

DANILO CÉSAR MOTA MARTINS

ESTUDO COMPARATIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO DE DEFESA
DO HOSPEDEIRO IDR1002 E CIPROFLOXACINO EM CULTURAS DE CÉLULAS
PULPARES HUMANAS

BRASÍLIA

2019

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

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

DANILO CÉSAR MOTA MARTINS

ESTUDO COMPARATIVO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE O PEPTÍDEO DE DEFESA
DO HOSPEDEIRO IDR1002 E CIPROFLOXACINO EM CULTURAS DE CÉLULAS
PULPARES HUMANAS

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

Coorientador: Prof. Dr. Octávio Luiz Franco

BRASÍLIA

2019

Dedico este trabalho aos meus pais Nilton e Ana que sempre me apoiaram nas minhas escolhas, o incentivo e apoio de vocês é que tornou esse projeto realidade.

A Profª Drª Taia Maria Berto Rezende que sempre me abriu as portas para o desenvolvimento científico e crescimento profissional e ao Prof. Dr. Octávio Luiz Franco que sempre esteve junto da minha caminhada acadêmica. Por fim, aos meus amigos que sempre estiveram comigo.

AGRADECIMENTOS

À **Deus** pelo dom da vida, pela força e coragem. Por me atrair aos caminhos do céu junto à **Maria Santíssima** e **Santa Terezinha** em busca da santidade.

Aos meus pais **Nilton César Martins Vitorino** e **Ana Suêrda Mota Martins**, meus maiores incentivadores. Obrigado por todo amor depositado em mim diante das minhas escolhas pessoais e profissionais.

À orientadora **Prof^a. Dr.^a Taia Maria Berto Rezende**. Desde os tempos da Graduação, Iniciação Científica e Especialização tem sido minha inspiração. Além de toda ciência, agradeço pelos conselhos, oportunidades e extrema gentileza, sempre em prol do meu crescimento pessoal e profissional.

Ao coorientador **Prof. Dr. Octávio Luiz Franco**, pela confiança e por estar sempre presente nos projetos em que estive envolvido. Agradeço pelas oportunidades e por acreditar no desenvolvimento de novas terapias na Odontologia.

Aos membros da banca avaliadora, **Prof^a. Dr.^a. Loise Pedrosa Salles**, **Prof^a. Dr.^a. Juliana Lott de Carvalho** e ao **Prof. Dr. Marcos Pôrto de Arruda**, pela disponibilidade em avaliar e contribuir com o trabalho.

À **Prof^a. Dr.^a. Rosângela Vieira de Andrade** (CAPB/UCB) e à **Dr.^a. Lana Aguiar** por todo ensinamento e contribuição na execução dos experimentos qPCR.

Ao **Prof. Dr. Felipe Saldanha de Araújo**, à aluna de doutorado **Amandda Évellin Silva de Carvalho** e ao Departamento de Farmácia da Universidade de Brasília; por todo ensinamento e contribuição na execução dos experimentos de caracterização das células.

À minha noiva e companheira de vida **Júlia Mello**, pelo apoio incondicional, incentivo e paciência, que tantas vezes abdicou de si mesma ou da minha presença em prol das minhas escolhas. Te amo!

À **Luciana Nascimento** e **Marcos Mello**, por todo incentivo, apoio e carinho durante essa caminhada.

Aos amigos, colaboradores do grupo de pesquisa Biodonto e CAPB, **Arthur Corrêa, Ana Paula Cantuária, Elaine Lobo, Ingrid Aquino, Mirna Freire, Nelson Júnior, Viviane Martins, Bianca Simonassi, Thuany Alencar, Dayane Paiva, Michell Leite, Kamilla Sampaio e Kênia Chaves**. Obrigado por tudo!

À amiga e parceira de bancada **Poliana Amanda Oliveira Silva**, pela contribuição em várias etapas deste trabalho, gostaria de manifestar minha gratidão e admiração.

À amiga e **Prof^a. Dr^a. Stella Maris Freitas de Lima**, por todas as contribuições neste trabalho e inspiração profissional na Endodontia.

Ao amigo **Maurício Gonçalves da Costa**, o qual iniciou os estudos com o sinergismo proposto pelo trabalho e que sempre esteve disposto a me ajudar e acrescentar a esse estudo.

Aos meus grandes amigos **Elaine, Warly, Pedro Paulo, Lidiane, Luiz José, Isabella, Thiago, João Lucas, Maria Eduarda, João Marcos e Glória**. Obrigado por me acompanharem nessa caminhada e por todas as orações!

Ao **Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde** e toda estrutura 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.

“É justo que muito custe os que muito vale.”

Santa Tereza D'Ávila

RESUMO

O avanço da biotecnologia tem proporcionado significantes mudanças no âmbito da engenharia tecidual e com isso terapias regenerativas como a revascularização pulpar vem ganhando espaço na endodontia no tratamento de dentes permanentes imaturos. Porém, o uso das pastas antibióticas difundidas para técnica de revascularização e a imprevisibilidade da concentração de células tronco aprisionadas no coágulo sanguíneo podem afetar o processo de neoformação tecidual. Diante disto, novos protocolos têm sido estudados para aprimoramento da técnica. Por outro lado, os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) podem apresentar atividade antimicrobiana, imunomodulatória e regenerativa, surgindo como uma opção para a revascularização pulpar, podendo atuar de forma isolada ou em combinação com outras biomoléculas. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar a resposta das células pulpares na presença da associação sinérgica composta por um peptídeo de defesa do hospedeiro, o IDR-1002 e o antibiótico ciprofloxacino, um dos componentes da pasta duplo antibiótica (DAP), atualmente utilizada nos protocolos de revascularização pulpar. Para tanto, foi analisado inicialmente o perfil fenotípico das células presentes no ambiente apical do elemento dental – células da polpa, células do ligamento periodontal e células da papila apical, por citometria de fluxo. Em sequência, foi avaliado a migração e proliferação das células pulpares na presença da associação entre o peptídeo e o antibiótico. Para avaliação da produção de citocinas, diversas situações experimentais foram estabelecidas: condições clássicas de resposta a infecção (na presença de LPS) e de resposta imunoinflamatória (na presença de LPS com IFN- γ), assim como situações de resposta a infecção antígeno específica (na presença de HK-*E. faecalis* e HK-*S. aureus*). Nestas situações, a citotoxicidade e a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias das células pulpares foram analisadas. A citotoxicidade foi avaliada pelo método de MTT e a expressão de citocinas, por qPCR. O perfil fenotípico demonstrou marcação superior a 97% para os marcadores positivos para células-tronco mesenquimais (CTMs) e inferior à 1%, para o coquetel de marcadores negativos para células pulpares, as quais foram eleitas para serem utilizadas nos experimentos seguintes. As células pulpares apresentaram aumento na capacidade migratória e proliferativa nos grupos expostos ao peptídeo IDR-1002 e à combinação sinérgica após 24 e 48h. Após 24h, observou-se ausência de citotoxicidade em todas as situações propostas e na presença de todos os grupos experimentais. A avaliação das citocinas, após 24h, demonstrou que a presença da associação sinérgica levou a redução significativa da expressão dos genes TNFRSF-1, IL-1 β , IL-8 IL-6 e IL-10. Em suma, a associação sinérgica entre o peptídeo IDR-1002 e o ciprofloxacino apresentou potencial imunomodulatório favorável, surgindo como uma opção promissora para os processos de revascularização pulpar.

Palavras-chave: revascularização pulpar, células-tronco, DAP, IDR-1002.

ABSTRACT

The advance of biotechnology has brought significant changes in the field of tissue engineering and regenerative therapies. Thus, pulp revascularization has been gaining ground in endodontics in the treatment of immature permanent teeth. However, the use of diffused antibiotic pastes for revascularization technique and the unpredictability of the concentration of trapped stem cells in the blood clot may affect the process of tissue neoformation. Given this, new protocols have been studied to improve the technique. On the other hand, host defense peptides (PDHs) may have antimicrobial, immunomodulatory and regenerative activity, appearing as an option for pulp revascularization and may act alone or in combination with other biomolecules. Thus, the aim of this study is to evaluate the response of pulp cells in the presence of the synergistic association composed of a host defense peptide, the IDR-1002 and the ciprofloxacin antibiotic, one of the components of the double antibiotic paste (PAD), currently used in pulp revascularization protocols. For this purpose, the phenotypic profile of cells presents in the apical environment of the dental element - pulp cells, periodontal ligament cells and apical papilla cells was analyzed by flow cytometry. Following, pulp cell migration and proliferation were evaluated in the presence of the association between the peptide and the antibiotic. To evaluate cytokine production, several experimental situations were established: classical conditions of infection response (in the presence of LPS) and immunoinflammatory response (in the presence of LPS with IFN- γ), as well as situations of response to specific antigen infection (in the presence of HK-*E. faecalis* and HK-*S. aureus*). In these situations, the cytotoxicity and the production of inflammatory and anti-inflammatory pulp cell cytokines were analyzed. Cytotoxicity was evaluated by the MTT method and cytokine expression by qPCR. The phenotypic profile demonstrated labeling greater than 97% for mesenchymal stem cell positive markers (MSCs) and less than 1% for pulp negative markers cocktail, which were elected for use in the following experiments. Increased pulp cells migration and proliferation were observed in groups exposed to IDR-1002 peptide and to the synergistic combination after 24 and 48h. After 24h, no cytotoxicity was observed in all proposed situations and in the presence of all experimental groups. After 24h, the presence of synergistic association led to significant reduction of TNFRSF-1, IL-1 β , IL-8 IL-6 and IL-10 gene expression in pulp cells. In sum, the synergistic association between the IDR-1002 peptide and ciprofloxacin showed favorable immunomodulatory potential, emerging as a promising option for pulp revascularization processes.

Keywords: pulp revascularization, stem cells, DAP, IDR-1002.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Desenho esquemático ilustrativo de fontes de MSCs derivadas de tecidos dentais. SHEDs: células-tronco de dentes humanos decíduos esfoliados; PDLSCs: células-tronco do ligamento periodontal; DFPCs: células progenitoras foliculares dentárias, ABMSCs: células-tronco mesenquimais derivadas de ossos alveolares); SCAPs: células-tronco da papila apical dental humana; TGPCs: células progenitoras de germes dentários; e GMSCs: células-tronco mesenquimais gengivais. Imagem com modificações (CHALISSERRY, Elna Paul *et al.*2017).

Figura 2: Representação esquemática do procedimento das etapas clínicas da terapia para revascularização pulpar. Imagem com modificações (Diogenes *et al.* 2014).

Figura 3: Histogramas de parâmetros únicos demonstrando a expressão dos marcadores de CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D), CD106 (E) e coquetel de marcadores negativos para CTMs, em culturas de células pulpares, na 4ª passagem. Resultados de um experimento de imunofenotipagem para MSCs (controle isotipo: branco, CTMs pulpares: cinza).

Figura 4: Histogramas de parâmetros únicos demonstrando a expressão dos marcadores de CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D), CD106 (E) e coquetel de marcadores negativos para CTMs, em culturas de células do ligamento periodontal, na 4ª passagem. Resultados de um experimento de imunofenotipagem para MSCs (controle isotipo: branco, CTMs do ligamento periodontal: cinza).

Figura 5: Histogramas de parâmetros únicos demonstrando a expressão dos marcadores de CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D), CD106 (E) e coquetel de marcadores negativos para CTMs, em culturas de células da papila apical, na 4ª passagem. Resultados de um experimento de imunofenotipagem para MSCs (controle isotipo: branco, CTMs da papila apical: cinza).

Figura 6: Avaliação do percentual migratório de cultura de células pulpares primárias expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24 e 48h. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni. ** $p < 0,05$ *** $p < 0,0001$ **** $p < 0,0001$.

Figura 7: Imagens do ensaio de migração celular em cultura pulpar primária, através do método de *scratch*, após exposição ao CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de cada célula.

Figura 8: Avaliação do potencial proliferativo em cultura pulpar primária, através do método de azul de tripan, após exposição à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP nos tempos de 24h (B) e 48h (C). Apresentação geral dos grupos (A) em cores distintas sendo o grupo controle sem estímulo (azul), DAP (vermelho), CIP (verde), IDR-1002 (roxo) e IDR-1002 com CIP (laranja). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. ** $p < 0,05$ *** $p < 0,0001$ **** $p < 0,0001$.

Figura 9: Viabilidade de células pulpares em culturas primárias na 4ª passagem expostas à DAP, CIP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP em diferentes situações experimentais: apenas na presença destes estímulos (A); na presença destes estímulos e de LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B); na presença destes estímulos e de *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C); na presença destes estímulos e de *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (570 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. Não foram observadas diferenças estatísticas realizadas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni.

Figura 10: Expressão do gene TNFRSF-1 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP após 24h de incubação (A). A expressão de TNFRSF-1 foi analisada na presença dos estímulos: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,0001$.

Figura 11: Expressão do gene IL-8 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). A expressão de IL-8 foi analisada na presença dos estímulos: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,0001$ **** $p \leq 0,0001$.

Figura 12: Expressão do gene IL-6 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). A expressão de IL-6 foi analisada na presença dos estímulos: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) com rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,0001$.

Figura 13: Expressão do gene IL-1 β nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). A expressão de IL-1 β foi analisada na presença dos estímulos: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,0001$ **** $p \leq 0,0001$.

Figura 14: Expressão do gene IL-10 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). A expressão de IL-10 foi analisada na presença dos

estímulos: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. **** $p \leq 0,0001$.

Figura 15: : *Heatmap* indicando a variação do nível de expressão de mRNA de IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 e TNFSFR1 nos sistemas inflamatórios *in vitro* na presença dos estímulos agrupados: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em azul, LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em laranja, rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em roxo, *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) em cinza, *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em rosa, *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) em marrom e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em preto. Expressões genéticas com nível menor ou igual a -5 foram consideradas como ausência de acordo com a variação da escala de expressão de 5 (verde) à -10 (vermelho).

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC – *American type culture collection*

ABMSCs - células-tronco mesenquimais derivadas de ossos alveolares

BMP – proteína morfogenética óssea

Ca(OH)₂ – hidróxido de cálcio

CBM – concentração bactericida mínima

CIM – concentração inibitória mínima

CIP – ciprofloxacino

CTM - célula-tronco mesenquimal

DAP – pasta dupla antibiótica

DFPC - células progenitoras foliculares dentárias

DPI – dente permanente imaturo

DPSCs - células-tronco de dentes permanentes imaturos

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – dimetilsulfóxido

DSCs – células-tronco dentárias

EGF - fator de crescimento epidérmico

FGF – fator de crescimento de fibroblastos

GMSCs - células-tronco mesenquimais gengivais

hDPSCs - células-tronco da polpa humana

HK - *heat killed*

IFN-γ – interferon gama

IL – interleucina

LPS – lipopolissacarídeo

MALDI-ToF – *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*

MEC – matriz extra-celular

M-CSF – fator estimulador de colônias de macrófagos

MIP-2 – proteína inflamatória dos macrófagos

MTA – agregado de trióxido mineral

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NO – óxido nítrico

PBS – tampão fosfato salina
PDH – peptídeo de defesa do hospedeiro
PDLSC – células-tronco do ligamento periodontal
PCR – reação de polimerase em cadeia
PDLSCs - células-tronco derivadas do ligamento periodontal
RANKL - receptor do ligante nuclear kappa-B
REP - procedimentos endodônticos regenerativos
ROS – espécies reativas de oxigênio
SCAP – células-tronco da papila apical
SFB – soro bovino fetal
SHED – células-tronco de dentes decíduos
SCR – sistema de canais radiculares
TGPCs- células progenitoras de germes dentários
TGF- β – fator de Crescimento e transformação beta
TLR – receptor do tipo *tool like receptor*
VEGF – fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1.Desenvolvimento pulpar.....	16
1.2 Potencial regenerativo do tecido pulpar.....	18
1.3. Engenharia tecidual na Endodontia.....	20
1.4 Tratamento endodôntico em dentes permanentes imaturos: apicigênese,apicificação e revascularização pulpar.....	24
1.5. Medicações intracanaís utilizadas para revascularização pulpar.....	28
1.6 Peptídeos de defesa do hospedeiro.....	30
1.6.1. IDR-1002.....	34
1.7 Justificativa.....	35
2 OBJETIVOS	37
2.1 Objetivo geral	37
2.2. Objetivos específicos	37
3 MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1.Caracterização da amostra.....	38
3.1.1. Critério de inclusão.....	38
3.1.2. Critérios de exclusão.....	38
3.2 Obtenção do peptídeo e da pasta duplo antibiótica DAP.....	38
3.2.1. Cultivo primário das células pulpares, do ligamento periodontal e da papila apical.....	39
3.2.1.1 Cultivo primário de células pulpares	39
3.2.1.2 Cultivo primário de células do ligamento periodontal	39
3.2.1.3 Cultivo primário de células da papila apical	40
3.2.2. Caracterização fenotípica das células pulpares, do ligamento periodontal e da papila apical	41
3.2.3. Avaliação migratória de células pulpares.....	41
3.2.4.Avaliação da viabilidade celular e potencial proliferativo de células pulpares.....	42
3.2.5. Avaliação da capacidade citotóxica e imunomodulatória	42
3.2.5.1 Definição da concentração dos estímulos microbianos mortos pelo calor para análise da atividade citotóxica e imunomodulatória <i>in vitro</i>	43
3.2.6. Avaliação da citotoxicidade	4
3.2.7. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios por células pulpares.....	44
3.3.Análise estatística	47
4 RESULTADOS.....	48

4.1. Caracterização fenotípica das células pulpares, do ligamento periodontal e da papila apical.....	48
4.2. Avaliação da atividade migratória de culturas de células pulpares na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP.....	52
4.3. Avaliação do potencial proliferativo de culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP	5
2	
4.4. Avaliação da viabilidade celular em culturas de células pulpares humanas, na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP	5
7	
4.5. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios TNFRSF-1, IL-1β, IL-8, IL-6 e IL-10 em culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino	5
9	
4.5.1. Avaliação da expressão do fator de necrose tumoral (TNFRSF-1)	59
4.5.2. Avaliação da expressão de interleucina-8	61
4.5.3. Avaliação da expressão de interleucina-6	63
4.5.4. Avaliação da expressão de interleucina-1 β	65
4.5.5. Avaliação da expressão de interleucina-10	67
4.5.6. Avaliação global da expressão de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios.....	70
5 DISCUSSÃO.....	72
6 CONCLUSÃO.....	84
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXO 1: Parecer consubstanciado de aprovação do comitê de ética	111
ANEXO 2: Figuras suplementares.....	112

1 INTRODUÇÃO

1.1 Desenvolvimento pulpar

O ectomesênquima derivado da crista neural e o epitélio oral derivado do ectoderma faríngeo são as duas principais fontes de células do sistema estomatognático (1). Com base nesse contexto, a maioria dos tecidos moles que compõem as estruturas fisiológicas dos dentes, incluindo a polpa dentária, dentina, cimento, ligamento periodontal e o osso alveolar, bem como os esqueletos facial e mandibular são desenvolvidos (1). O desenvolvimento dentário tem origem a partir do ectomesênquima, que durante o desenvolvimento de diversas fases, originam os tecidos que compõem o órgão dentário como a polpa, o esmalte, a dentina e o cimento (2). Durante a fase de campânula, o epitélio interno ao se conectar ao epitélio externo dá origem à formação da porção radicular, enquanto as células mesenquimais indiferenciadas contribuem para a construção do arcabouço pulpar (3). Após a formação da dentina radicular, a bainha epitelial de Hertwig que envolve a raiz, desenvolve-se interrompida ou perfurada (4). O rompimento induz à formação de uma estrutura em forma de malha na bainha epitelial de Hertwig que permite com que as células foliculares dentárias entrem em contato com a superfície dentinária da raiz recém-formada (4,5). As células foliculares dentárias se diferenciam em cementoblastos e conseqüentemente, em cimento (6). Ao mesmo tempo, fibras de colágeno secretadas por células foliculares dentárias são incorporadas na nova matriz de cimento que se unem ao ligamento periodontal, durante o desenvolvimento dentário (7).

