM, Spangberg LS, Tay FR. Is hard tissue formation in the dental pulp after the death of the primary odontoblasts a regenerative or a reparative process? *Journal of dentistry*. 2014;42(9):1156-70.

485. Ryu YH, Baik JE, Yang JS, Kang SS, Im J, Yun CH, et al. Differential immunostimulatory effects of Gram-positive bacteria due to their lipoteichoic acids. *International immunopharmacology*. 2009;9(1):127-33.

486. Sriram G, Natu VP, Islam I, Fu X, Seneviratne CJ, Tan KS, et al. Innate Immune Response of Human Embryonic Stem Cell-Derived Fibroblasts and Mesenchymal Stem Cells to Periodontopathogens. *Stem cells international*. 2016;2016:8905365.
487. Iglesias-Linares A, Hartsfield JK, Jr. Cellular and Molecular Pathways Leading to External Root Resorption. *Journal of dental research*. 2017;96(2):145-52.
488. Zidek Z, Farghali H, Kmonickova E. Intrinsic nitric oxide-stimulatory activity of lipoteichoic acids from different Gram-positive bacteria. *Nitric oxide : biology and chemistry*. 2010;23(4):300-10.
489. Majka G, Wiecek G, Srottek M, Spiewak K, Brindell M, Koziel J, et al. The impact of lactoferrin with different levels of metal saturation on the intestinal epithelial barrier function and mucosal inflammation. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*. 2016;29(6):1019-33.
490. Gao YL, Chai YF, Qi AL, Yao Y, Liu YC, Dong N, et al. Neuropilin-1highCD4(+)CD25(+) Regulatory T Cells Exhibit Primary Negative Immunoregulation in Sepsis. *Mediators of inflammation*. 2016;2016:7132158.
491. Chaves CA, Vergani CE, Thomas D, Young A, Costa CA, Salih VM, et al. Biological effects of soft denture reline materials on L929 cells in vitro. *Journal of tissue engineering*. 2014;5:2041731414540911.
492. Miljkovic D, Cvetkovic I, Sajic M, Vuckovic O, Harhaji L, Markovic M, et al. 5-Aza-2'-deoxycytidine and paclitaxel inhibit inducible nitric oxide synthase activation in fibrosarcoma cells. *European journal of pharmacology*. 2004;485(1-3):81-8.
493. Miljkovic D, Cvetkovic I, Stosic-Grujicic S, Trajkovic V. Mycophenolic acid inhibits activation of inducible nitric oxide synthase in rodent fibroblasts. *Clinical and experimental immunology*. 2003;132(2):239-46.
494. Zhang X, Aubin JE, Kim TH, Payne U, Chiu B, Inman RD. Synovial fibroblasts infected with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mediate osteoclast differentiation and activation. *Infection and immunity*. 2004;72(12):7183-9.
495. Ok E, Altunsoy M, Nur BG, Kalkan A. Effectiveness of different irrigation solutions on triple antibiotic paste removal from simulated immature root canal. *Scanning*. 2015;37(6):409-13.
496. Arslan H, Akcay M, Capar ID, Ertas H, Ok E, Uysal B. Efficacy of needle irrigation, EndoActivator, and photon-initiated photoacoustic streaming technique on removal of double and triple antibiotic pastes. *Journal of endodontics*. 2014;40(9):1439-42.

497. Berkhoff JA, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A. Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *Journal of endodontics*. 2014;40(8):1172-7.
498. Arslan H, Capar ID, Saygili G, Uysal B, Gok T, Ertas H, et al. Efficacy of various irrigation protocols on the removal of triple antibiotic paste. *International endodontic journal*. 2014;47(6):594-9.
499. Ciornei CD, Egesten A, Bodelsson M. Effects of human cathelicidin antimicrobial peptide LL-37 on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release from rat aorta in vitro. *Acta anaesthesiologica Scandinavica*. 2003;47(2):213-20.
500. Oliveira-Bravo M, Sangiorgi BB, Schiavinato JL, Carvalho JL, Covas DT, Panepucci RA, et al. LL-37 boosts immunosuppressive function of placenta-derived mesenchymal stromal cells. *Stem cell research & therapy*. 2016;7(1):189.
501. Kumagai S, Matsui K, Kawaguchi H, Yamashita T, Mohri T, Fujio Y, et al. Cathelicidin antimicrobial peptide inhibits fibroblast migration via P2X7 receptor signaling. *Biochemical and biophysical research communications*. 2013;437(4):609-14.
502. Jonsson D, Nilsson BO. The antimicrobial peptide LL-37 is anti-inflammatory and proapoptotic in human periodontal ligament cells. *Journal of periodontal research*. 2012;47(3):330-5.
503. Kwack KH, Lee JM, Park SH, Lee HW. Human Dental Pulp Stem Cells Suppress Alloantigen-induced Immunity by Stimulating T Cells to Release Transforming Growth Factor Beta. *Journal of endodontics*. 2017;43(1):100-8.
504. Lee S, Zhang QZ, Karabucak B, Le AD. DPSCs from Inflamed Pulp Modulate Macrophage Function via the TNF-alpha/IDO Axis. *Journal of dental research*. 2016;95(11):1274-81.
505. Pereira MS, Rossi MA, Cardoso CR, da Silva JS, Bezerra da Silva LA, Kuga MC, et al. Cellular and molecular tissue response to triple antibiotic intracanal dressing. *Journal of endodontics*. 2014;40(4):499-504.
506. Papa S, Caron I, Erba E, Panini N, De Paola M, Mariani A, et al. Early modulation of pro-inflammatory microglia by minocycline loaded nanoparticles confers long lasting protection after spinal cord injury. *Biomaterials*. 2016;75:13-24.
507. Schroder NW, Opitz B, Lamping N, Michelsen KS, Zahringer U, Gobel UB, et al. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll-like receptors in

the initiation of innate immune responses by *Treponema* glycolipids. *Journal of immunology*. 2000;165(5):2683-93.

508. Bailly S, Fay M, Gougerot-Pocidal MA. [Effects of antibiotics on production of cytokines by human monocytes]. *Pathologie-biologie*. 1993;41(8 Pt 2):838-44.

509. Stunkel KG, Hewlett G, Zeiler HJ. Ciprofloxacin enhances T cell function by modulating interleukin activities. *Clinical and experimental immunology*. 1991;86(3):525-31.

510. Ogino H, Fujii M, Ono M, Maezawa K, Hori S, Kizu J. In vivo and in vitro effects of fluoroquinolones on lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*. 2009;15(3):168-73.

511. Dalhoff A, Shalit I. Immunomodulatory effects of quinolones. *The Lancet Infectious diseases*. 2003;3(6):359-71.

512. Katsuno G, Takahashi HK, Iwagaki H, Mizuno K, Yagi T, Mori S, et al. The immunosuppressive effects of ciprofloxacin during human mixed lymphocyte reaction. *Clinical immunology*. 2006;119(1):110-9.

513. Blau H, Klein K, Shalit I, Halperin D, Fabian I. Moxifloxacin but not ciprofloxacin or azithromycin selectively inhibits IL-8, IL-6, ERK1/2, JNK, and NF-kappaB activation in a cystic fibrosis epithelial cell line. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;292(1):L343-52.

514. Lee M, Shi X, Barron AE, McGeer E, McGeer PL. Human antimicrobial peptide LL-37 induces glial-mediated neuroinflammation. *Biochemical pharmacology*. 2015;94(2):130-41.

515. Brown KL, Poon GF, Birkenhead D, Pena OM, Falsafi R, Dahlgren C, et al. Host defense peptide LL-37 selectively reduces proinflammatory macrophage responses. *Journal of immunology*. 2011;186(9):5497-505.

516. Ginsburg I. Role of lipoteichoic acid in infection and inflammation. *The Lancet Infectious diseases*. 2002;2(3):171-9.