Os fibroblastos são as células mais numerosas na formação e no desenvolvimento dentário, fornecendo tanto suporte estrutural, quanto de defesa, sendo responsáveis por manter a matriz colagenosa e atrair células do sistema imune como macrófagos, tornando-as ativas para responder às possíveis invasões microbianas (8). Os fibroblastos desempenham papel crucial na identificação de antígenos, produção de citocinas e mediadores pró-inflamatórios (8). A polpa é

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 (9). O tecido pulpar é responsável por proporcionar diversas funções aos outros tecidos do complexo dentino-pulpar, tais como: resposta imunológica, funções sensoriais, nutrição, apresentando capacidade de formação e regeneração (10). Em adição, este pode ser composto por uma variedade de células, além de fibroblastos, tais como: odontoblastos, células vasculares, células mesenquimais indiferenciadas, células-tronco da papila apical, células inflamatórias, neurônios sensoriais e simpáticos (10, 11).

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) (12, 13). Além disso, outras células como os odontoblastos estão posicionados em uma camada única (14). Estas podem ser responsáveis pela síntese e mineralização da matriz extracelular (MEC) (15). Essas células pulpares estão em contato com a matriz extracelular, que se caracteriza como uma cadeia unida de macromoléculas segregadamente extracelular (16). O sistema imune pulpar consiste de células dendríticas, macrófagos, linfócitos e uma variedade de células mesenquimais, epiteliais e endoteliais, que precisam ser melhor estudadas no contexto endodôntico, com base nas particularidades anatômicas e imunofenotípicas, especialmente em estudos direcionados à engenharia tecidual (17).

A câmara pulpar é altamente vascularizada, possuindo capilares, vênulas e arteríolas (18). Os vasos chegam ao tecido pulpar por meio do forame apical e canais acessórios, podendo ter ramificações na camada odontoblástica e em áreas ricas em capilares, onde ocorrem as maiores trocas metabólicas (19). A inervação do tecido pulpar é oriunda do nervo trigeminal o qual atua juntamente com fibras eferentes simpáticas que regulam o fluxo sanguíneo (20). Tais fibras seguem o trajeto dos vasos sanguíneos, penetrando pelo forame apical e se distribuindo por toda a polpa (21). Dois importantes tipos de fibras mielínicas podem estar presentes neste tecido incluindo as do tipo A (delta e beta) e C (22, 23). 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 (24). Além disso, observamos outras células presentes no tecido pulpar como as células-tronco dentárias (DSCs), as quais 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 (25, 26).

1.2 Potencial regenerativo do tecido pulpar

A bioengenharia dental vem crescendo nas últimas décadas e se apresentando como uma área com grande potencial biotecnológico no âmbito da medicina regenerativa (27). Recentemente, estudos *in vitro*, evidenciaram expressões de marcadores biológicos para diferenciação de células mesenquimais em diferentes vias celulares, como osteoblastos, condrócitos, adipócitos, fatores de crescimento de fibroblasto e odontoblasto (27 28). Os estudos voltados para essa temática propõem que células com propriedades virtualmente idênticas e a mesma origem embrionária podem ser isoladas da polpa de dentes permanentes ou decíduos e são usualmente denominadas células-tronco da polpa dentária (27).

A relativa facilidade com que as células pulpares podem ser expandidas *in vitro* sugere o desenvolvimento de estudos que visam buscar novas estratégias biotecnológicas na endodontia (28). Experimentos *in vitro* utilizando culturas primárias de tecidos pulpares sugerem que tecidos semelhantes à polpa e a dentina radicular podem ser facilmente restabelecidos (26). Estudos *in vitro* para identificação e isolamento de células do complexo pulpar foram descritos por Gronthos et al. (2000) (28). Posteriormente, células mesenquimais do tipo MSC foram isoladas de tecidos dentais decíduos e dentes permanentes imaturos, caracterizadas como SHEDs (células derivadas de dentes decíduos), DPSCs (células de dentes permanentes imaturos) e SCAPs (células da papila apical). Além disso, células isoladas do ligamento periodontal de dentes imaturos foram identificadas e denominadas como PDLSCs (28). Para entender melhor esses tipos de células, os candidatos a biomarcadores de DPSCs, que incluem STRO-1, CD29,

DC44, CD73, CD90, CD106, CD166, CD166 e CD271, demonstram o potencial regenerativo de DPSCs e SCAPs (29). Ambos os tipos de células apresentam capacidade de migração, regeneração, organização e mineralização de células, mas as SCAPs apresentam uma taxa de proliferação mais alta em comparação com os DPSCs (30). Combinado com os conceitos estabelecidos pelos campos de engenharia de tecidos, o desenvolvimento de terapias endodônticas regenerativas oferece uma ampla gama de opções terapêuticas que ainda precisam ser exploradas (30).

Especula-se que o potencial cicatricial e regenerativo esteja relacionado à idade do paciente, uma vez que há interferência de fatores intrínsecos de carga genética (DNA) e fatores extrínsecos (microambientes sistêmicos e locais) (31). Nos estudos de Shimizu et al. relataram os primeiros achados histológicos de tecidos formados no canal radicular de humanos em dentes permanentes com o objetivo de se tornarem polpa vital (32). Eles observaram uma regeneração tecidual da polpa dentária, diagnosticada clinicamente como pulpíte irreversível (33). Shimizu et al. (2013) e Becerra et al. (2013) relacionaram achados histológicos em dentes humanos (33). Lovelace et al. (2011) demonstraram que no sangramento evocado nos procedimentos de revitalização há um acúmulo significativo de células-tronco indiferenciadas expressando CD105 e CD73 e STRO-1 no espaço do canal radicular (34). Eles assumiram que as células provavelmente se originaram de tecidos locais, como a papila apical adjacente ao ápice radicular e não da circulação sistêmica (34). A presença de odontoblastos pode ser observada em tecidos formados após o processo de revascularização. Essas células, altamente especializadas, expressam receptores semelhantes ao tipo *Toll* (TLR's), responsáveis pelo reconhecimento de produtos bacterianos (35).

A modulação da resposta expressa pelos TLRs induz a formação de dentina terciária e a proteção da polpa dentária contra danos teciduais (36). Estudos recentes demonstraram que a presença de células mesenquimais indiferenciadas induz células semelhantes a odontoblastos a regular mecanismos biológicos no processo de apicogênese e neoformação tecidual (37). Estes estudos tentaram recriar microambientes simples fornecendo fatores básicos de crescimento de fibroblastos (bFGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de origem extracelular-1a (SDF-1a)

e proteína morfogenética óssea-7 (BMP-7) para induzir o processo de neoformação tecidual (38). Embora a presença de odontoblastos e células ectomesenquimatosas humanas sejam achados histológicos fundamentais para as bases científicas do protocolo de revascularização, ainda não podemos inferir que esse tecido seja definido como tecido pulpar, uma vez que esse novo tecido pode não apresentar características neurogênicas ideais (39).

1.3 Engenharia tecidual na endodontia

A medicina regenerativa tem como foco realizar a substituição de células humanas, tecidos ou até mesmo órgãos, com a finalidade de estabelecer ou restaurar a função normal dos mesmos (40). Desta forma, a medicina regenerativa surge como uma oportunidade para todas as abordagens terapêuticas atualmente existentes, incluindo as terapias celulares (40). A engenharia de tecidos é o campo científico que busca a restauração funcional da fisiologia e da estrutura de tecidos comprometidos ou danificados por traumas ou patologias que podem gerar a perda funcional de células e órgãos (41). A engenharia tecidual apresenta como base terapêutica, três principais componentes: Arcabouços ou *scaffolds* de matriz extracelular, morfógenos e células-tronco (42). Tais componentes são utilizados em inúmeros estudos, tanto singularmente quanto em combinação, com o propósito de reparar estruturas lesionadas, sugerindo grande progresso na medicina regenerativa (43).

Nesse contexto, surge a endodontia regenerativa, a qual visa restaurar total ou parcialmente as funções pulpares em dentes necróticos e infectados, resultando no restabelecimento das funções pulpares, incluindo ativação da imunidade inata, a função de reparo através da mineralização, bem como a sensibilidade pulpar (44). Os procedimentos endodônticos regenerativos (REPs) são terapias propostas pela bioengenharia visando restaurar as funções fisiológicas da polpa dentária (45). Essas terapias abrangem uma tríade mencionada acima, que inclui fatores de crescimento, células-tronco e *scaffolds*, que precisam ser melhores estudados para o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento (45).

A capacidade regenerativa demonstrada por alguns tecidos orais depende fortemente de suas populações de células-tronco adultas adormecidas que são capazes de reparar pequenos defeitos e controlar a inflamação local (46). O tecido pulpar inflamado apresenta expressão aumentada de fatores mitogênicos, como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento derivado de plaquetas. Estes fatores apresentam potencial para estimular a neovascularização e a divisão celular e para aumentar a progressividade da inflamação, causando um aumento da permeabilidade vascular. Esses eventos podem contribuir para inflamação pulpar e infecção em seus estados clínicos como: hiperemia, pulpite reversível, pulpite irreversível, necrose pulpar e periodontite apical (47, 48, 49). Uma inflamação irreversível da polpa exige um tratamento endodôntico, que consiste na remoção total de tecido inflamado e contaminado, seguido de desinfecção e preenchimento do sistema de canais radiculares com material sintético. De fato, a terapia endodôntica não cura ou regenera o tecido pulpar e o dente passa a ficar privado de sensibilidade e vitalidade (49, 50,51).

Estudos de engenharia tecidual discutem o processo de revascularização através da oxigenação, fornecimento de nutrientes, células imunes e inervação para sustentar a atividade metabólica envolvida nesse processo. Uma nova vascularização pode ocorrer a partir da formação de um coágulo produzido após a remoção do tecido infectado e tratamento da infecção (47,48). Estudos que visam analisar o potencial regenerativo de células da papila apical e da polpa dentária humana demonstraram resultados influentes no campo da engenharia de tecidos (50,51). O potencial de diferenciação atribuído a essas células ainda é um pouco elucidado, mas avanços científicos trazem resultados extremamente importantes para o campo regenerativo (52). Essas células com alta capacidade de diferenciação podem induzir a regeneração do tecido através da diferenciação em células populares (53). Além disso, o tecido pulpar, que mimetiza as células da crista neural, apresenta potencial promissor em estudos de engenharia tecidual, especialmente no campo neuroregenerativo (53,54,55).

As células-tronco apresentam a capacidade de proliferar e produzir novas células capazes de se diferenciar em células especializadas, classificando-se em onipotentes, pluripotentes, totipotentes e multipotentes. Existem dois tipos de

células-tronco: células-tronco embrionárias e células-tronco adultas ou células pós-natais (56). Em vista disto, a polpa dentária é um tecido rico em células especializadas, que também são encontradas na papila apical e no ligamento periodontal, principalmente dentes decíduos e dentes permanentes com rizogênese incompleta (57). Essas células com alta capacidade de diferenciação podem induzir a regeneração do tecido pulpar por diferenciação celular, podendo gerar a formação de um novo tecido (56,57). As células-tronco podem ser isoladas de vários tecidos bucais como osso craniofacial, polpa dentária, folículo dental, germe dentário, papila apical, mucosa oral e tecidos periodontais (58). As células-tronco dentárias (DSCs) são populações de células-tronco pós-natais que apresentam qualidades semelhantes às células mesenquimais derivadas da crista neural craniana, incluindo a capacidade de auto-renovação e potencial de diferenciação multilinha (59). As células-tronco da polpa humana (hDPSCs) têm sido alvo de muitos estudos na medicina regenerativa devido ao seu grande potencial clínico, acessibilidade e colheita menos invasiva (60).

Com base nos achados científicos, oito populações únicas de células-tronco mesenquimal (CTMs) derivadas de tecidos dentais e do complexo maxilofacial foram isoladas e caracterizadas (148). As hDPSCs pós-natais foram as primeiras CTMs a serem identificadas no tecido pulpar (Figura 1), na sequência, outras populações de células-tronco de dentes humanos decíduos esfoliados (SHEDs) foram identificadas e caracterizadas, assim como células-tronco do ligamento periodontal (PDLSCs), células progenitoras foliculares dentárias (DFPCs), células-tronco mesenquimais derivadas de ossos alveolares (ABMSCs), células-tronco da papila apical dental humana (SCAPs), células progenitoras de germes dentários (TGPCs) e células-tronco mesenquimais gengivais (GMSCs) (148).

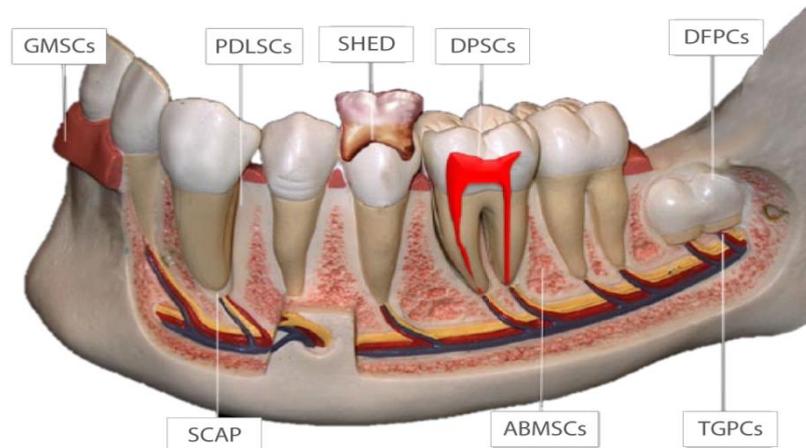


Figura 1: Desenho esquemático ilustrativo de fontes de MSCs derivadas de tecidos dentais. SHEDs: células-tronco de dentes humanos decíduos esfoliados; PDLSCs: células-tronco do ligamento periodontal; DFPCs: células progenitoras foliculares dentárias, ABMSCs: células-tronco mesenquimais derivadas de ossos alveolares); SCAPs: células-tronco da papila apical dental humana; TGPCs: células progenitoras de germes dentários; e GMSCs: células-tronco mesenquimais gengivais. Imagem com modificações (CHALISSERRY, Elna Paul et al.2017).

As DPSCs e SHEDs são MSCs são MSCs autorenováveis, residentes dos nichos perivasculares da polpa dentária (148). Acredita-se que sejam originadas a partir da crista neural craniana, a qual expressa marcadores precoces para CTMs e células-tronco neuroectodérmicas (148). Em estudos recentes, DPSCs e SHEDs demonstraram capacidade de regeneração tecidual e recuperação funcional após lesão medular (149), além de apresentarem capacidade de proteção contra lesão cerebral isquêmica em estudos *in vivo* com camundongos neonatais (150).

Na presença de estímulos específicos, esses DPSCs podem se diferenciar em vários tipos de células, incluindo neurônios, adipócitos e condrócitos (59). Além disso, evidências científicas demonstram que uma boa interação entre VEGF e DPSCs resulta em diferenciação celular interessante em odontoblastos e células endoteliais, respectivamente (60).

Após o desenvolvimento dentário, a diferenciação radicular e o alongamento promovem a erupção do dente na cavidade bucal para estabelecer os primeiros contatos oclusais, por volta dos 6 anos de idade. No entanto, mesmo após a erupção na cavidade bucal, a formação completa das raízes só ocorre após 3 a 4 anos, em que observamos o fechamento do ápice do dente, na sequência a erupção dos dentes permanentes inicia-se após esfoliação do dente decíduo, por volta de 6 anos de idade (61). Desta forma, por serem dentes ainda em formação, os cuidados com o órgão dental torna-se imperativo, uma vez que possuem paredes de dentina mais finas e câmaras pulpares mais largas (61). A revascularização pulpar pode ser uma alternativa clínica para o tratamento de dentes permanentes imaturos (DPIs) com necrose pulpar, através da formação de um coágulo apical induzido, seguido do reparo tecidual ou neoformação tecidual, após diferenciação celular (62).

1.4 Tratamento endodôntico em dentes permanentes imaturos: apicigênese, apicificação e revascularização pulpar

Os DPIs apresentam-se em fase final de formação radicular, possuindo paredes radiculares finas, câmaras pulpares mais amplas e ápices abertos, necessitando de fatores de crescimento do tecido pulpar para o término de sua completa formação radicular (63). Neste sentido, após episódios patológicos que acometem o órgão dental nesta condição, almeja-se a aplicação de tratamentos endodônticos conservadores, por manter pelo menos parte do tecido pulpar viável para o fim desta formação radicular (63). No entanto, quando o tratamento endodôntico radical se torna necessário, cuidados durante os processos de instrumentação e irrigação do SCR, além da execução do processo de obturação através do seu preenchimento com um material inerte devem ser tomados (64). Em vista disto o processo de obturação ainda apresenta adversidades na endodontia (65,66). Desde a década de 1960, diversas técnicas clínicas para o tratamento de DPIs foram discutidas, com a finalidade de estabelecer protocolos, que preservassem a estrutura dentária e ao mesmo tempo, contribuíssem para o desenvolvimento do ápice dentário (67). Assim, as primeiras condutas clínicas para o tratamento de DPIs foram a apicigênese e a apicificação (68).

A apicigênese consiste em uma abordagem conservadora para a indução da continuação da formação radicular pela manutenção do tecido pulpar sadio em DPIs (69). Este tipo de abordagem endodôntica pode ser considerada uma terapia complementar para indução do desenvolvimento radicular, nos casos em que apresentam polpa vital ou que sofreram exposição pulpar devido a traumas ou fraturas coronárias, assim como à cáries dentárias e restaurações inadequadas (70). 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) (71).

A técnica tradicional para que a apicigênese possa acontecer, inclui a utilização do potencial terapêutico do hidróxido de cálcio $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ para indução do processo de capeamento pulpar. Esta ação é possível devido ao alto potencial antimicrobiano e de indução da formação do tecido mineralizado (69). A apicigênese foi defendida por Tomeck e Smith, que demonstraram histologicamente, em dentes com ápice aberto de macacos, em que o processo de desenvolvimento radicular ocorreria após realização de pulpotomias e pulpectomias, sem o uso de substâncias químicas, medicações ou preenchimento radicular (72). 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 (72). 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 apical (69).

Por outro lado, o processo de apicificação fundamenta-se em uma abordagem conservadora para indução da formação de uma barreira calcificada no ápice radicular (73), cujo objetivo é promover a diminuição do diâmetro apical dos DPIs, a fim de facilitar uma futura obturação endodôntica com um material inerte (74). Embora a apicificação seja um processo natural, é necessário o estímulo do processo por um ativador biológico (75). Diversos estudos observaram o fechamento do ápice radiograficamente, quando uma pasta de hidróxido de cálcio foi introduzida em canais de DPIs (76). Steiner e Van Hassel (76) 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 (76). Desta forma, uma série de estudos envolvendo a terapia com a utilização do hidróxido de cálcio foram realizados, tornando-se a terapia padrão, por muitos anos (77).

Por outro lado, estudos evidenciam que o uso do Ca(OH)_2 pode gerar fraturas a longo prazo, na região cervical da raiz (100). 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 (101). Esse material conhecido como agregado de trióxido mineral (MTA) apresenta-se como um biomaterial composto por silicato tricálcio, óxido tricálcio, óxido de silicato e aluminato de tricálcio (102). O MTA pode ser colocado em contato direto com tecidos humanos e pode apresentar diversas ações, tais como: proliferação celular através da ação dos íons de óxido de cálcio (103), criação de um ambiente antibacteriano pela sua ação alcalina (104), modulação da produção de citocinas (105) e a balança Th1 e Th2 do sistema imune (106), estimulação da diferenciação e migração de tecidos duros (107), além de atuar no selamento biológico (108).