517. Ruan Y, Shen T, Wang Y, Hou M, Li J, Sun T. Antimicrobial peptide LL-37 attenuates LTA induced inflammatory effect in macrophages. *International immunopharmacology*. 2013;15(3):575-80.

518. Lishko VK, Moreno B, Podolnikova NP, Ugarova TP. Identification of Human Cathelicidin Peptide LL-37 as a Ligand for Macrophage Integrin alphaMbeta2 (Mac-1,

CD11b/CD18) that Promotes Phagocytosis by Opsonizing Bacteria. *Research and reports in biochemistry*. 2016;2016(6):39-55.

519. Yu J, Mookherjee N, Wee K, Bowdish DM, Pistolic J, Li Y, et al. Host defense peptide LL-37, in synergy with inflammatory mediator IL-1beta, augments immune responses by multiple pathways. *Journal of immunology*. 2007;179(11):7684-91.

520. Zughair SM, Svoboda P, Pohl J, Stephens DS, Shafer WM. The human host defense peptide LL-37 interacts with *Neisseria meningitidis* capsular polysaccharides and inhibits inflammatory mediators release. *PloS one*. 2010;5(10):e13627.

521. Li Y, Cai L, Wang H, Wu P, Gu W, Chen Y, et al. Pleiotropic regulation of macrophage polarization and tumorigenesis by formyl peptide receptor-2. *Oncogene*. 2011;30(36):3887-99.

522. Mookherjee N, Brown KL, Bowdish DM, Doria S, Falsafi R, Hokamp K, et al. Modulation of the TLR-mediated inflammatory response by the endogenous human host defense peptide LL-37. *Journal of immunology*. 2006;176(4):2455-64.

523. Torres-Juarez F, Cardenas-Vargas A, Montoya-Rosales A, Gonzalez-Curiel I, Garcia-Hernandez MH, Enciso-Moreno JA, et al. LL-37 immunomodulatory activity during *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages. *Infection and immunity*. 2015;83(12):4495-503.

524. Into T, Inomata M, Shibata K, Murakami Y. Effect of the antimicrobial peptide LL-37 on Toll-like receptors 2-, 3- and 4-triggered expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 in human gingival fibroblasts. *Cellular immunology*. 2010;264(1):104-9.

525. Inomata M, Into T, Murakami Y. Suppressive effect of the antimicrobial peptide LL-37 on expression of IL-6, IL-8 and CXCL10 induced by *Porphyromonas gingivalis* cells and extracts in human gingival fibroblasts. *European journal of oral sciences*. 2010;118(6):574-81.

526. Montreekachon P, Chotjumlong P, Bolscher JG, Nazmi K, Reutrakul V, Krisanaprakornkit S. Involvement of P2X(7) purinergic receptor and MEK1/2 in interleukin-8 up-regulation by LL-37 in human gingival fibroblasts. *Journal of periodontal research*. 2011;46(3):327-37.

527. Haisma EM, de Breij A, Chan H, van Dissel JT, Drijfhout JW, Hiemstra PS, et al. LL-37-derived peptides eradicate multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* from thermally wounded human skin equivalents. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2014;58(8):4411-9.

528. Dey S, Bishayi B. Killing of *Staphylococcus aureus* in murine macrophages by chloroquine used alone and in combination with ciprofloxacin or azithromycin. *Journal of inflammation research*. 2015;8:29-47.
529. Bedran TB, Mayer MP, Spolidorio DP, Grenier D. Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *PloS one*. 2014;9(9):e106766.