Os estudos revelam resultados satisfatórios com respostas clínicas positivas, radiográficas e histológicas obtidas com hidróxido de cálcio e o MTA, evidenciando a dissociação dos íons Ca^{2+} e OH^- , atuando no controle da reação inflamatória (por ação higroscópica, formação de pontes de proteinato de cálcio e inibição da fosfolipase); neutralização de ácidos produzidos por odontoblastos (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 (69,78,79).

A revascularização pulpar pode ser uma alternativa clínica para o tratamento de DPLs, com necrose pulpar, através da formação de um coágulo apical induzido (80). Os primeiros achados clínicos da técnica de revascularização pulpar foram descritos principalmente para os casos de avulsão dentária (80). A terapia endodôntica voltada para indução da revascularização pulpar foi utilizada pela primeira vez na década de 1950, em um caso de pulpotomia utilizando o hidróxido de cálcio, relatado na literatura, o qual observou a formação de um tecido cicatricial

após a aplicação da medicação (80). Entretanto, Nygaard-Ostby B. foi quem observou a importância da manutenção do coágulo sanguíneo como fator essencial para o sucesso da técnica de revascularização pulpar (80,81).

Os achados histológicos demonstraram um reestabelecimento do suprimento vascular apical, em dentes avulsionados após o replante e avaliação durante 120 dias (82). 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, sendo a sanificação dos canais acometidos, um princípio fundamental para o estabelecimento da técnica (81).

A revascularização pulpar consiste na invaginação do tecido apical, após a indução de um sangramento apical. Após este período, há a formação de um tecido conjuntivo fibroso no sistema de canais radiculares. Embora existam diferentes particularidades das técnicas empregadas em terapias de revascularização pulpar, Diógenes sugeriu o protocolo mais aceito atualmente (80). Neste protocolo, o primeiro passo consiste no acesso do canal radicular e irrigação com hipoclorito de sódio e solução salina seguido de secagem e aplicação de medicação intracanal, responsável por eliminar o maior número de microrganismos que possam dificultar a formação do novo tecido (80). Após 2-4 semanas, com a ausência de sintomatologia, uma nova irrigação com hipoclorito de sódio e solução salina pode ser realizada, e assim uma sobreinstrumentação para promover a formação de um coágulo apical (83). Logo após, recomenda-se o uso do MTA para vedamento biológico no terço cervical radicular e em seguida, uma restauração definitiva. O tratamento deve ser acompanhado durante diversos meses e até anos, o acompanhamento deve incluir exames clínicos, incluindo testes de vitalidade, percussão e palpação periapical, além de análises por tomografia computadorizada da contínua formação radicular (83). Com base nestes dois diferentes protocolos de revascularização pulpar, diversos estudiosos buscam novas alternativas para adaptação das técnicas e unificação de um protocolo terapêutico.

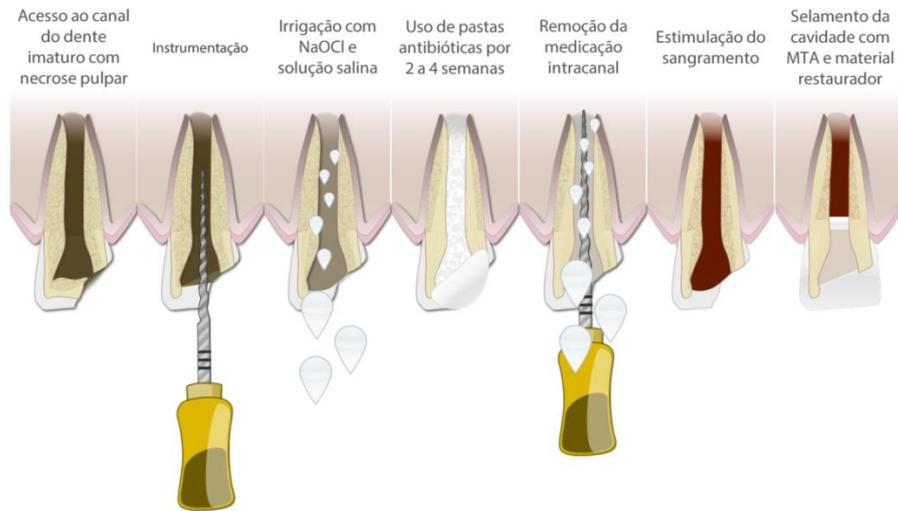


Figura 2: Representação esquemática do procedimento das etapas clínicas da terapia para revascularização pulpar. Imagem com modificações (Diogenes et al. 2014).

1.5 Medicções intracanaís utilizadas para revascularização pulpar

Os processos de regeneração e/ou revascularização pulpar são extremamente complexos, uma vez que terapias endodônticas regenerativas buscam reestabelecer ou reconstituir tecidos biológicos danificados, incluindo estruturas dentinárias, radiculares e do complexo dentino-pulpar (84). Em vista disto, a manutenção da cadeia asséptica do sistema de canais radiculares é essencial para o sucesso da terapia proposta (84). No entanto, a manutenção da cadeia asséptica pode ser um desafio, visto que cerca de 600 espécies bacterianas podem estar associadas a infecções pulpares (85). Além disso, a presença de paredes delgadas de dentina radicular, inviabilizam a realização de uma eficiente instrumentação, deixando a descontaminação a cargo dos agentes antimicrobianos (85). Dessa forma, se torna de suma importância o uso de medicações eficientes que reduzam o maior número de microrganismos no sistema de canais radiculares e estimulem a neoformação tecidual (86).

Apesar da problemática relacionada ao fato da presença dos microrganismos que dificultam os processos de revascularização e regeneração

pulpar, poucas medicações intracanaís foram estudadas para esta técnica (86). Atualmente, a pasta triplo antibiótica (TAP) é a mais utilizada como proposta medicamentosa na terapia de revascularização pulpar, uma vez que apresenta amplo espectro e atividade antimicrobiana que favorecem o bom prognóstico do paciente (87,88). A proposta da TAP foi introduzida especialmente para a execução do protocolo em dentes com rizogênese incompleta e polpa necrótica, largamente desenvolvido por Hoshino e colegas, publicado em 1996 (89). Neste trabalho, os autores investigaram a eficácia terapêutica da pasta na remoção dos canais radiculares. Posteriormente, uma série de estudos *in vitro* foram desenvolvidos utilizando TAP contra microrganismos presentes na dentina cariada e na polpa infectada (90). Os estudos revelaram resultados extremamente satisfatórios quanto a erradicação das bactérias no sistema de canais radiculares com uso da TAP (88).

A pasta tripla antibiótica é uma combinação de ciprofloxacino, metronidazol e minociclina manipuladas em proporções iguais (1:1:1), segundo o protocolo de revascularização pulpar (91). Dentre os componentes da TAP, o metronidazol é um composto antimicrobiano tóxico para microrganismos anaeróbios juntamente com o ciprofloxacino, uma fluoroquinolona sintética, a qual possui ação bactericida intensa e exibe alta atividade contra bactérias gram-negativas, enquanto possui atividade limitada contra bactérias gram-positivas, por isso essa associação se faz, frequentemente, necessária para compensar seu escopo limitado (88). Além disso, a minociclina é bacteriostática, possui atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas, auxiliando no aumento da produção de interleucina-10, uma citocina inflamatória importante no processo de reparo e neoformação óssea (88).

Apesar do potencial antimicrobiano consolidado da TAP, a principal crítica relacionada a essa proposta está direcionada ao manchamento da dentina, associado à presença da minociclina (92, 93). Em vista disto, muitos estudos têm sugerido o uso da pasta dupla antibiótica (DAP), contendo metronidazol e ciprofloxacino, ou a incorporação da ampicilina para uma nova formulação da TAP. 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* (94,95,96). Estes estudos, verificaram que concentrações maiores de 1000 mg.mL⁻¹ testadas, foram responsáveis por diminuir igualmente o biofilme desta bactéria (97).

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 $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (97).

Estudos comparativos envolvendo as pastas DAP e TAP revelaram que ambas as propostas terapêuticas possuem potencial antimicrobiano eficaz em diluições de até 1 em 32.000 ($0,001\text{-}0,003 \text{ mg.mL}^{-1}$) (98). Além disso, estas podem ser utilizadas como irrigantes antibacterianos eficientes durante a realização do protocolo de revascularização (98,99). Os resultados de análises *in vitro* testando a eficácia das pastas contra biofilmes de *E. faecalis* e *P. gingivalis* revelaram que não há diferença estatística entre os achados comparativos de DAP e TAP, porém quando comparados ao Ca(OH)_2 , observa-se que este último apresentou maior inibição que as pastas antibióticas (99). Entretanto, o uso do Ca(OH)_2 no protocolo de revascularização pulpar torna-se inviável, devido à alta citotoxicidade no contato direto com células pulpares (98). Coletivamente, estudos demonstraram que tanto a TAP quanto a DAP são eficazes contra bactérias endodônticas em altas diluições, o que indica que baixas concentrações de antibióticos podem ser suficientes para obter efeito antibacteriano necessário (99). Assim, pode ser benéfico recomendar o uso de concentrações mais baixas de pastas antibióticas para evitar a efeito desses medicamentos nas células estaminais hospedeiras (99).

Diante dos estudos apresentados revelando o potencial e eficácia contra diferentes microrganismos, as pastas antibióticas possuem propriedades que infundem interesse na endodontia (88). Atualmente, todos os materiais antimicrobianos disponíveis para irrigação, desinfecção e medicação apresentam seus próprios benefícios e limitações; a busca pela criação de propostas terapêuticas ainda melhores e mais eficazes continuam (88).

1.6 Peptídeos de defesa do hospedeiro

Peptídeos antimicrobianos ou peptídeos de defesa do hospedeiro são biomoléculas capazes de participar da defesa imune inata de diversos organismos (114). Diversos estudos estão sendo propostos para o uso de peptídeos no auxílio em terapias já existentes, como adjuvantes, ou substitutos de classes de anti-inflamatórios ou antibióticos contra diversos tipos de infecções (115,116). Desta

forma, achados científicos sugerem o uso dos peptídeos como opções terapêuticas mais eficazes ou até mesmo, com menor custo, quando comparadas às diversas terapias já existentes. Atualmente, há uma série de peptídeos com ação antimicrobiana, com estrutura e modo de ação amplamente descritos, porém observa-se que há um grande desafio no desenvolvimento de novos peptídeos, que além de antimicrobianos, apresentem outras características, como, a ação imunomodulatória. Estes peptídeos são denominados de peptídeos promíscuos, visto que vários alvos estão associados a uma única estrutura de peptídeo, os quais são comumente conhecidos como peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) (117).

Os PDHs além de participarem ativamente na imunidade inata, também modulam a resposta do sistema imune para promover a depuração de agentes patogênicos, diminuindo efeitos deletérios do processo inflamatório (118). Este fato ocorre devido ao potencial de imunorregulação destes peptídeos, capazes de influenciar no processo transitório de respostas imunológicas, promovendo cicatrização de feridas (118). Os PDHs são, em maioria, curtos (contendo menos de 50 resíduos de aminoácidos na sua estrutura molecular), anfipáticos, catiônicos, com carga líquida média e conteúdo hidrofóbico médio de 42% (119,120). Os peptídeos são classificados em naturais ou sintéticos. A maioria dos peptídeos naturais têm uma meia vida curta, devido à rápida degradação causada por cerca de 600 proteases diferentes no corpo humano (121). Em vista disto, várias estratégias têm sido utilizadas para produzir análogos mais estabilizados, cujo objetivo é preservar as atividades biológicas das moléculas originais. Desta forma, peptídeos sintéticos estão se tornando mais populares em estudos científicos (122,123).

Os peptídeos podem possuir expressão pleiotrópica, podendo ser capazes de induzir, direta ou indiretamente, a produção de citocinas a partir do recrutamento de leucócitos, reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias produzidas em resposta a antígenos, recrutar células de defesa para o sítio da provável infecção, modular a expressão de quimiocinas, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico (NO), além de estimular a angiogênese e contribuir para o processo de cicatrização de feridas, podendo ativar e promover a diferenciação celular nestes sítios acometidos (124,125,126). Hancock *et al.* (127), relatam que as funções do PDHs vão muito além de proteger o hospedeiro contra microrganismos invasores, uma vez que

apresentam papéis essenciais nos eventos de sinalização durante a ativação de respostas imunes. O potencial biotecnológico dos PDHs tem sido estudado como forma de modular resposta a infecções, patologias e regeneração de tecidos, além de possuir um amplo espectro contra microrganismos (128). Com base nos achados científicos, estas biomoléculas vêm sendo adotadas como novas possibilidades farmacológicas em muitas áreas de saúde, inclusive na Odontologia (129). Neste sentido, um crescente aumento no número de estudos direcionados para o uso dos PDHs na Odontologia, vem acontecendo desde 2003 (130). Percebe-se que tais estudos estão concentrados principalmente no processo da cárie dentária e doença periodontal (130).

Uma série de PDHs naturais foram avaliados no controle de bactérias cariogênicas, entre elas α -defensina, β -defensina, catelicidina LL-37, histatina 5, lactoferrina humana, nisina e pleurocidina (131). As β -defensinas são expressas no epitélio gengival e glândulas e ductos salivares, enquanto α -defensinas podem ser avaliadas em neutrófilos e no fluido crevicular, assim como a LL-37 pode ser observada no epitélio, nas glândulas submandibulares e na saliva em situações inflamatórias (114). A nisina, um polipeptídeo com 34 resíduos de aminoácidos, demonstrou atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas orais, como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus acidophilus* e *Enterococcus faecalis* (131). Porém, estudos demonstram que a maioria dos PDHs naturais apresentam várias desvantagens para uso clínico, principalmente pelo tamanho molecular extenso, que encarecem os produtos e dificultam o processo de preparo, além de apresentarem alta citotoxicidade e propriedades farmacêuticas e farmacocinéticas deficientes (132). Diante desta problemática, vários grupos de pesquisa estudam análogos sintéticos ou fragmentos de PDHs naturais, como forma de melhorar as capacidades antibacterianas e até mesmo propriedades imunomoduladoras, de uma forma eficiente e com menor custo-benefício (133).

Levando em consideração a progressão da patogênese pulpar, estudos com a intenção de melhorar as opções de tratamento e auxiliar na desinfecção do canal radicular vêm sendo desenvolvidos com o uso de peptídeos. O canal radicular necrótico representa um nicho ecológico rigoroso para o crescimento microbiano, devido à diminuição de oxigênio e à disponibilidade de tecidos hospedeiros e fluidos teciduais como fonte primária de nutrientes (134). Diferentes espécies bacterianas pertencentes aos gêneros *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Fusobacterium*, *Treponema*,

Campylobacter, *Enterococcus* e *Tannerella* são possivelmente encontradas na infecção endodôntica primária (135, 136). Desta forma, Lima *et al.* (135), avaliaram a atividade antimicrobiana, citotóxica e imunomoduladora dos PDHs, clavanina A, clavanina A modificada (MO) e LL-37. Este trabalho demonstrou que a LL-37 revelou melhor potencial antibacteriano, contra *E. faecalis*. Winfred *et al.* (137) demonstraram a capacidade dos peptídeos sintéticos VSL2 e VS2 em atuar contra bactérias disponíveis no canal radicular, como *E. faecalis* e *C. albicans*. Outro estudo realizado por Wang *et al.* (138) demonstraram a capacidade antibiofilme do peptídeo sintético DJK-5 em biofilme de *E. faecalis*, em apenas 3 min. Além do campo da endodontia, observa-se investigações utilizando PDHs na tentativa do controle da doença periodontal. Um estudo apresentado por Dantas *et al.* (139) demonstra atividade antimicrobiana do peptídeo Synoeca-MP, em biofilmes envolvendo *Pseudomonas aeruginosa*, bactéria detectada em biofilme subgingival de pacientes imunodeprimidos com doença periodontal (140). Neste estudo *in vitro*, foi possível observar a atividade antibacteriana da Synoeca-MP em ação sozinha, porém melhores resultados foram avaliados quando combinado Synoeca-MP com clorexidina (CHX), os quais demonstraram efeito sinérgico antimicrobiano, além de atividade imunomoduladora, com regulação positiva de MPC-1 e fator de necrose tumoral (TNF)- α , além de regulação negativa de NO e IL-10 (140).

Desta forma, os PDHs se tornam agentes promissores em estratégias antibiofilmes e imunomoduladoras, fatores de suma importância nas diversas áreas da odontologia. Dentre os vários peptídeos, o IDR-1002 têm demonstrado potencial biotecnológico nos estudos voltados para área de engenharia tecidual na endodontia.

1.6.1. IDR-1002

As variantes sintéticas dos PDHs são conhecidas como peptídeos de regulação de defesa inata (IDR). Foi demonstrado que os IDRs, IDR-1 e IDR-1002 possuem grande potencial terapêutico em infecções, modulando respostas imunes inatas do hospedeiro e regulando positivamente os mecanismos antiinflamatórios (141). O IDR 1002 (VQRWLIVWRIRKNH₂) foi caracterizado como um pequeno peptídeo sintético composto por 12 resíduos de aminoácidos o qual apresentou tanto ação antimicrobiana, quanto imunomoduladora (142). A ação do IDR-1002 está principalmente relacionada com a ativação do sistema imune diante de processos infecciosos (143).

Nos primeiros estudos envolvendo este peptídeo, observou-se que ele estimulou a produção de CXCL1, CXCL8 e CCL2 em leucócitos murinos e conferiu proteção contra infecções por *Echerichia coli* (142); além de apresentar ação antimicrobiana contra *S. aureus* e *P. aeruginosa* (144). Além disso, observou-se correlação de o IDR-1002 com o recrutamento de neutrófilos e aumento da degranulação de neutrófilos, associada à via de sinalização MAPk (145), 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 (145). Além disso, este peptídeo está relacionado com a quimiotaxia de monócitos, uma vez que aumenta a quimioatração celular diante das citocinas CCL3 e CCL5 (146). O potencial receptor para o IDR-1002 em macrófagos e monócitos pode ser o CCR5 (146). Em outro estudo foi determinado que o IDR-1002, aumenta a migração das monocitocinas através da rede de afibronectina através da promoção da adesão mediada por b1-integrina (147). As observações deste estudo também implicaram no mecanismo específico da quimiocina, independente da adesão, utilizado pelo IDR-1002 para promover o recrutamento de monócitos.

Desta forma, foi levantada a hipótese do IDR-1002 poder regular a resposta de monócitos às quimiocinas e, dessa maneira, promover a mobilização de citocinas envolvidas no processo de reparo. Neste estudo, verificou-se que o IDR-

1002 aprimora a os processos de quimiotaxia de células humanas em relação ao CCL3 e CCL5, mas não ao CCL2 ou CCL7 (147). As descobertas revelam um novo mecanismo através do qual o peptídeo IDR-1002 melhora o recrutamento de monócitos e, assim, melhora a proteção do hospedeiro contra infecções bacterianas (147). Apesar deste peptídeo apresentar atividade antimicrobiana contra *S. aureus*, prevalente em patologias pulpares, poucos estudos foram desenvolvidos envolvendo outros microrganismos prevalentes nas patologias pulpares.