9 ANEXO A - ESPECTRO DE MASSA DOS PEPTÍDEOS ANTIMICROBIANOS E IMUNOMODULADORES

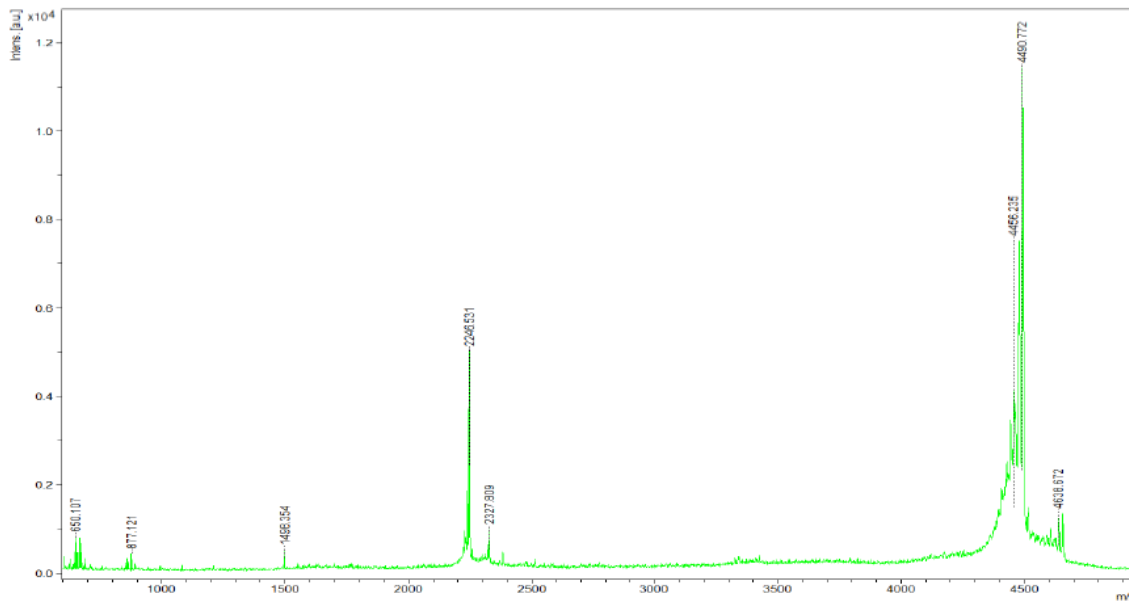


Figura 25 – Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo LL-37 (4490,8 Da), com pureza superior a 95%.

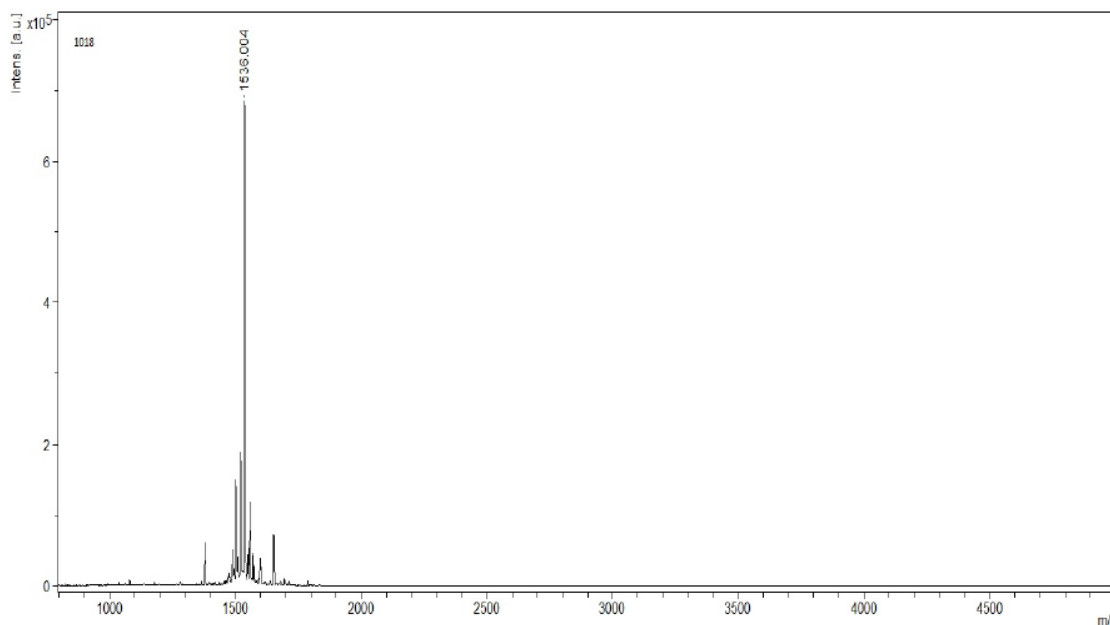


Figura 26 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1018 (1536 Da), com pureza superior a 95%.