De acordo com os achados científicos publicados por SOUSA *et al.* (2017) .., o mecanismo de ação do IDR-1002 especificamente ainda não está totalmente claro, porém, assim como outros peptídeos sintéticos, como: IDR-1018 e DJK-6, este peptídeo pode atuar na desestruturação e comunicação celular durante os processos de formação e manutenção do biofilme (151). Neste estudo, *in vitro*, o IDR-1002 apresentou os melhores resultados antimicrobianos em comparação com outros peptídeos sintéticos, além de atuar em sinergismo com o antimicrobiano ciprofloxacino, em ensaios contra *E. faecalis* e *S. aureus*. Neste mesmo estudo foi constatado que a concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de IDR-1002 não alterou significativamente a viabilidade de macrófagos humanos *in vitro*, após 24 h de incubação, propondo então uma associação sinérgica de IDR-1002 (32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com o ciprofloxacino (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) uma vez que os resultados não foram capazes de reduzir a viabilidade celular em macrófagos RAW 264.7 (152). Em adição, quando a associação sinérgica foi colocada em culturas de fibroblastos L929, ela promoveu atividade imunomodulatória em situações de stress oxidativo *in vitro*, além de não alterar significativamente a viabilidade celular (152). Desta forma, esta associação sinérgica apresenta interessante potencial biotecnológico na Odontologia, visto que apresentou resultados interessantes em relação à capacidade antimicrobiana e imunomodulatória de IDR-1002, sobretudo, no campo da engenharia tecidual, envolvendo futuras construções de arcabouços com liberação controlada desta associação para terapias endodônticas em DPIs.

A literatura demonstra que a presença do peptídeo IDR-1002 em associação com o ciprofloxacino parece favorecer a entrada do antibiótico, facilitando assim, sua atuação antimicrobiana (151). Desta forma, uma maior exploração desta associação sinérgica em células pulpares, se faz necessária, uma vez que esta pode fornecer o

desenvolvimento de novas técnicas que possibilitem melhorias nas terapias endodônticas, sobretudo nos processos de revascularização pulpar.

1.7 Justificativa

O avanço das pesquisas em biologia molecular tem proporcionado significantes mudanças no âmbito da engenharia tecidual. Na odontologia, a engenharia de tecidos vem crescendo e se tornando protagonista de diversas linhas de pesquisa, sobretudo na endodontia regenerativa, a qual tem por objetivo realizar o restabelecimento da função normal da polpa em dentes necróticos e infectados resultando no restabelecimento das funções protetoras da polpa, incluindo a imunidade inata e funções de reparo. Diante disto, são necessários o estudo de mecanismos que possam a melhorar a interação entre células-tronco e fatores que proporcionem o desenvolvimento de respostas imunomodulatórias favoráveis a formação de um novo tecido. Nesse sentido, os peptídeos de defesa do hospedeiro se apresentam como novas estratégias biotecnológicas como forma de modular a resposta à infecções, patologias e regegeneração tecidual, além de possuir um amplo espectro contra microorganismos. Em vista disto, o presente trabalho avaliou as atividades citotóxicas, migratórias e imunomodulatórias de células pulpares humanas, na presença da associação sinérgica composta pelo peptídeo IDR1002 e o antibiótico ciprofloxacino, em comparação com a pasta duplo antibiótica (DAP), *in vitro*, buscando avaliar o potencial desta associação para aplicações biotecnológicas no contexto de revascularização/regeneração pulpar.

2 Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Avaliação das atividades migratórias e imunomodulatórias de células pulpares frente a associação sinérgica composta por IDR1002 e ciprofloxacino, em culturas de células pulpares.

2.2. Objetivos Específicos

- Isolamento, cultura e expansão de culturas primárias de células pulpares, do ligamento periodontal e papila apical humanas.
- Caracterizar células pulpares do ligamento periodontal e papila apical humanas por meio de marcadores de células-tronco mesenquimais (CD44, CD73, CD90 e CD105).
- Avaliar a viabilidade celular de culturas de células pulpares humanas, na presença da associação sinérgica (IDR1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP.
- Avaliar a atividade migratória de culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP.
- Avaliar o potencial proliferativo de culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP.
- Avaliar a produção dos mediadores inflamatórios fator de necrose tumoral (TNFRSF-1), IL-1 β , IL-8 e IL-6 em culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR1002 e ciprofloxacino) .
- Avaliar a produção do mediador antiinflamatório IL-10 em culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR1002 e ciprofloxacino).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

As amostras foram coletadas de pacientes que tenham sido encaminhados para extração de terceiros molares na clínica integrada do curso de graduação da Universidade Católica de Brasília (UCB). Um total de 60 pacientes foram convidados a participar da pesquisa, colaborando com a doação do elemento dentário. Cada paciente preencheu anamnese e foi registrado em seu prontuário todos alertas sistêmicos. Este projeto foi autorizado pelo comitê de ética em pesquisa humana da UCB (CAAE: 94676218.5.0000.0029 – Anexo 1) e os pacientes assinaram o termo de consentimento livre esclarecido. Todos os preceitos éticos foram obedecidos.

3.1.1. Critério de inclusão

Foram incluídos no projeto, pacientes de ambos sexos, encaminhados para exodontia de terceiros molares hígidos com ápice aberto ou fechado, inclusos ou semi-inclusos doados de pacientes com idade superior a 18 anos.

3.1.2. Critérios de exclusão

Pacientes com idade inferior a 18 anos, com terceiros molares afetados com lesões cariosas ou doença periodontal. Casos em que não houve assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

3.2. Obtenções do peptídeo e da pasta duplo antibiótica

O peptídeo IDR1002 utilizado na pesquisa foi sintetizado pela técnica FMoc, purificados (>95%), liofilizados e armazenado pela *Peptide 2.0* (EUA). Para confirmar a massa molecular e a pureza deste peptídeo foi utilizada espectrometria

de massa *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight* (MALDI-ToF) (Anexo 2). A pasta duplo antibiótica foi obtida após manipulação farmacêutica na proporção $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de cada antibiótico, associadas ao veículo propilenoglicol. A manipulação da pasta foi baseada no protocolo de Hoshino *et al.* (1996), com adaptações. A concentração de cada composto (ciprofloxacino e IDR1002) na associação foi determinada com base em trabalho prévio do grupo de pesquisa, que descreveu esta associação (153).

3.2.1. Cultivo primário das células pulpares, do ligamento periodontal e da papila apical

3.2.1.1 Cultivo primário de células pulpares

As polpas dentárias foram obtidas a partir de terceiros molares íntegros extraídos de pacientes adultos entre 18 a 30 anos. O tecido pulpar obtido foi imerso em uma solução contendo DMEM (*Modified Eagle's Medium*, Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA)) com soro fetal bovino, e fixado em placa de cultura celular (154). Em seguida, o produto pulpar foi cultivado em placas de 6 poços com área de base de $9,6\text{cm}^2$ (Costar Corp., Cambridge, MA, EUA), em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), 100IU.mL^{-1} de penicilina (Invitrogen, Grand Island, NY), $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Invitrogen) e 2mmol.L^{-1} de glutamina (GIBCO, Grand Island, NY, EUA), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 , na temperatura de 37°C . Essas células foram subcultivadas a cada três dias para obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento (156).

3.2.1.2 Cultivo primário de células do ligamento periodontal

Os ligamentos periodontais foram obtidos a partir de terceiros molares íntegros extraídos de pacientes adultos entre 18 a 30 anos. Após exodontia dos

dentes, foi realizado raspagem radicular, com auxílio de curetas periodontais, na sequência foram coletadas as estruturas teciduais do ligamento periodontal (155). O tecido do ligamento periodontal obtido foi imerso em uma solução contendo DMEM (*Modified Eagle's Medium*, Sigma Chemical) com soro fetal bovino, e fixado em placa de cultura celular (153). Em seguida, o produto do ligamento periodontal foi cultivado em placas de 6 poços com área de base de $9,6\text{cm}^2$ (Costar Corp), em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 100 IU.mL^{-1} de penicilina (Invitrogen), $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Invitrogen) e 2 mmol.L^{-1} de glutamina (GIBCO), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 , na temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$. Essas células foram subcultivadas a cada três dias para obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento (155).

3.2.1.3 Cultivo primário de células da papila apical

As papilas apicais foram obtidas a partir de terceiros molares íntegros em processo de rizogênese incompleta, com ápices abertos, extraídos de pacientes adultos entre 18 a 20 anos. Após exodontia dos dentes, foi realizado corte da região apical, com auxílio de lâmina de bisturi, do tecido em desenvolvimento localizado na região de papila apical dos dentes com rizogênese incompleta, na sequência foram coletadas as estruturas teciduais da papila apical (155). O tecido da papila apical obtido foi imerso em uma solução contendo DMEM (*Modified Eagle's Medium*, Sigma Chemical) com soro fetal bovino, e fixado em placa de cultura celular. Em seguida, o produto da papila apical foi cultivado em placas de 6 poços com área de base de $9,6\text{cm}^2$ (Costar Corp), em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro fetal bovino (Cultilab), 100 IU.mL^{-1} de penicilina (Invitrogen), $100\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Invitrogen) e 2 mmol.L^{-1} de glutamina (GIBCO), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 , na temperatura de $37\text{ }^\circ\text{C}$. Essas células foram subcultivadas a cada três dias para obtenção do número de células suficiente para a realização do experimento (155).

3.2.2. Caracterização fenotípica das células pulpares, do ligamento periodontal e da papila apical

As células utilizadas nesse estudo foram caracterizadas imunofenotipicamente por citometria de fluxo, através da utilização do *Kit Human MSC Analysis* (BD Biosciences, São Paulo, Brasil), conforme as orientações do fabricante, para cumprimento dos critérios de caracterização estabelecidos pela Sociedade Internacional de Terapia Celular (156).

O perfil fenotípico dessas células foi realizado através da análise de marcadores de células mesenquimais. Para isso, utilizou-se 1×10^8 de células pulpares para compor a amostra para caracterização. As culturas primárias foram expandidas até a terceira passagem em meio de cultura DMEM contendo 10% de soro bovino fetal (Cultilab), 100 IU.mL^{-1} de penicilina (Invitrogen), $100 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ de estreptomicina (Invitrogen) e 2 mmol.L^{-1} de glutamina (GIBCO), em uma atmosfera umedecida contendo 5% de CO_2 , na temperatura de $37 \text{ }^\circ\text{C}$. Após atingirem 100% de confluência, findado esse período, as células foram tripsinizadas e marcadas para imunofenotipagem com marcadores positivos (CD44, CD73, CD90, CD105 e CD106) e negativos (CD45, CD34, CD11b, CD19 e HLA-DR-PE) (BD Biosciences). O experimento foi analisado no citômetro de fluxo FACSVerser no Instituto de Biologia-UnB. A análise dos dados foi realizada pelo uso do *software* FlowJo 10.0.7 (FlowJo LLC, USA).

A partir dos resultados obtidos por esta caracterização, optou-se por continuar os demais estudos apenas com células da polpa dental.

3.2.3. Avaliação migratória de células pulpares

A avaliação migratória de células pulpares foi realizada com culturas celulares confluentes e a realização de 3 marcações (rompimento da adesão celular) na placa, através do método de *scratch*. Em seguida, foi realizado a lavagem da placa com solução PBS 1x, seguido da adição de meio de cultura DMEM (*Sigma Chemical*) sem SFB, adicionado da associação a ser testada. Na sequência, foram realizadas fotografias em microscópio invertido, em aumento de 10x após 24 e 48 horas, a fim de verificar a atividade migratória nestes períodos (8). A análise da migração celular foi realizada após análise das fotografias no *software Image J*.

3.2.4. Avaliação da viabilidade celular e potencial proliferativo de células pulpares

A avaliação da viabilidade celular e seu potencial proliferativo na presença das substâncias testes foi realizada por meio da técnica de exclusão do Azul de Tripán (221). O ensaio foi realizado após os tempos experimentais de 0h, 24h e 48h a fim de avaliar a viabilidade celular e o potencial proliferativo das células pulpares. Obtidas culturas confluentes de células pulpares, foi realizado sua tripsinização e ressuspensão celular em meio DMEM (*Sigma Chemical*) sem SFB (mesmas condições do ensaio de migração celular). Em placas de 24 poços, foram adicionadas 1×10^5 de células pulpares em 1 mL de DMEM (*Sigma Chemical*) sem SFB, em grupos distintos contendo DAP, CIP, IDR1002 e a associação sinérgica proposta pelo estudo. Na sequência, completados os tempos experimentais, as células foram ressuspensas e foi adicionado solução à 0,4% do corante Azul de Tripán (*Sigma Chemicals*), por 1 minuto. As células foram contadas imediatamente utilizando câmara de Neubauer (Brand GmbH, Wertheim, Alemanha). Todas as contagens foram realizadas, utilizando três réplicas técnicas e biológicas de cada amostra em cada tempo experimental e comparadas com o número celular inicial do experimento.

3.2.5. Avaliação da capacidade citotóxica e imunomodulatória

Para avaliação da citotoxicidade e da capacidade imunomodulatória, foi realizado inicialmente um experimento piloto, para definição do modelo *in vitro* a ser utilizado, incluindo a concentração dos estímulos necessários para desencadear uma resposta imuno inflamatória. Para tanto, diferentes concentrações de antígenos mortos pelo calor de *E. faecalis* e *S. aureus* foram incluídos, juntamente com o recombinante (r) IFN- γ .

3.2.5.1 Definição da concentração dos estímulos microbianos mortos pelo calor para análise da atividade citotóxica e imunomodulatória *in vitro*

Os ensaios para definição da concentração dos estímulos microbianos a serem utilizados foram executados na presença de *HK-E. faecalis* e de *HK-S. aureus* associada ao rIFN- γ no tempo experimental de 24 horas. Para isso, as culturas de células pulpares foram analisadas na presença de diferentes concentrações de estímulos microbianos - $10^5, 10^6, 10^7$ e 10^8 UFC.mL⁻¹. Ao final do tempo experimental, foi realizado o teste de MTT para avaliação da viabilidade das culturas celulares (156). Para tanto, o meio de cultura foi removido, e em seguida adicionado 100 μ L de DMEM (*Sigma Chemical*) e 10 μ L de solução MTT (*Sigma Chemicals*), em uma concentração de 5 mg.mL⁻¹. As células em contato com a solução de MTT foram incubadas em estufa umidificada na temperatura de 37 °C, pelo tempo de quatro horas. Em seguida, 100 μ L de dimetilsulfóxido – DMSO 100% foi adicionado e a placa lida em leitor de ELISA, em absorvância de 570 nm (157).

3.2.6. Avaliação da citotoxicidade

Definido o sistema *in vitro* a ser utilizado, passou-se a avaliar a citotoxicidade das amostras, por meio do ensaio de MTT, após o período de 24 h de incubação das placas a 37 °C, 5% de CO₂ e 95% de umidade, incluindo todos os estímulos definidos (presença de antígenos mortos pelo calor, IFN- γ e do ciprofloxacino e do peptídeo IDR1002). Após a exposição da cultura celular a todas as condições experimentais, foi realizado o ensaio colorimétrico MTT (*Sigma Chemicals*) e preparo para o ensaio de avaliação da capacidade imunomodulatória pelo método de qPCR em tempo real.

3.2.7. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios por células pulpares

A partir das culturas celulares estimuladas e após o período de incubação, foi avaliada a produção de (TNFRSF-1), IL-1 β , IL-8 IL-6, IL-10 e GAPDH, após 24 h do contato do peptídeo IDR1002, da pasta DAP e da associação sinérgica entre os dois compostos. As concentrações destes mediadores foram determinadas pelo método de PCR em tempo real com *StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA)*.

Método TRIzol™

Ao *pellet* de células foram adicionados 1000 μ L de TRIzol™ (*ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA*) (223). As amostras foram homogenizadas, mantidas a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugadas a 2.100 rpm, por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foram adicionados 200 μ L de clorofórmio (*ThermoFisher Scientific*). As amostras foram homogenizadas e mantidas a temperatura ambiente, por 10 min, sendo em seguida centrifugadas a 4 °C, a 8.000 rpm, por 20 min. Após a centrifugação, a fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, ao qual foi adicionado 500 μ L de isopropanol (*ThermoFisher Scientific*). A mistura foi homogeneizada com auxílio de aparelho vortex e incubada no gelo, por 10 minutos. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min e o sobrenadante foi descartado. Então, 1 mL de etanol 70% gelado foi adicionado ao *pellet*, e o tubo foi centrifugado a 12.000 rpm, por 5 min. O sobrenadante foi novamente descartado; o *pellet* de RNA mantido a temperatura ambiente até secar e por fim, ressuspensão em 30 μ L de água *RNAse free (ThermoFisher Scientific)*.

Quantificação de RNA

A fim de determinar o volume de RNA de cada amostra a ser utilizado na síntese de cDNA, o RNA foi quantificado no equipamento Qubit® (*Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, Califórnia, EUA*) com o *Qubit® RNA Buffer (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific)* e *Qubit® RNA Reagent (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific)* (222). Para cada quantificação, 1 μ L do fluorófilo foi adicionado e

homogeneizado à 199 µL do tampão. Deste volume, 199 µL foram adicionados e homogeneizados à 1 µL da amostra, sendo estes incubados no escuro, em temperatura ambiente, por dois minutos antes da leitura no equipamento. Após a quantificação, o aparelho permite calcular a concentração final de RNA, em µg.mL⁻¹, a partir do volume inicial de amostra utilizado (1 µL).

Síntese de cDNA

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado a partir de 200 ng-300 ng de RNA, em um volume de 10 µL (completado com água *RNAse free*-Invitrogen™ ThermoFisher Scientific, se necessário). Ao RNA, foi adicionado 10 µL do mix preparado com o *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*® (*Applied Biosystems*/ThermoFisher Scientific). Com este kit, para cada amostra a ser sintetizada em cDNA, utiliza-se: 3,2 µL de água *RNAse free* (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific); 2 µL do *Buffer RT 10X* (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific); 0,8 µL do mix de dNTP 25X (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific); 2 µL de *Random Primers RT 10X* (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific); 1 µL do Inibidor de RNAse 20U/µL (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific); e 1 µL de *MultiScribe*™ *Reverse Transcriptase* (Invitrogen™ ThermoFisher Scientific).

As amostras, em volume final de 20 µL, foram submetidas ao seguinte ciclo de temperatura em um termociclador: 10 min a 25 °C; 120 min a 37 °C; 5 min a 85 °C e 4 °C até que as amostras fossem retiradas do termociclador e armazenadas em freezer a -20 °C (219).

PCR em tempo real

A análise de expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real com *StepOnePlus*™ *Real-Time PCR System* (*Applied Biosystems, ThermoFisher Scientific*), a fim de verificar a expressão de genes indicativos de processos inflamatórios e antiinflamatórios. Para essa análise foram avaliados os genes para expressão de (TNFRSF-1), IL-1β, IL-8 IL-6, IL-10 e GAPDH, como gene constitutivo. A reação de quantificação foi preparada de acordo com as recomendações do fabricante. Cada reação apresentou um volume final de 10 µL, sendo composto por: 0,5 µL de *TaqMan*® *Small RNA Assay* (20X); 0,66 µL de cDNA; 5 µL de *TaqMan*® *Universal PCR Master Mix II* (2x) e 3,83 µL de Água *Nuclease free* com a sonda *TaqMan*® (*Invitrogen*™ *ThermoFisher Scientific - KIT q-PCR Assay*). No final

desses ciclos, os resultados foram analisados para determinar diferença na expressão de miRNA nas amostras testadas (120).

3.3. Análise estatística

Os dados foram avaliados no programa GraphPad Prism® versão 10 (GraphPad Software, Inc., Califórnia, EUA) para análise estatística dos dados. A análise dos dados estatísticos e distribuição de frequências foram geradas para todas as variáveis do estudo. Os dados que apresentavam padrão de normalidade foram apresentados como média e desvio padrão (DP). De acordo com a análise estatística, a normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O valor de significância foi considerado $p < 0,05$. Para os dados não normais foi realizado o teste one-way ANOVA, com o pós-teste de Bonferroni. As análises foram consideradas estatisticamente significantes adotando-se o valor de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1. Caracterização fenotípica das células pulpares, do ligamento periodontal e da papila apical

Todas as amostras avaliadas por citometria de fluxo foram provenientes de culturas isoladas a partir do tecido pulpar de terceiros molares com ápices abertos, na 4^o passagem celular. As células em cultura demonstraram marcação superior a 97% para os marcadores positivos para CTMs, CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D), CD106 (F), e inferior à 1%, para o coquetel de marcadores negativos (G). Três tipos celulares envolvidos no contexto de revascularização pulpar foram avaliados: células pulpares (Figura 3), células do ligamento periodontal (Figura 4) e células da papila apical (Figura 5). Frente aos resultados de caracterização, as células pulpares foram eleitas para serem utilizadas nos experimentos seguintes do estudo.

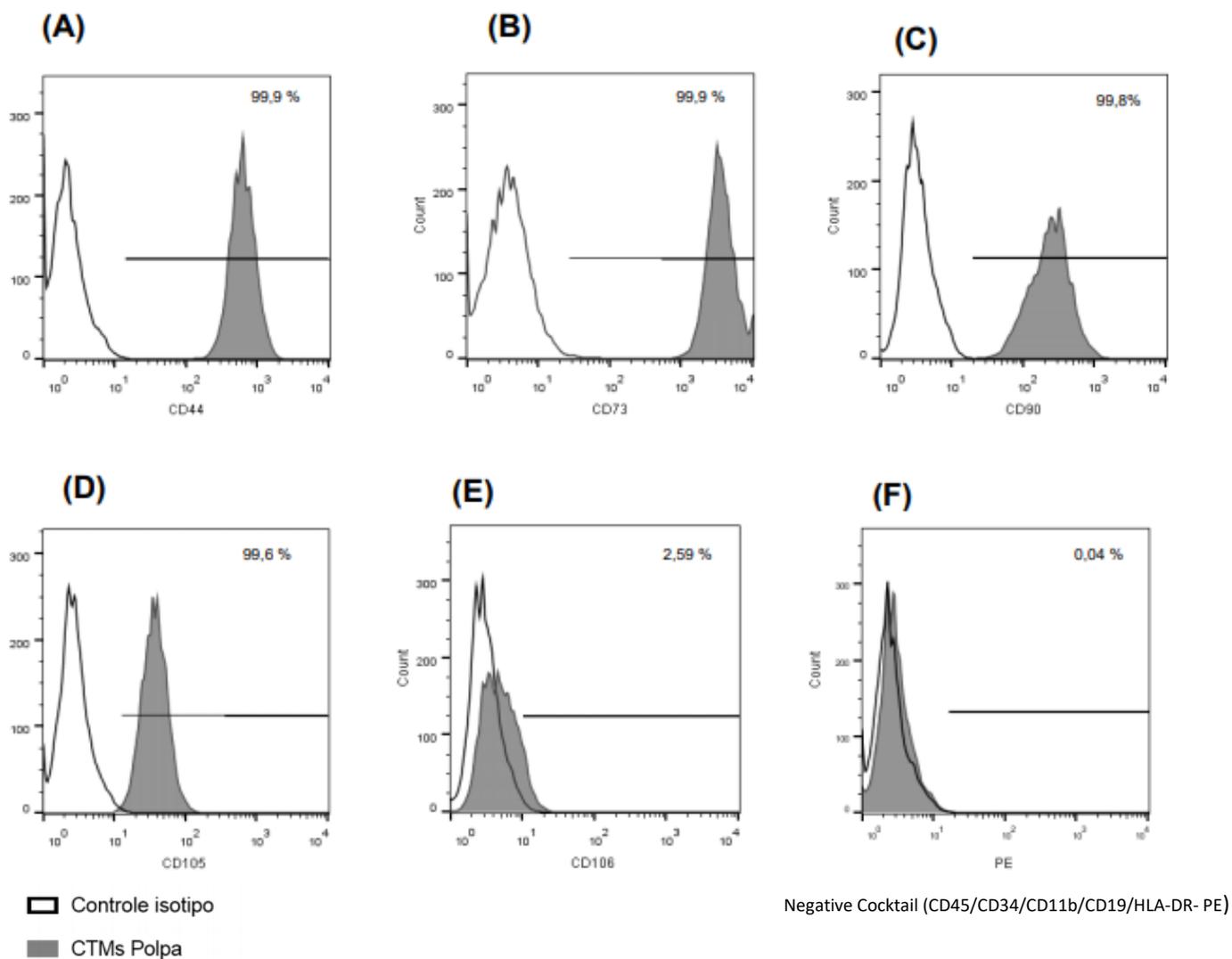


Figura 3: Histogramas de parâmetros únicos demonstrando a expressão dos marcadores de CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D), CD106 (E) e coquetel de marcadores negativos para CTMs (F), em culturas de células pulpares, na 4ª passagem. Resultados de um experimento de imunofenotipagem para MSCs (controle isotipo: branco, CTMs pulpares: cinza).

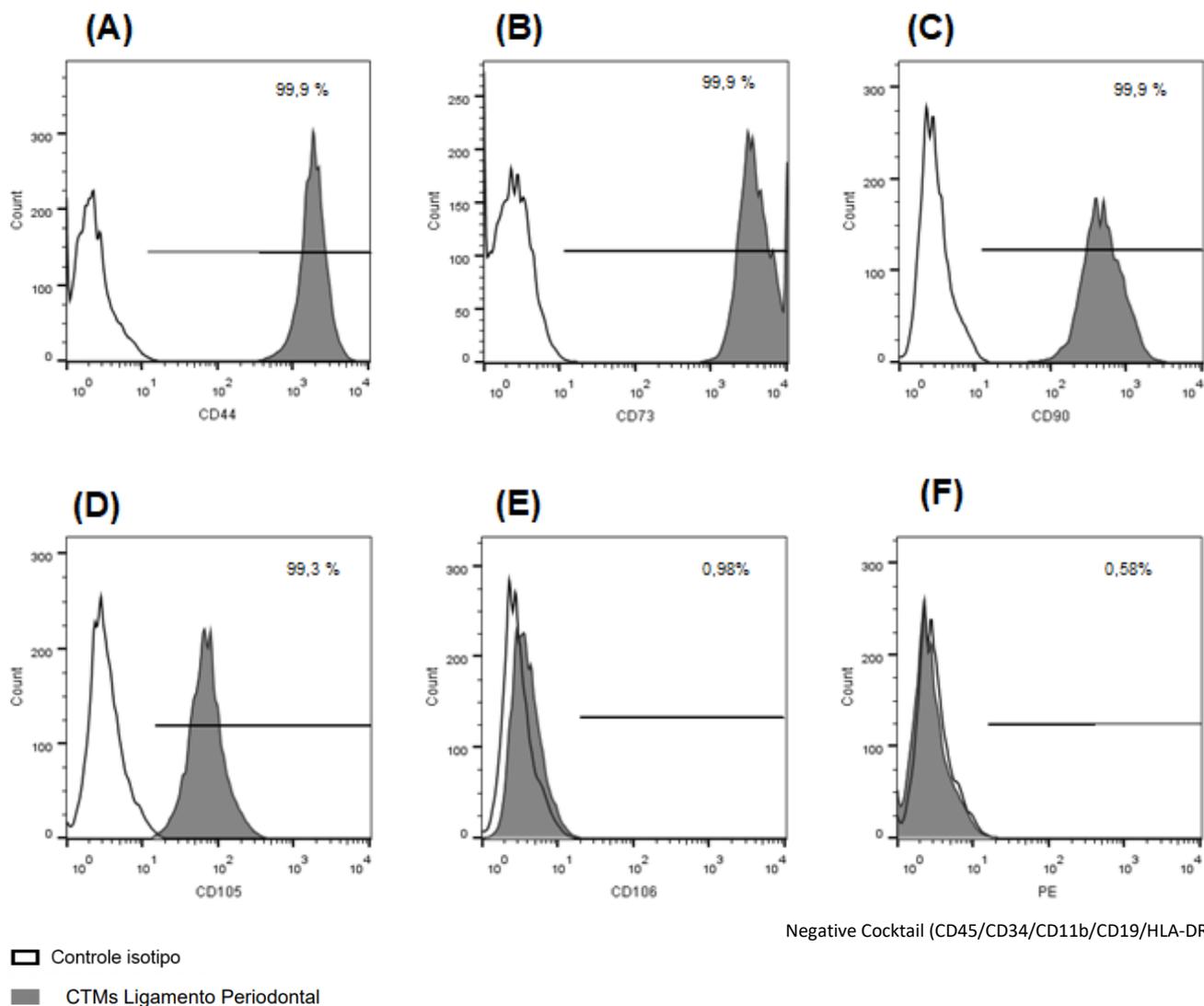


Figura 4: Histogramas de parâmetros únicos demonstrando a expressão dos marcadores de CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D), CD106 (E) e coquetel de marcadores negativos para CTMs (F), em culturas de células do ligamento periodontal, na 4ª passagem. Resultados de um experimento de imunofenotipagem para MSCs (controle isotipo: branco, CTMs do ligamento periodontal: cinza).

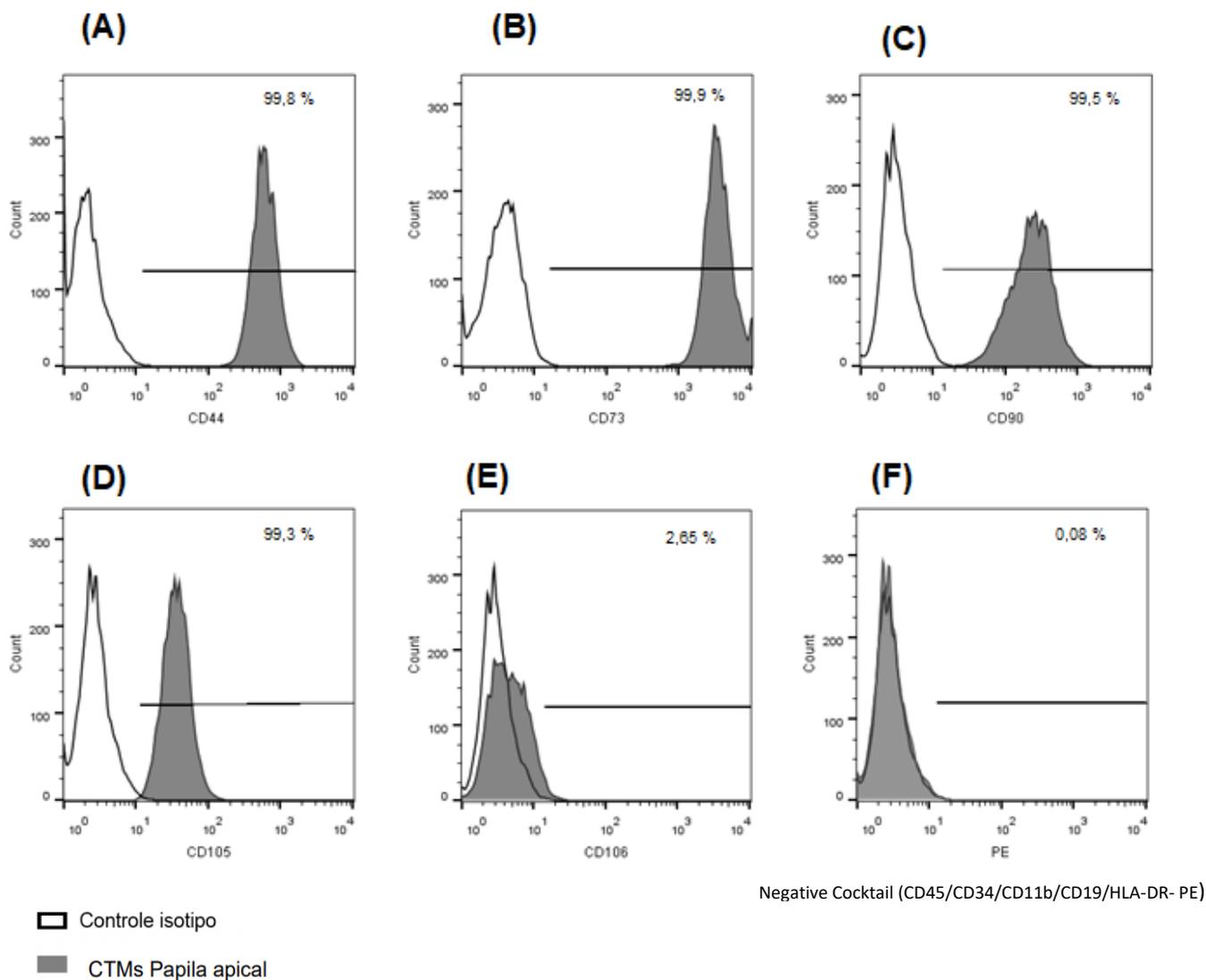


Figura 5: Histogramas de parâmetros únicos demonstrando a expressão dos marcadores de CD44 (A), CD73 (B), CD90 (C), CD105 (D), CD106 (E) e coquetel de marcadores negativos para CTMs (F), em culturas de células da papila apical, na 4ª passagem. Resultados de um experimento de imunofenotipagem para MSCs (controle isotipo: branco, CTMs da papila apical: cinza).

4.2. Avaliação da atividade migratória de culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP

O comportamento migratório das culturas primárias de células pulpares na 4ª passagem foi avaliado separadamente em grupos distintos expostos à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 juntamente com CIP, nos tempos de 24 e 48h. O parâmetro avaliado foi o valor absoluto de células migradas para o interior da ferida, em cada grupo experimental nos diferentes tempos descritos. Foi observado que a capacidade migratória das células pulpares *in vitro* foi aumentada nos grupos expostos ao peptídeo IDR-1002 e à combinação sinérgica em ambos os tempos experimentais, $p < 0,0001$ (Figuras 6 e 7). Notou-se aumento de 87% (nos grupos contendo IDR-1002) e 104% (nos grupos contendo IDR-1002 com CIP) em 24h, assim como 125% (nos grupos contendo IDR-1002) e 134% (nos grupos contendo IDR-1002 com CIP) em 48h, respectivamente, quando comparados aos controles em 24h e 48h, $p < 0,0001$ (Figuras 6 e 7). No entanto, após 48h observou-se aumento de migração celular nos grupos expostos ao peptídeo, destacando-se principalmente o grupo cuja combinação sinérgica foi proposta (IDR-1002 com o ciprofloxacino), $p < 0,0001$.

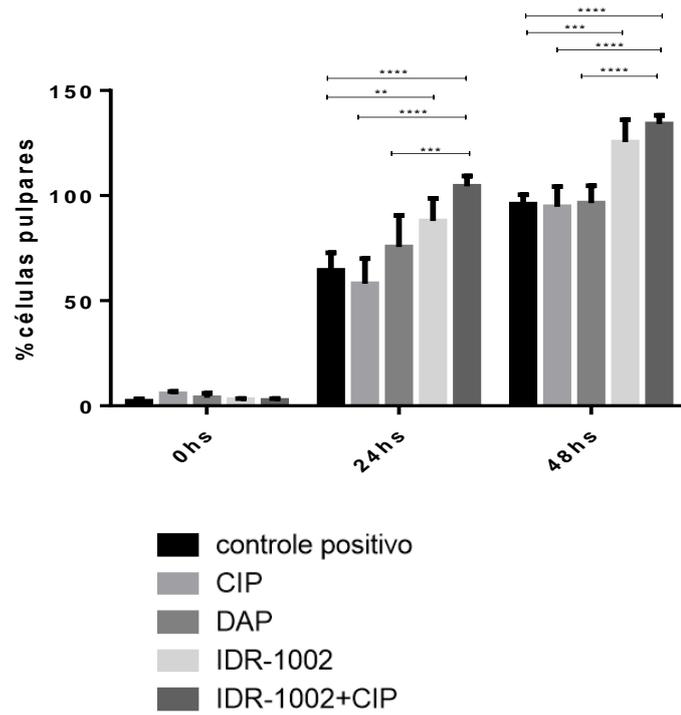


Figura 6: Avaliação do percentual migratório de cultura de células pulpare primárias expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24 e 48h. Diferenças estatísticas verificadas pelo teste *one-way* ANOVA e pós-teste Bonferroni. ** $p < 0,05$ *** $p < 0,0001$ **** $p < 0,0001$.

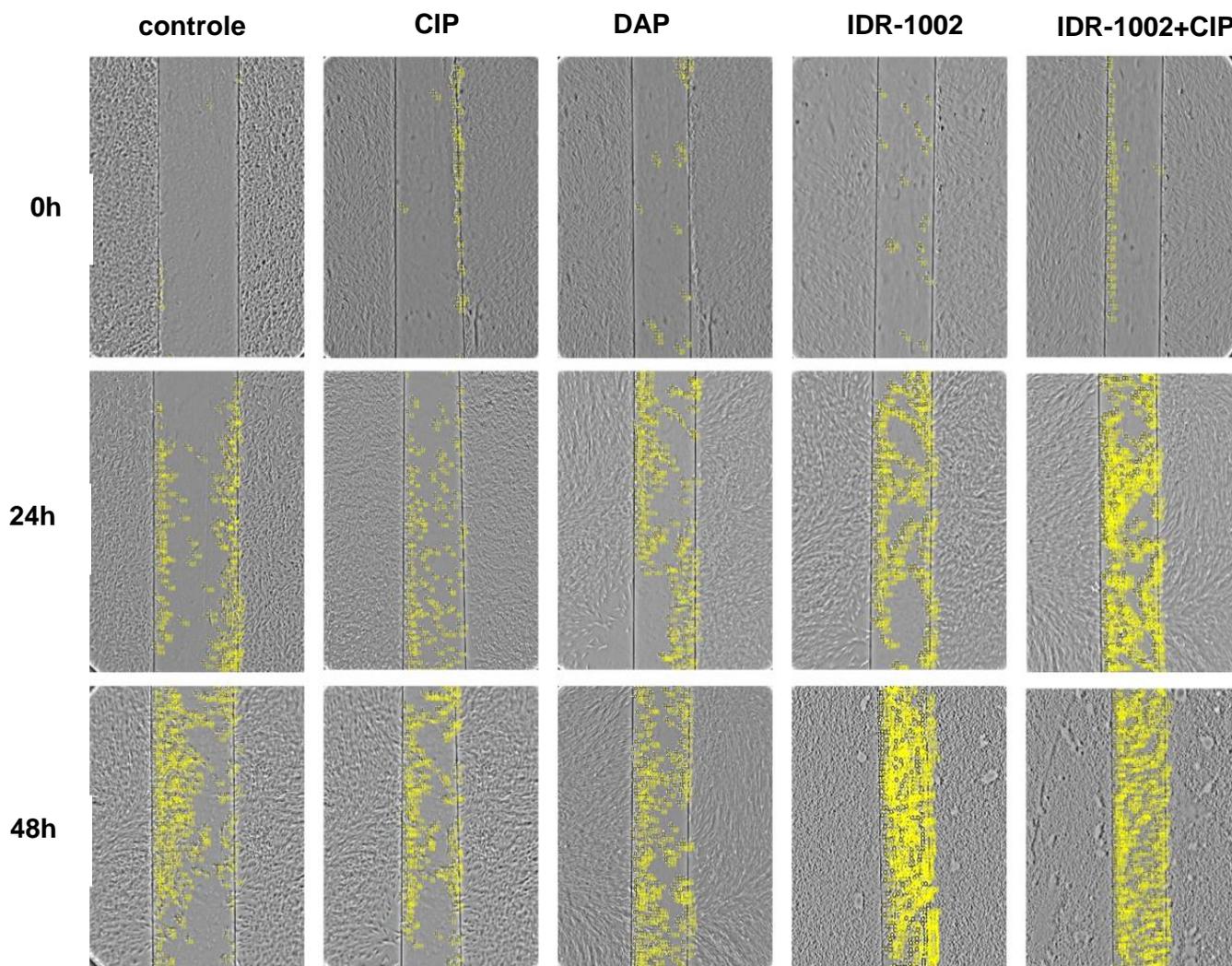


Figura 7: Imagens do ensaio de migração celular em cultura pulpar primária, através do método de *scratch*, após exposição ao CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP nos tempos de 0h, 24h e 48h. Os pontos denotam a presença de cada célula.