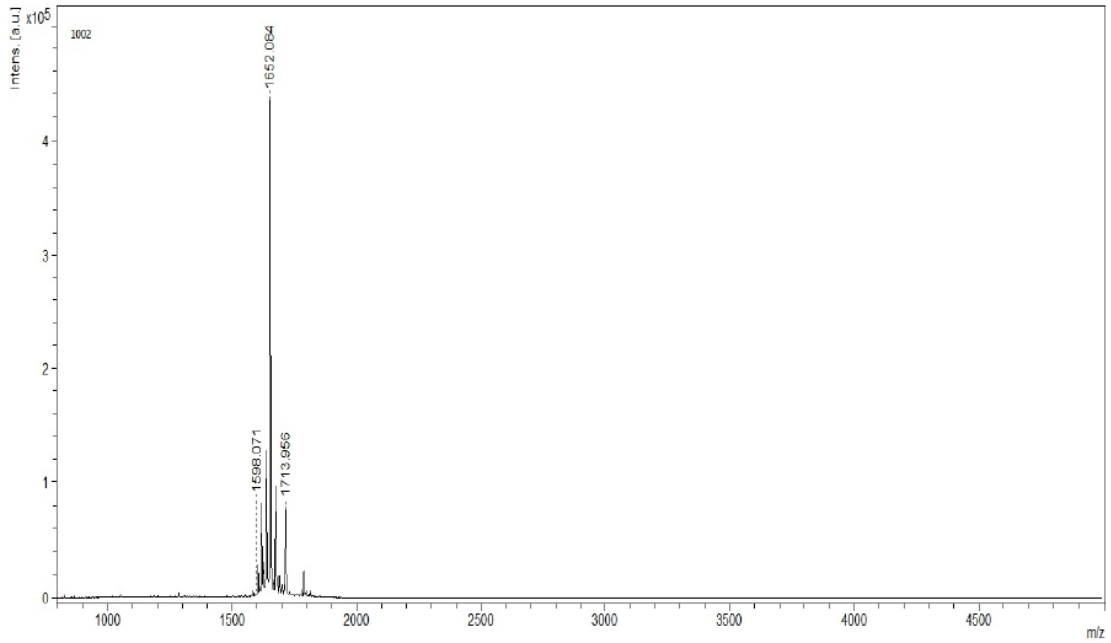


Figura 27 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo IDR-1002 (1652,1 Da), com pureza superior a 95%.