4.3. Avaliação do potencial proliferativo de culturas de células pulpare, na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP

A avaliação da viabilidade celular e seu potencial proliferativo na presença das substâncias testes foi realizada por meio da técnica de exclusão por azul de tripan. O ensaio foi realizado após os tempos experimentais de 0h, 24h e 48h a fim de avaliar a viabilidade celular e o potencial proliferativo das células pulpare na 4ª passagem em grupos distintos, expostos à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP. Foi observado que o potencial proliferativo das células pulpare *in vitro* foi aumentado nos grupos expostos ao peptídeo IDR-1002 e à combinação sinérgica em ambos os tempos experimentais, $p < 0,0001$. Nos tempos experimentais de 24h (Figura 8A) e 48h (Figura 8B), notou-se aumento do potencial proliferativo celular em 77% nos grupos estimulados com peptídeo IDR-1002, assim como no grupo cuja combinação sinérgica foi utilizada, $p < 0,05$ em 24h e $p < 0,0001$ em 48h.

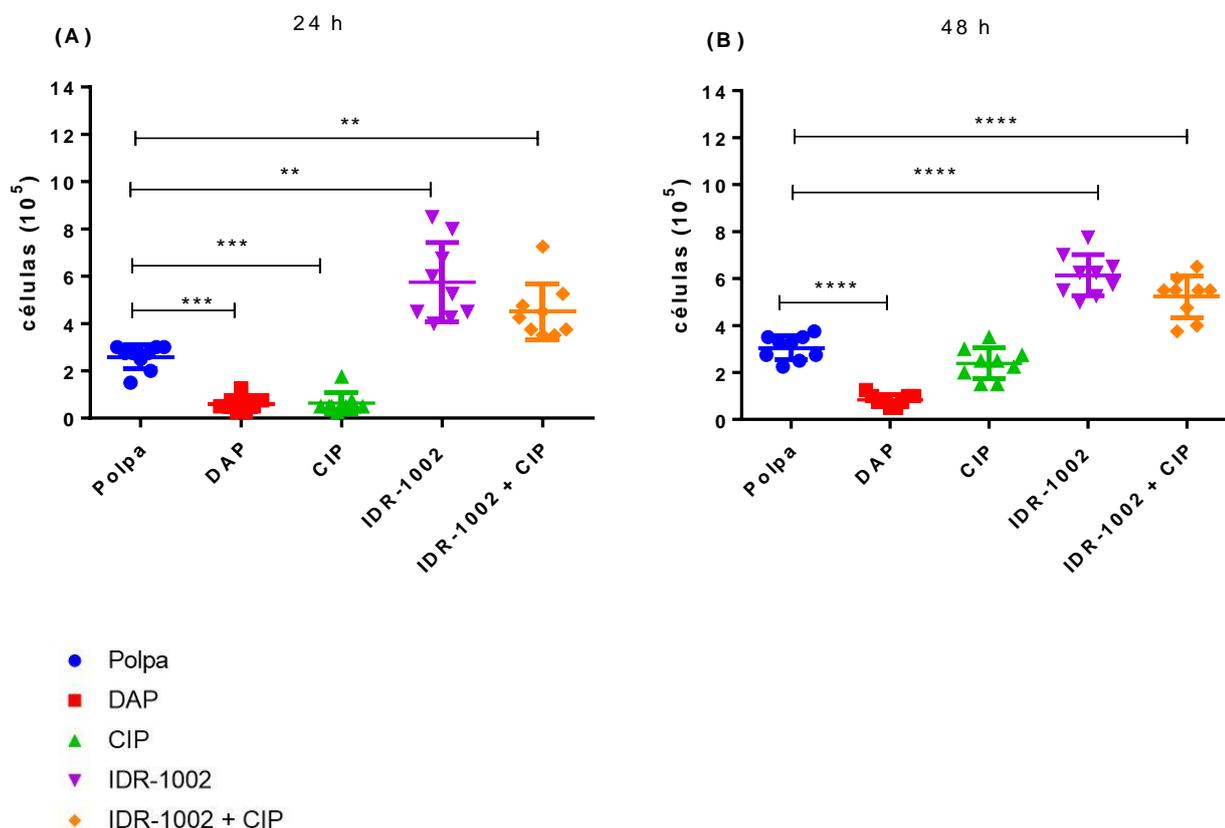


Figura 8: Apresentação geral dos grupos em cores distintas sendo o grupo controle sem estímulo (azul), DAP (vermelho), CIP (verde), IDR-1002 (roxo) e IDR-1002 com CIP (laranja). Avaliação do potencial proliferativo em cultura pulpar primária, através do método de azul de tripan, após exposição à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP nos tempos de 24h (A) e 48h (B). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. ** $p < 0,05$ *** $p < 0,0001$ **** $p < 0,0001$.

4.4. Avaliação da viabilidade celular em culturas de células pulpares humanas, na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino) e da pasta DAP

Para avaliação da expressão de citocinas via qPCR, diferentes situações experimentais foram aplicadas aos grupos testes - CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP. O desenho destas situações remetem situações clássicas de resposta a infecção (na presença de LPS) e situações de resposta imunoinflamatória (na presença de LPS com IFN- γ), assim como situações de resposta a infecção antígeno específica (na presença de HK-*E. faecalis* e HK-*S. aureus*) e situações de resposta imunoinflamatória antígeno específica (na presença de HK-*E. faecalis* com IFN- γ e HK-*S. aureus* com IFN- γ). Frente à testes com diferentes concentrações de antígenos microbianos, a concentração de 10^7 UFC.mL⁻¹ para os *heat killed* (HK) específicos foi eleita para ser utilizada nos experimentos seguintes. Para tanto, inicialmente, avaliou-se a viabilidade celular dos grupos experimentais, nas diversas situações propostas (Figura 9). Observou-se que a viabilidade celular não foi alterada após 24h de incubação em nenhuma das situações propostas. Assim, estas situações experimentais foram escolhidas para dar seguimento aos ensaios de imunomodulação, pelo método de qPCR em tempo real. Em função da ausência de diferenças estatísticas entre os grupos CIP e DAP, nesta análise e nos experimentos anteriores, o grupo contendo DAP foi removido dos próximos ensaios, visto que este grupo não apresentou mudanças significativas no contexto do estudo.

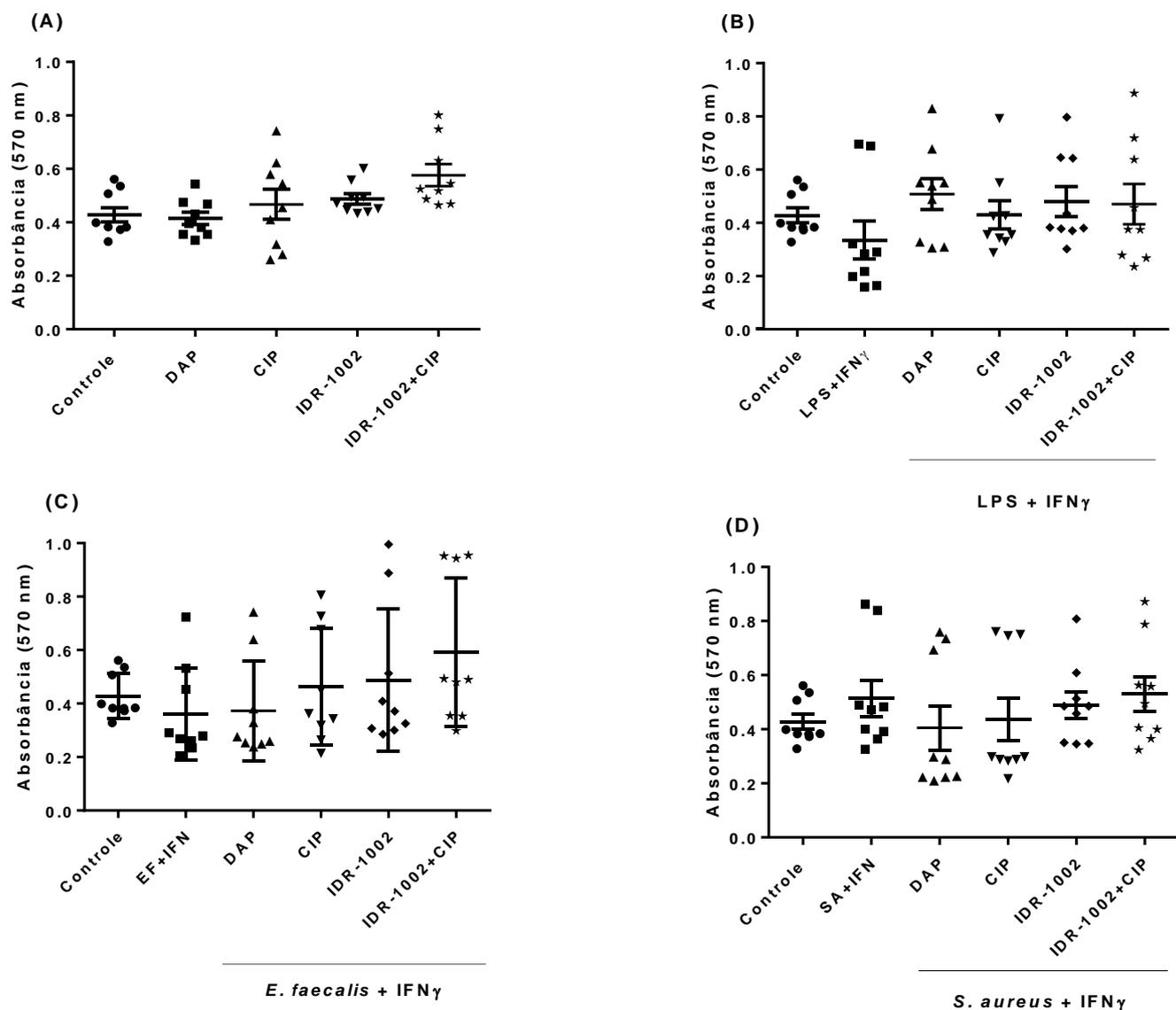


Figura 9: Viabilidade de células pulparem em culturas primárias na 4ª passagem expostas à DAP, CIP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP em diferentes situações experimentais: apenas na presença destes estímulos (A); na presença destes estímulos e de LPS e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B); na presença destes estímulos e de *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (C); na presença destes estímulos e de *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), após 24h de incubação. As barras representam a média e o erro-padrão da absorbância (570 nm) de triplicatas técnicas e biológicas. Não foram observadas diferenças estatísticas realizadas por *one-way* ANOVA com correções de Bonferroni.

4.5. Avaliação da produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios TNFRSF-1, IL-1 β , IL-8, IL-6 e IL-10 em culturas de células pulpares, na presença da associação sinérgica (IDR-1002 e ciprofloxacino)

4.5.1. Avaliação da expressão do fator de necrose tumoral (TNFRSF-1)

A expressão do gene TNFRSF-1 nas amostras expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP foi avaliada após 24h de incubação. Observou-se redução dos níveis de expressão do gene inflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica, IDR-1002 com CIP (Figura 10A). Também foi observada redução da expressão de TNFRSF-1, na presença do IDR-1002 com e sem CIP, nas situações experimentais incluindo estímulo com LPS ($p \leq 0,0001$, Figura 10B); estímulo com LPS e IFN- γ ($p \leq 0,0001$, Figura 10D); estímulo com antígenos microbianos *HK-E. faecalis* ($p \leq 0,0001$, Figura 10E); e estímulo com *HK-S. aureus* ($p \leq 0,0001$, Figura 10G). Nas situações experimentais em que foram apresentados os antígenos microbianos associados ao rIFN- γ observou-se redução significativa da expressão do gene TNFRSF-1 ($p \leq 0,0001$) nos grupos expostos ao peptídeo (Figuras 10F e 10H). Porém, observou-se mudança do perfil de expressão gênica nos ensaios estimulados apenas com rIFN- γ , em que houve aumento da expressão de TNFRSF-1 nos grupos expostos ao peptídeo, $p \leq 0,0001$ (Figura 10C).

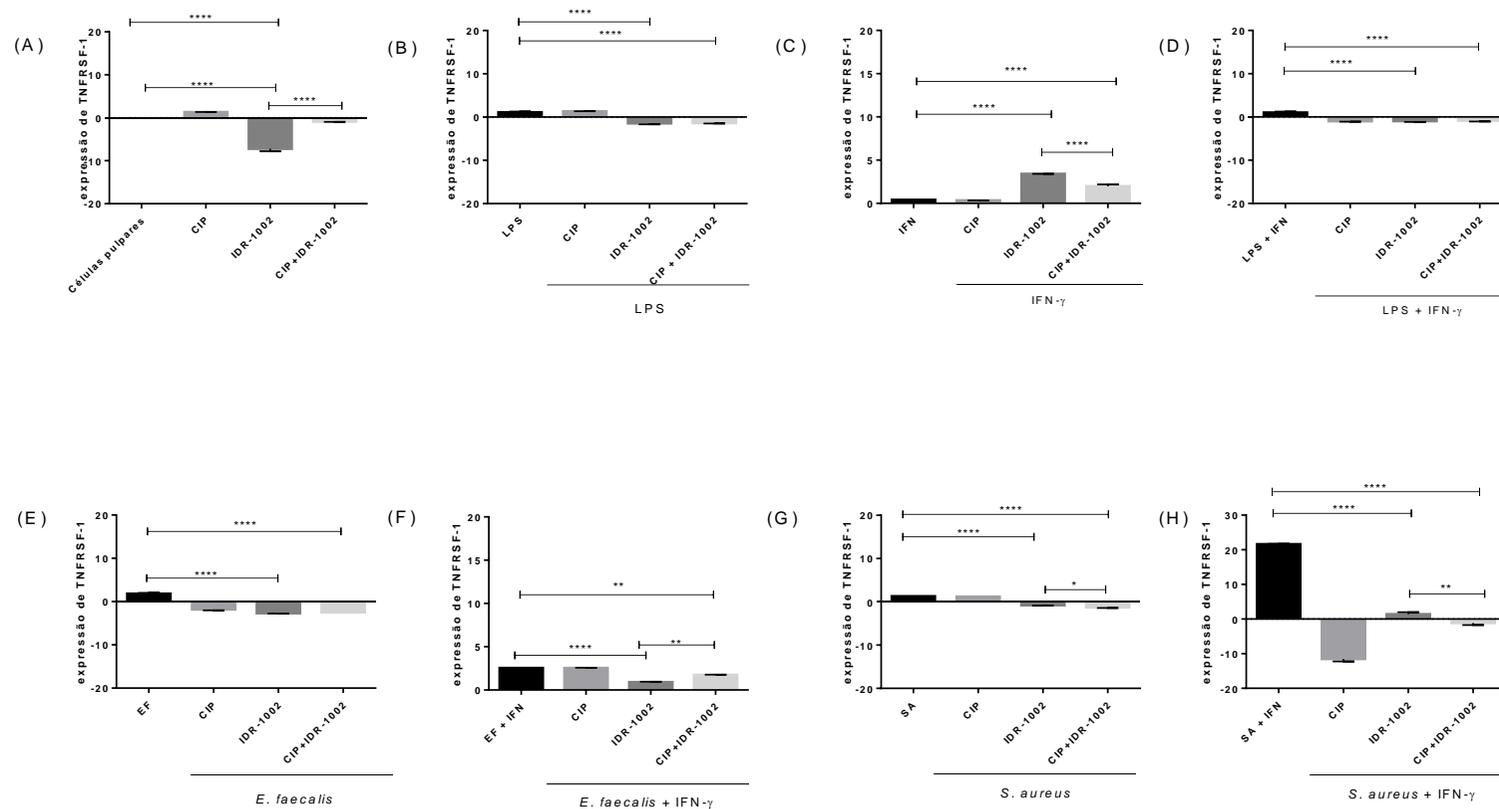


Figura 10: Expressão do gene TNFRSF-1 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP após 24h de incubação (A). A expressão de TNFRSF-1 foi analisada na presença dos estímulos: LPS (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,0001$.

4.5.2. Avaliação da expressão de interleucina-8

A expressão do gene IL-8 nas amostras expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP foi avaliada após 24h de incubação. Observou-se redução dos níveis da expressão do gene inflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica (Figura 11A). Verificou-se que quando estimuladas com LPS, o grupo exposto à combinação sinérgica apresentou aumento da expressão de IL-8 em relação ao controle, $p \leq 0,0001$, sendo este valor superior, ao apresentado apenas na presença do IDR-1002, nesta condição experimental (Figura 11B). De forma semelhante, também foi observado aumento da expressão gênica nos grupos estimulados com rIFN- γ e expostos ao peptídeo e a associação do peptídeo com o CIP, $p \leq 0,0001$ (Figura 11C). No entanto, na situação experimental contendo LPS e rIFN- γ , os grupos contendo IDR-1002 e IDR-1002 com CIP apresentaram redução da expressão de IL-8, em comparação com o controle, $p \leq 0,0001$ (Figura 11D). Ademais, todos os grupos reduziram a expressão do gene IL-8, quando estimulados com antígenos microbianos *HK-E. faecalis*, $p \leq 0,0001$ (Figura 11E) e *HK-S. aureus*, $p \leq 0,0001$ (Figura 11G). Na situação experimental em que foram utilizados estímulos com *HK-S. aureus* e rIFN- γ , observou-se redução significativa da expressão do gene IL-8 ($p \leq 0,0001$) nos grupos expostos ao peptídeo e a combinação sinérgica entre o IDR-1002 e CIP (Figura 11H).

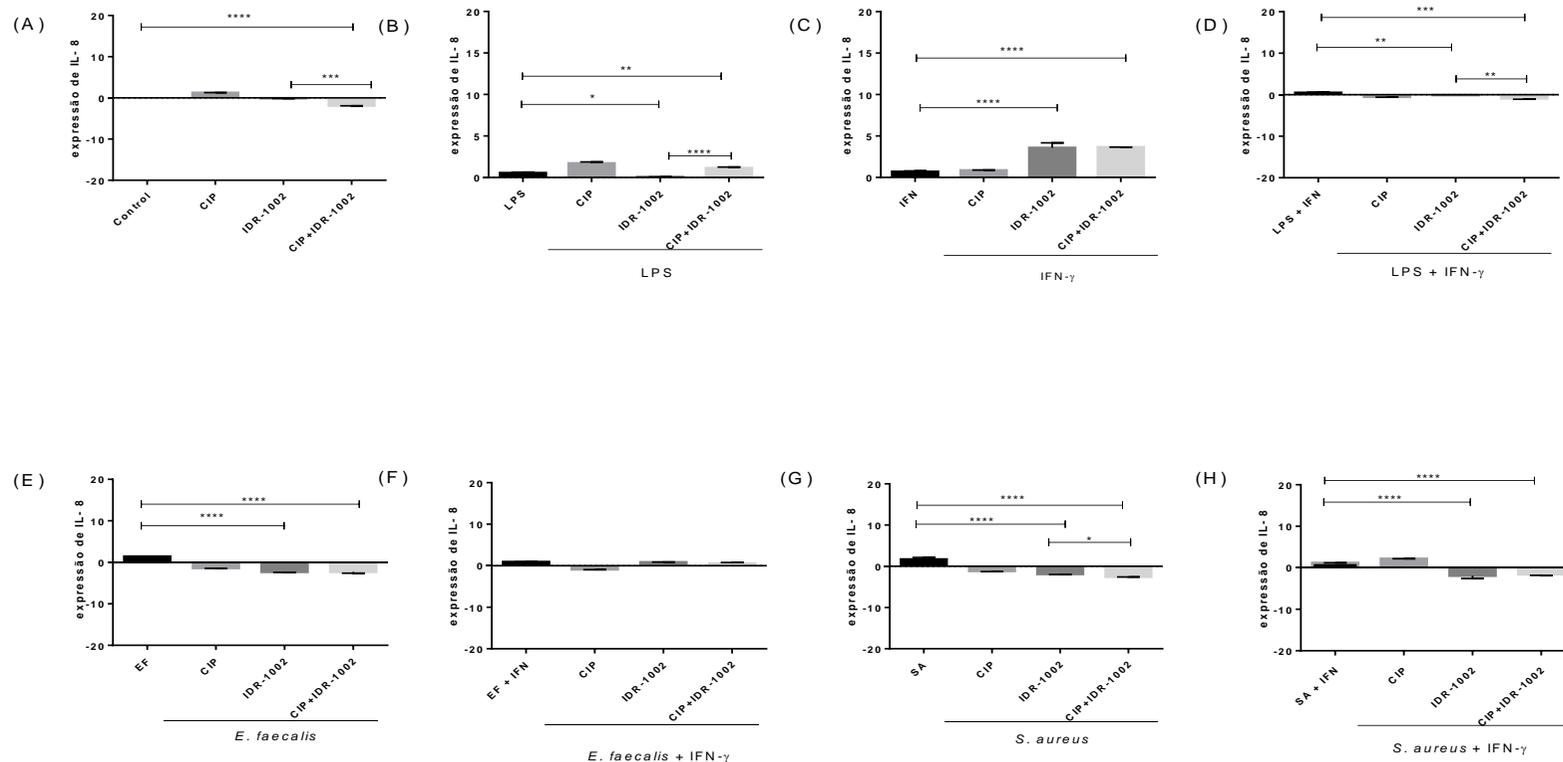


Figura 11: Expressão do gene IL-8 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). A expressão de IL-8 foi analisada na presença dos estímulos: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ *** $p \leq 0,0001$ **** $p \leq 0,0001$.

4.5.3. Avaliação da expressão de interleucina-6

A expressão do gene IL-6 nas amostras expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP foi avaliada após 24h de incubação. Observou-se redução dos níveis de expressão do gene inflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica (Figura 12A). Verificou-se que quando estimuladas com rIFN- γ , o grupo exposto ao IDR-1002 com rIFN- γ reduziu a expressão de IL-6, $p \leq 0,0001$ (Figura 12B). O nível de expressão dos grupos expostos ao peptídeo juntamente com o CIP, manteve-se aumentado nos grupos estimulados com LPS e rIFN- γ (Figura 12D) em relação ao controle, assim como nos ensaios estimulados com os antígenos microbianos *HK-E. faecalis* e de *HK-S. aureus* e rIFN- γ (Figuras 12F e 12H). Nos ensaios estimulados com LPS verificou-se redução dos níveis de expressão do gene IL-6, nos grupos expostos ao peptídeo com CIP, $p \leq 0,0001$ (Figura 12B). Observou-se que o padrão de redução de expressão gênica de IL-6 manteve-se nos ensaios estimulados com os antígenos microbianos *HK-E. faecalis* e de *HK-S. aureus* sem rIFN- γ , para os grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica, respectivamente; $p \leq 0,0001$ (Figuras 12E e 12G).

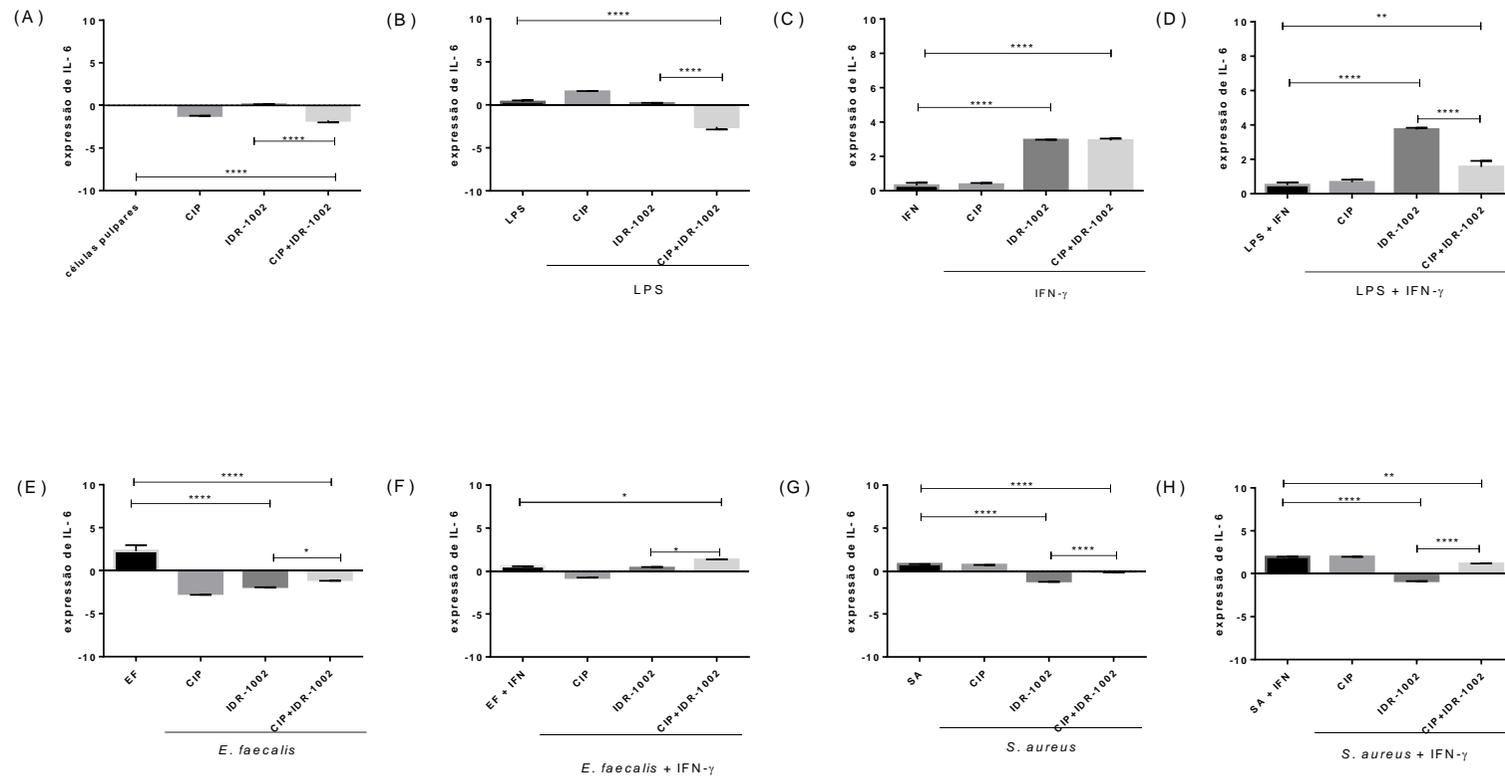


Figura 12: Expressão do gene IL-6 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). A expressão de IL-6 foi analisada na presença dos estímulos: LPS ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL^{-1}) com rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL^{-1}) e rIFN- γ ($1 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ ** $p \leq 0,01$ **** $p \leq 0,0001$.

4.5.4 Avaliação da expressão de interleucina-1 β

A expressão do gene IL-1 β nas amostras expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP foi avaliada após 24h de incubação. Observou-se redução dos níveis de expressão do gene inflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica em relação ao controle, $p \leq 0,0001$ (Figura 13A). Verificou-se que houve redução dos níveis de expressão de IL-1 β nos ensaios estimuladas com LPS, no grupo exposto à combinação IDR-1002 e CIP, $p \leq 0,0001$ (Figura 13B). Também foi observada redução da expressão gênica nos grupos contendo o peptídeo e a combinação sinérgica quando estimulados com LPS com rIFN- γ , $p \leq 0,0001$ (Figura 13D), como também quando estimulado com os antígenos microbianos de *HK-S. aureus* (Figura 13G), $p \leq 0,0001$ e quando estimulado com estímulos de *HK-S. aureus* associados ao rIFN- γ , $p \leq 0,0001$ (Figura 13H). No entanto, aumento na expressão de IL-1 β , foi observada na presença do IDR-1002 com e sem CIP, na situação de estímulo apenas com rIFN- γ , $p \leq 0,0001$ (Figura 13C). Porém, na presença dos estímulos de HK-*E. faecalis* associados ao rIFN- γ , observou-se aumento da expressão do gene IL-1 β , nos grupos expostos a combinação sinérgica em relação aos controles, $p \leq 0,0001$ (Figura 13F). Em contrapartida, uma diminuição da expressão de IL-1 β , foi observada na presença da associação sinérgica, na situação experimental de estímulo com HK-*E. faecalis*, $p \leq 0,0001$ (Figura 13E).

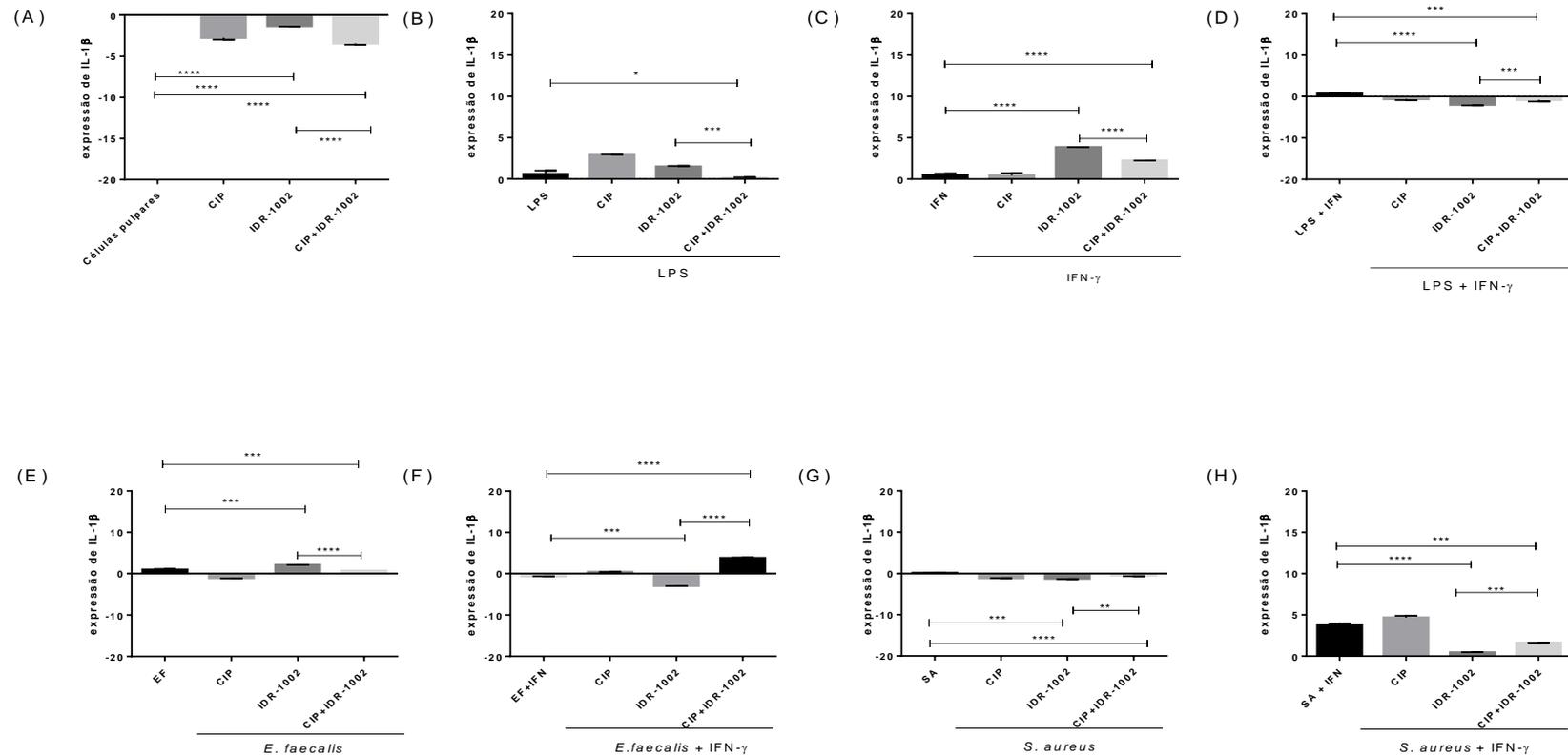


Figura 13: Expressão do gene IL-1 β nas amostras de culturas de células pulpareas primárias em 4^a passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). A expressão de IL-1 β foi analisada na presença dos estímulos: LPS (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL⁻¹) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL⁻¹) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL⁻¹) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL⁻¹) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. * $p \leq 0,05$ *** $p \leq 0,0001$ **** $p \leq 0,0001$.

4.5.5 Avaliação da expressão de interleucina-10

A expressão do gene IL-10 nas amostras expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP foi avaliada após 24h de incubação. A expressão do gene IL-10 nas amostras expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP foi avaliada após 24h de incubação. Os dados obtidos foram correlacionados à expressão da amostra controle de cada grupo experimental após normalização dos dados com gene GAPDH. Observou-se redução dos níveis de expressão do gene antiinflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica em relação ao controle, $p \leq 0,0001$ (Figura 12A). Verificou-se que quando estimulados com LPS (Figura 12B), rIFN- γ (Figura 12C), LPS com rIFN- γ (Figura 12D), e antígenos HK-S. *aureus* (Figura 12G), expressão de IL-10 permaneceu reduzida, mas inalterada entre os diferentes grupos experimentais testados. Ademais, verificou-se redução na expressão do gene IL-10, mas em valores menores que no grupo controle, na presença da associação sinérgica em comparação com os respectivos controles, nas situações experimentais de estímulo com HK-*E. faecalis* e HK-*E. faecalis* com rIFN- γ , $p \leq 0,0001$ Figuras 12E e F). Na situação experimental contendo antígenos HK-S. *aureus* e rIFN- γ , observou-se uma redução da inibição da expressão de IL-10, observada no grupo controle, quando a associação sinérgica foi utilizada, $p \leq 0,0001$ (Figura 12H). Observou-se redução dos níveis de expressão do gene antiinflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica em relação ao controle, $p \leq 0,0001$ (Figura 14A). Verificou-se que quando estimulados com LPS (Figura 14B), rIFN- γ (Figura 14C), LPS com rIFN- γ (Figura 14D), e antígenos HK-S. *aureus* (Figura 14G), expressão de IL-10 permaneceu reduzida, mas inalterada entre os diferentes grupos experimentais testados. Ademais, verificou-se redução na expressão do gene IL-10, mas em valores menores que no grupo controle, na presença da associação sinérgica em comparação com os respectivos controles, nas situações experimentais de estímulo com HK-*E. faecalis* e HK-*E. faecalis* com rIFN- γ , $p \leq 0,0001$ (Figuras 14E e F). Na situação experimental contendo antígenos HK-S. *aureus* e rIFN- γ , observou-se uma redução da inibição da

expressão de IL-10, observada no grupo controle, quando a associação sinérgica foi utilizada, $p \leq 0,0001$ (Figura 14H).

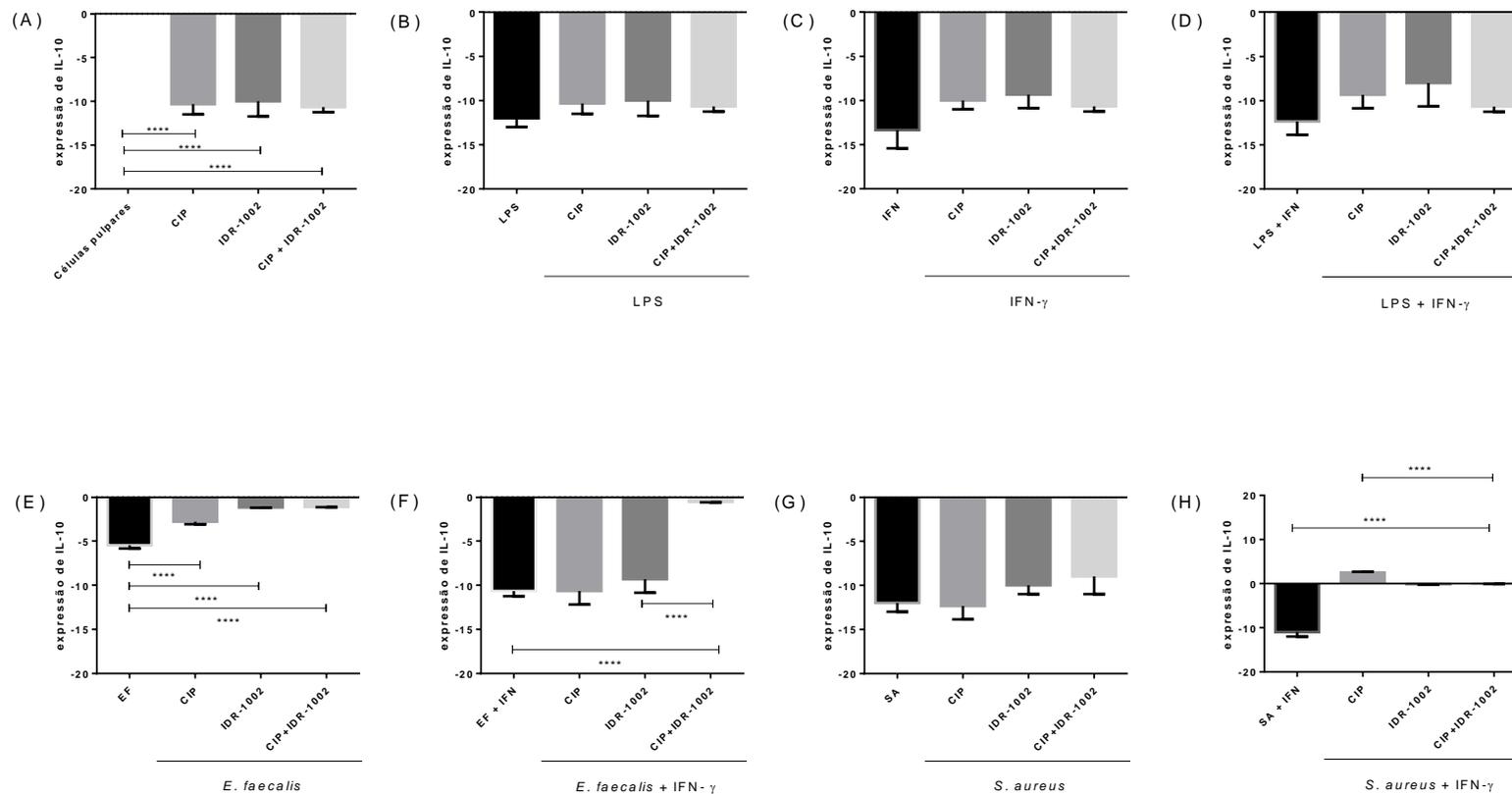


Figura 14: Expressão do gene IL-10 nas amostras de culturas de células pulpares primárias em 4ª passagem, expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP, após 24h de incubação (A). Os dados obtidos foram correlacionados à expressão da amostra controle de cada grupo experimental após normalização dos dados com gene GAPDH. A expressão de IL-10 foi analisada na presença dos estímulos: LPS (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (B), rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (C), LPS e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (D), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (E), *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (F), *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) (G) e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (H). Os gráficos representam a média e desvio padrão da contagem de três réplicas biológicas em triplicata. Diferença estatística entre os grupos verificada pelo teste *one-way* ANOVA e pós teste Bonferroni. **** $p \leq 0,0001$.