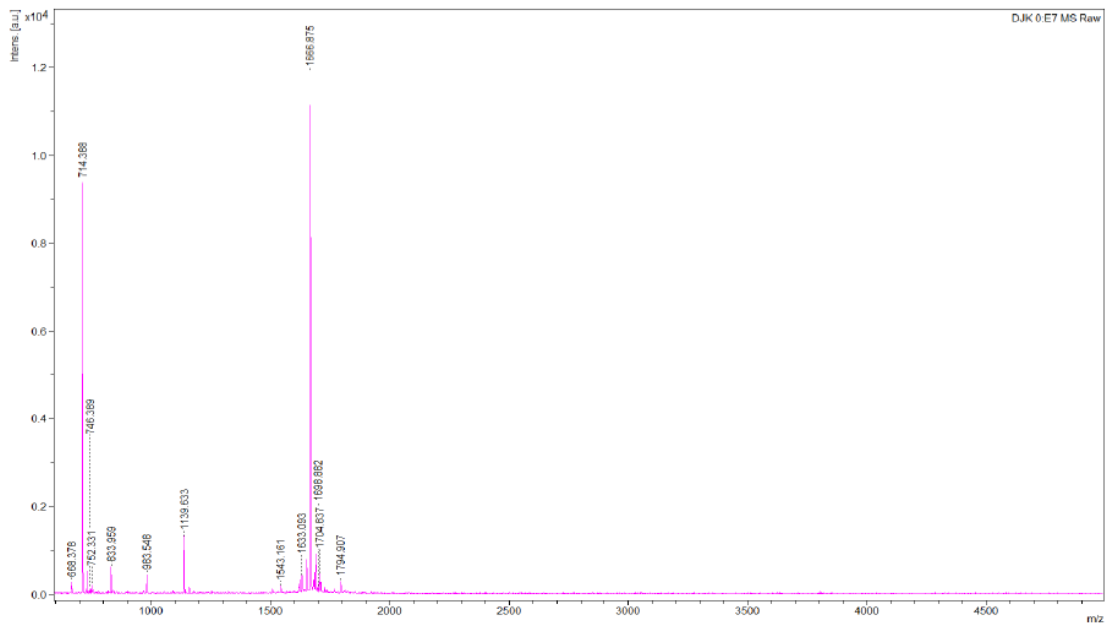


Figura 28 - Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao peptídeo DJK-6 (1666,9 Da), com pureza superior a 95%.

10 ANEXO B – CURVAS DE CRESCIMENTO PARA DETERMINAÇÃO DE FASE LOGARÍTMICA DE *E. FAECALIS* E *S.AUREUS*

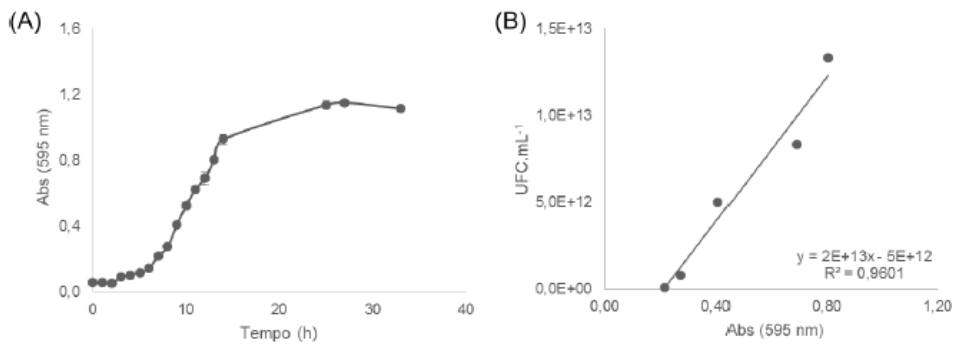


Figura 29 - Curvas representativa de crescimento da bactéria *E. faecalis* de três réplicas biológicas para determinação de fase logarítmica realizada previamente pelo grupo. (A) representa a determinação do número de células totais a partir da relação D. O. versus tempo de incubação em horas. (B) representa a linha de tendência com equação e R^2 e a determinação do número de células viáveis a partir da relação D. O. versus UFC.mL⁻¹.

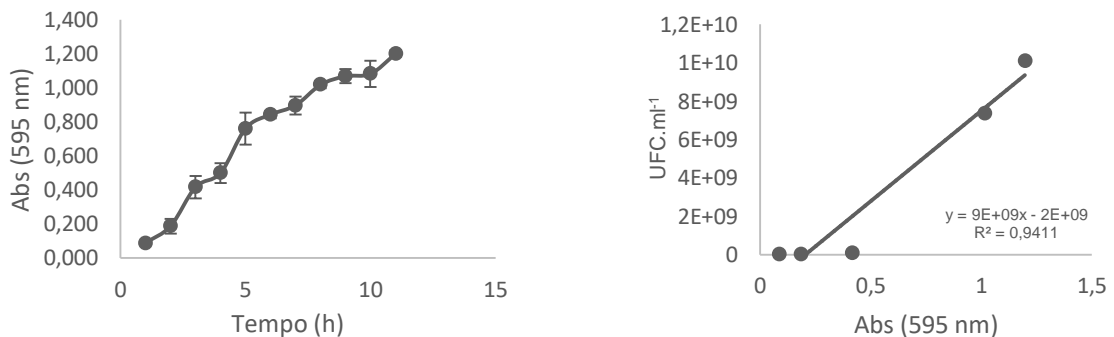


Figura 30 - Curvas representativa de crescimento da bactéria *S. aureus* de três réplicas biológicas para determinação de fase logarítmica realizada previamente pelo grupo. (A) representa a determinação do número de células totais a partir da relação D. O. versus tempo de incubação em horas. (B) representa a linha de tendência com equação e R^2 e a determinação do número de células viáveis a partir da relação D. O. versus UFC.mL⁻¹.

11 ANEXO C – PUBLICAÇÕES

ARTICLE IN PRESS

Basic Research—Biology

Immune Response Profile against Persistent Endodontic Pathogens *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* In Vitro

Stella Maris de Freitas Lima, MSc,^{*,†} Maurício Gonçalves da Costa Sousa,^{*,‡}
 Mirna de Souza Freire, MSc,^{*,§} Jeiser Alves de Almeida, PhD,^{*,||}
 Ana Paula de Castro Cantuária, DSc,^{*,‡} Tbaís Angélica Machado e Silva, DDS,^{*,†}
 Camila Guimarães de Freitas, MSc,^{*,§} Simoni Campos Dias, PhD,^{*,*} Octávio Luiz Franco, PhD,^{*,**}
 and Tática Maria Berto Rezende, PhD^{*,†,‡}

Abstract

Introduction: Persistent microorganisms such as *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis* might be directly related to endodontic treatment failure. The host response to these microorganisms impairs the reestablishment of intraradicular and periradicular health. **Methods:** The present investigation evaluated the expression of inflammatory mediators produced by RAW 264.7 cells in the presence of heat-killed antigens (HK) *C. albicans* and *E. faecalis*. Cultures of RAW cells were stimulated with both antigens in the presence or absence of recombinant interferon (rIFN)- γ . Parameters of cell viability, production of nitric oxide (NO), as well as the synthesis of interleukin (IL)-1 α , IL-6, IL-10, IL-12, monocyte chemoattractant protein-1, and tumor necrosis factor (TNF)- α were analyzed. **Results:** Results demonstrated that cell viability was especially reduced in antigens and rIFN- γ -stimulated groups. Groups stimulated with HK *C. albicans* upregulated IL-10 production. Otherwise, the addition of rIFN- γ to HK *C. albicans* upregulated TNF- α and NO production. Groups stimulated with HK *E. faecalis* upregulated TNF- α production. HK *E. faecalis* and rIFN- γ upregulated TNF- α and NO synthesis. The production of other cytokines remained unchanged by all stimuli. **Conclusions:** Knowledge regarding the host mechanism of response to microorganisms that perpetuate endodontic infection and the periradicular lesions can contribute to optimization of endodontic therapy. The mentioned inflammatory mediators and virulence factors involved in endodontic failure might guide lesion progression and also be targets in the development of disinfectant and immunomodulatory agents. (*J Endod* 2015; ■:1–5)

Key Words

Apical periodontitis, bone resorption, *Candida albicans*, endodontics, *Enterococcus faecalis*

Endodontic failures are caused mainly by persistence of microorganisms in the root canal system, exacerbated immune inflammatory response, and bone resorption. The yeast *Candida albicans* and the gram-positive bacterium *Enterococcus faecalis* are examples of microorganisms capable of resisting disinfection processes in endodontic therapy (1). The immune inflammatory response to these microorganisms may culminate in harmful and persistent host periradicular damage.

Pulp and periradicular immune inflammatory response to persistent infection is driven by a wide number of cells and proteins. Macrophages actively participate in this process. Macrophage activation is related to microbicidal functions, cytokine secretion, immune cells recruitment and microbe phagocytosis, and/or release of toxic metabolites. Interferon (IFN)- γ is also responsible for macrophage activation even without microbial stimuli, inducing direct antimicrobial and antigen processing and also presentation mechanisms (2). In this way, macrophages derived from monocytes might be activated in 2 profiles, M1 and M2, at the infection site. M1 macrophages develop antimicrobial and tumor function, whereas M2 macrophages are related to cellular proliferation and tissue repair (3).

Evidence suggests that bone destruction occurs after the activation of osteoclast cells (4). Osteoclast differentiation may be affected by different cytokine stimuli produced by immunocompetent cells in apical periodontitis (5). Therefore, macrophage M1 activation can be involved with interleukin (IL)-6, IL-12, and tumor necrosis factor (TNF)- α production, whereas IL-10 production is involved with M2 activation (6). The present study evaluated the expression of important inflammatory mediators in the presence of heat-killed (HK) antigens of *C. albicans* and *E. faecalis* in RAW 264.7 monocyte cells.



Contents lists available at ScienceDirect

Biotechnology Advances

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biotechadv

Research review paper

Antimicrobial peptide-based treatment for endodontic infections – Biotechnological innovation in endodontics



Stella Maris de Freitas Lima^{a,b}, Gabriela Martins de Pádua^b, Maurício Gonçalves da Costa Sousa^{a,b},
Mirna de Souza Freire^{a,c}, Octávio Luiz Franco^{a,c,d,*}, Taia Maria Berto Rezende^{a,b,e,*}

^a Centro de Análises Proteômicas e Bioquímicas, Pós-graduação em Ciências Genômicas e Biotecnologia, Universidade Católica de Brasília, SGAN 916N, Av. W5, Campus II, Módulo C, Brasília, DF, Brazil

^b Curso de Odontologia, Universidade Católica de Brasília, Campus I, QS 07 Lote 01 room S213 EPT, Águas Claras, Taguatinga, DF, Brazil

^c Programa de Doutorado da Rede Centro-Oeste, Brasília, DF, Brazil

^d S-Inova, Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, MS, Brazil

^e Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde (FS), Campus Universitário Darcy Ribeiro, Brasília, DF, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 March 2014

Received in revised form 7 October 2014

Accepted 31 October 2014

Available online 10 November 2014

Keywords:

Endodontic microbiology

Intracanal dressing

Antimicrobial peptide

Endodontic disinfection

ABSTRACT

The presence/persistence of microorganisms in the pulp and periapical area corresponds to the maintenance of an exacerbated immune response that leads to the start of periradicular bone resorption and its perpetuation. In endodontic treatment, the available intracanal medications do not have all the desirable properties in the context of endodontic infection and apical periodontitis; they need to include not only strong antimicrobial performance but also an immunomodulatory and reparative activity, without host damage. In addition, there are various levels of resistance to root canal medications. Thus, antimicrobial agents that effectively eliminate resistant species in root canals could potentially improve endodontic treatment. In the emergence of new therapies, an increasing number of studies on antimicrobial peptides (AMPs) have been seen over the past few years. AMPs are defense biomolecules produced in response to infection, and they have a wide spectrum of action against many oral microorganisms. There are some studies that correlate peptides and oral infections, including oral peptides, neuropeptides, and bacterial, fish, bovine and synthetic peptides. So far, there are around 120 published studies correlating endodontic microbiota with AMPs but, according to our knowledge, there are no registered patents in the American patent database. There are a considerable number of AMPs that exhibit excellent antimicrobial activity against endodontic microbiota at a small inhibitory concentration and modulate an exacerbated immune response, down-regulating bone resorption. All these reasons indicate the antimicrobial peptide-based endodontic treatment as an emerging and promising option.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.