4.5.6 Avaliação global da expressão de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios

A expressão dos genes inflamatórios (TNFRSF-1, IL-8, IL-1 β e IL-6) e antiinflamatório (IL-10) nas amostras expostas à CIP, DAP, IDR-1002 e IDR-1002 com CIP foi avaliada após 24h de incubação. Observou-se a expressão dinâmica dos mRNAs em diferentes situações experimentais (Figura 15). Quando estimuladas com LPS, tanto o grupo exposto ao IDR-1002, quanto o grupo exposto à combinação sinérgica, apresentaram diminuição da expressão de interleucinas inflamatórias, visto que apresentaram expressões gênicas com nível menor ou igual a -5. Foi observado também, redução da expressão das interleucinas inflamatórias nos grupos contendo o peptídeo quando estimulados com LPS com rIFN- γ em relação ao grupo contendo células pulpares e redução de expressão gênica comparável aos grupos estimulados com os antígenos microbianos *HK-E. faecalis* e de *HK-S. aureus*, mantendo perfil de expressões com nível menor ou igual a -5. Assim como, nas situações experimentais em que foram apresentados os antígenos microbianos associados ao rIFN- γ , observou-se redução significativa da expressão dos genes inflamatórios nos grupos expostos ao peptídeo comparados ao grupo apenas com as células pulpares. Ao avaliar o perfil antiinflamatório das biomoléculas envolvidas no estudo, verificou-se que há redução dos níveis de expressão de IL-10, nas situações experimentais visto que apresentaram expressões gênicas com nível maior ou igual a -5.

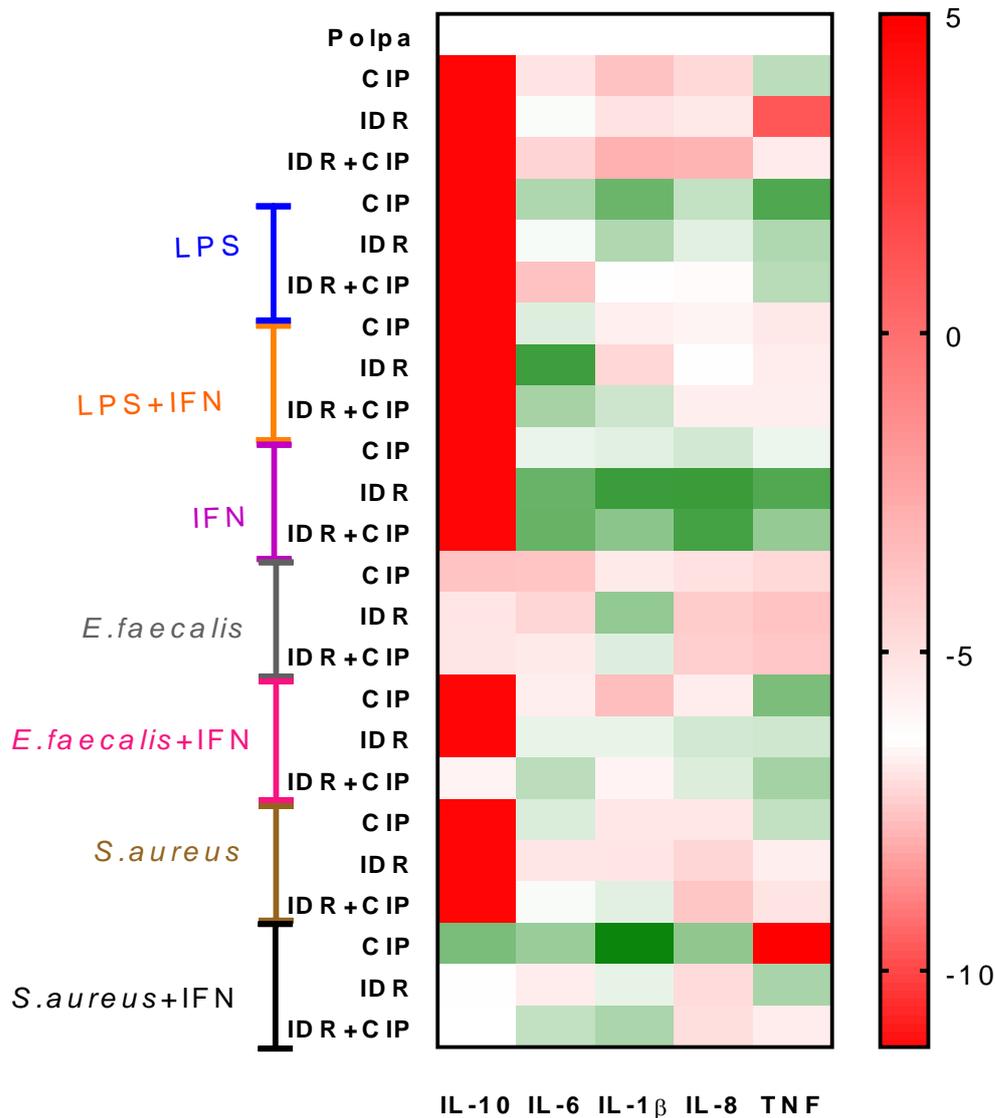


Figura 15: *Heatmap* indicando a variação do nível de expressão de mRNA de IL-10, IL-6, IL-1 β , IL-8 e TNFSFR1 nos sistemas inflamatórios *in vitro* na presença dos estímulos agrupados: LPS (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em azul, LPS (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em laranja, rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em roxo, *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) em cinza, *HK-E. faecalis* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em rosa, *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) em marrom e *HK-S. aureus* (10^7 UFC.mL $^{-1}$) e rIFN- γ (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) em preto. Expressões genéticas com nível menor ou igual a -5 foram consideradas como ausência de acordo com a variação da escala de expressão de 5 (verde) à -10 (vermelho).

5 DISCUSSÃO

O avanço das pesquisas em biologia molecular tem proporcionado significantes mudanças no âmbito da engenharia tecidual. A expectativa atual é que a biotecnologia possibilite a regeneração de tecidos injuriados por diversas patologias, traumatismos ou até mesmo tecidos ausentes por problemas congênitos, utilizando de componentes básicos como *scaffolds* de matriz extracelular, morfógenos e células tronco (224). Na odontologia, a engenharia de tecidos vem crescendo e se tornando protagonista de diversas linhas de pesquisa, sobretudo na endodontia regenerativa, a qual tem por objetivo realizar o restabelecimento da função normal da polpa em dentes necróticos e infectados, o que resultaria no restabelecimento das funções protetoras da polpa, incluindo a imunidade inata e função de reparo por meio da mineralização (225). Desta forma, os procedimentos endodônticos regenerativos (REPs) são terapias propostas pela bioengenharia que visam restabelecer as funções fisiológicas da polpa dentária, essas terapias englobam uma tríade acima mencionada, que inclui fatores de crescimento, células tronco e *scaffolds*, que precisa ser melhor estudada para o desenvolvimento de novos protocolos de tratamento que vençam as barreiras até então encontradas no uso dos REPs (226-227).

Os REPs apresentam-se como um caminho relativamente novo e interessante para a aplicação de estratégias envolvendo engenharia tecidual. Nesse contexto, a revascularização pulpar pode ser uma alternativa terapêutica para o tratamento de dentes permanentes imaturos, com necrose pulpar, através da formação de um coágulo apical induzido, contendo células tronco somáticas e fatores de crescimento que podem promover reparo ou regeneração tecidual (80). No entanto, a técnica padrão atualmente utilizada para formação de novo tecido pulpar precisa ser refinada (228). Fatos importantes a serem considerados são a imprevisibilidade da concentração de células tronco aprisionadas no coágulo sanguíneo formado e o fato da pasta antibiótica utilizada poder afetar o processo de neoformação tecidual (229). As aplicações da pasta variam, desde a terapia pulpar vital, em casos de exposição pulpar, até o protocolo de regeneração e revascularização. Estudos demonstraram que as pastas antibióticas podem eliminar microrganismos do canal radicular e preparar uma matriz apropriada para tratamentos adicionais (230).

Coletivamente, estudos demonstraram que tanto a TAP quanto a DAP são eficazes contra bactérias endodônticas em altas diluições (TAP 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e DAP 75 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), o que indica que baixas concentrações de antibióticos podem ser suficientes para obter efeito antibacteriano necessário (99). Desta forma, pode ser benéfico recomendar o uso de concentrações mais baixas de pastas antibióticas para evitar o efeito desses medicamentos nas células estaminais hospedeiras (99). A proposta de uso da TAP foi introduzida especialmente para a execução do protocolo em dentes com rizogênese incompleta e polpa necrótica, largamente desenvolvido por Hoshino *et al.* (1996) (89). Os estudos revelaram resultados extremamente satisfatórios quanto a erradicação das bactérias no sistema de canais radiculares com uso da TAP (88). Porém, apesar do potencial antimicrobiano consolidado da TAP, a principal crítica relacionada a essa proposta está direcionada ao manchamento da dentina, associado à presença da minociclina (92, 93). Em vista disto, muitos estudos têm sugerido o uso da pasta dupla antibiótica (DAP), contendo metronidazol e ciprofloxacino, ou a incorporação da ampicilina para uma nova formulação da TAP. 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* (94,95,96). Em contrapartida, diante dos estudos apresentados revelando o potencial e eficácia contra diferentes microrganismos, as pastas antibióticas possuem propriedades que despertam interesse no desenvolvimento de novas propostas terapêuticas na odontologia. Entretanto, além de apresentarem uma série de benefícios, ainda possuem limitações terapêuticas no contexto endodôntico, portanto a busca pela criação de propostas terapêuticas ainda melhores e mais eficazes continuam.

No tratamento de DPIs, o papel da medicação intracanal tem sido fundamental 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, apresentando nenhum ou baixos índices de citotoxicidade (121). Em vista disto, achados científicos sugerem o uso de peptídeos como opções terapêuticas mais eficazes quando comparadas às diversas terapias já existentes. Os peptídeos de defesa do hospedeiro (PDHs) além de participarem ativamente na imunidade inata, também modulam a resposta do sistema imune para promover a eliminação de agentes patogênicos, diminuindo

efeitos deletérios do processo inflamatório (228). Hancock *et al.* (227) relatam que as funções do PDHs vão muito além de proteger o hospedeiro contra microrganismos invasores, uma vez que apresentam papéis essenciais nos eventos de sinalização durante a ativação de respostas imunes.

O potencial biotecnológico dos PDHs tem sido estudado como forma de modular resposta a infecções, patologias e regeneração de tecidos, além de possuir um amplo espectro contra microrganismos (228). Diante desta problemática, além da complexidade de encontrar uma medicação intracanal eficiente, especialmente para a revascularização pulpar, poucas alternativas têm sido descritas até o momento. As evidências científicas baseadas em críticas envolvendo as pastas antimicrobianas abrem caminhos para novas possibilidades. Logo, a proposta deste estudo é apresentar novas estratégias terapêuticas, *in vitro*, para revascularização pulpar frente a associação sinérgica composta por um peptídeo de defesa do hospedeiro, o IDR-1002 e o antibiótico ciprofloxacino, um dos componentes da pasta DAP, em culturas de células pulpares.

Diante disto, células presentes no processo de revascularização foram caracterizadas por citometria de fluxo para realização deste estudo, uma vez que este recurso permite examinar rapidamente milhares de células marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a marcadores fluorescentes com resultados sensíveis e precisos. Neste processo, cada célula é individualmente avaliada para uma variedade de características, tais como tamanho e antigenicidade (122). Após testes de imunofenotipagem, três tipos celulares, em 4ª passagem, envolvidos no contexto de revascularização foram caracterizadas: células pulpares, células do ligamento periodontal e células da papila apical, extraídas de terceiros molares hígidos com ápices abertos de pacientes com idade acima de 18 anos. As células em cultura demonstraram marcação superior a 97% para os marcadores positivos para CTMs, CD44, CD73, CD90, CD105, CD106, e inferior à 1%, para o coquetel de marcadores negativos. As células possuem receptores e moléculas de superfície que as ligam entre si, possibilitando a sua comunicação e a execução das suas funções no organismo.

Essas moléculas de superfície celular são usadas como marcadores celulares para identificação de células tronco (NIH, 2001). As células tronco mesenquimais

expressam um variado número de marcadores de superfície, sendo que não existe um marcador específico para defini-las. Com base nisso, parâmetros têm sido estabelecidos para se considerar uma população de células como células tronco, não dependendo apenas de um único marcador. Segundo a Sociedade Internacional de Terapia Celular, é necessário que as células preencham pelo menos os 3 critérios seguintes: (1) aderência ao plástico; (2) capacidade de diferenciação em osteoblastos, adipócitos e condroblastos, quando mantidas em cultura e submetidas aos específicos meios de diferenciação e, por fim; (3) expressão superior ou igual a 95% aos seguintes antígenos de superfície, considerados marcadores de CTMs, CD105, CD73 e CD90 e expressão inferior ou igual a 2% para CD34, CD45, HLA-DR, CD14, CD19, marcadores para progenitores hematopoiéticos (47). Ao analisarmos o processo de expansão celular e a presença fenotípica de marcadores característicos de CTMs (CD90, CD44, CD73, CD105 e CD106), durante o processo de caracterização observamos que existe potencial biotecnológico no uso dessas células, embora ainda não tenham sido realizados testes para diferenciação e avaliação de pluripotencialidade. Ainda não existem protocolos definidos para identificação de DPSCs, entretanto essas células expressam outros marcadores, além dos identificados no nosso estudo, incluindo marcadores presentes na medula óssea (STRO-1), bem como células tronco embrionárias (ESC/OCT4), os quais podem ser incluídos em novas pesquisas utilizando DPSCs (148). Em vista disto, após o processo de caracterização, as DPSCs foram eleitas para darem seguimento ao estudo.

Em adição, estudos prévios de Sousa *et al.* 2017 sugeriram resultados promissores em culturas de células RAW 264.7 e fibroblastos L929 em que a junção de um antimicrobiano (CIP) com um imunoprotetor (IDR-1002), se mostraram como um potencial mecanismo terapêutico para revascularização pulpar. O peptídeo IDR-1002 apresentou os melhores resultados antimicrobianos dentre os PDHs testados no estudo, além de atuar em sinergismo com CIP, contra *E. faecalis* e *S. aureus*, apresentando um perfil anti-inflamatório na presença dos antígenos e rIFN- γ . Observou-se redução de IL-6 e IL-12, em RAW 264.7, além da baixa produção de óxido nítrico, em fibroblastos L929. Desta forma, esta associação abre caminhos para novas possibilidades na endodontia. A resposta imune pode ter um papel

essencial na regeneração do tecido pulpar em DPIs, visto que envolve uma série de eventos imunomodulatórios que promovem a neoformação tecidual.

Os eventos que norteiam os eventos de regeneração e reparo do complexo dentina-polpa envolvem migração celular, proliferação e viabilidade celular (233). Desta forma, este trabalho propôs a análise destes 3 parâmetros em culturas primárias de células pulpares na 4ª passagem. O objetivo foi avaliar separadamente em grupos distintos a exposição destas células ao CIP, a DAP, ao IDR-1002 e ao IDR-1002 juntamente com CIP, nos períodos experimentais de 24 e 48h.

O parâmetro inicialmente observado foi a capacidade migratória das células pulpares *in vitro*, pelo método de *scratch*. Utilizou-se como controle, cultura de células pulpares em meio DMEM, na ausência de SBF, afim de não ocorrer nenhuma interferência no processo de migração celular (235). Os demais grupos foram expostos ao CIP, DAP, IDR-1002 e a associação sinérgica proposta, também na ausência de SBF. Observou-se que a capacidade migratória apresentou-se aumentada nos grupos expostos ao peptídeo IDR-1002 e à combinação sinérgica, em ambos os tempos experimentais. Embora, ainda não existam estudos da análise da capacidade migratória de células pulpares humanas na presença do peptídeo IDR-1002, as atividades migratórias descritas sobre este peptídeo estão relacionadas ao recrutamento de neutrófilos e quimiotaxia de monócitos diante de estresse celular, liberando espécies reativas de oxigênio para ativação do processo de reparo em fibroblastos L929 (234).

A partir dos resultados obtidos pela análise da capacidade migratória, o passo seguinte foi a avaliação do potencial proliferativo *in vitro* dessas células, na presença do CIP, do peptídeo e da associação CIP e peptídeo. A intenção foi verificar se durante o processo migratório, além de uma migração celular também seria observada proliferação das mesmas células. A técnica de azul de tripan foi escolhida para análise, nos mesmos tempos experimentais do ensaio de migração. Esta técnica se baseia na inabilidade da bomba de sódio e potássio das células mortas, que se apresentam azuis ao microscópio, em expulsar o azul de tripan do seu interior (276). Foi observado uma ação proliferativa das células pulpares *in vitro* nos grupos expostos ao peptídeo IDR-1002 e à combinação sinérgica, em ambos os tempos experimentais. Desta forma, foi observado que na presença do IDR-1002 e da combinação sinérgica, além de uma ação migratória, as células pulpares também

estão se proliferando. Não foram encontrados trabalhos prévios sobre o potencial proliferativo deste peptídeo, visto que os estudos envolvendo esta biomolécula estão principalmente relacionados com a ativação do sistema imune diante processos infecciosos (336).

Diante deste contexto, passou-se a analisar o efeito do CIP, IDR-1002 e da associação sinérgica CIP e IDR-1002, na produção de mediadores inflamatórios e antiinflamatórios. Para tanto, inicialmente foi proposto o desenho de diferentes situações experimentais que remetesse diferentes condições: uma condição clássicas de resposta a infecção (LPS como estímulo celular); uma condição de resposta imunoinflamatória (LPS e IFN- γ como estímulo celular); uma condição de resposta a infecção antígeno específica (HK-*E. faecalis* ou HK-*S. aureus* como estímulo celular); e uma condição de resposta imunoinflamatória antígeno específica (HK-*E. faecalis* com IFN- γ e HK-*S. aureus* com IFN- γ como estímulo celular). O *E. faecalis* foi selecionado para este estudo, uma vez que apresenta-se de forma prevalente em infecções endodônticas persistentes e especialmente, quadros em necrose de DPLs (237,238). O *E. faecalis* ainda possui certos fatores de virulência, incluindo enzimas líticas, citolisina, substância de agregação e ácido lipotecóico (242). Além disso, esta bactéria foi encontrada no SCR de DPLs, mesmo após a utilização de TAP e de uma associação entre Ca(OH)₂ e clorexidina 2% (237). Por outro lado, o gênero *Enterococci* pode sobreviver em diversas condições adversas incluindo pH alcalino extremo e em altas concentrações de sal (239). Este gênero pode resistir a sais biliares, detergentes, metais pesados, etanol e sal azida (239), além de ser encontrada em quadros de pulpíte (243). 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 DPLs (246). Desta forma, ambos os microrganismos foram escolhidos para serem utilizados como antígenos mortos pelo calor nas condições experimentais de resposta antígeno específica.

Como passo inicial para a avaliação da produção dos mediadores inflamatórios e antiinflamatórios, analisou-se a viabilidade celular pelo ensaio de MTT nestas diversas condições experimentais. Notou-se que a viabilidade celular não foi alterada em nenhuma das situações propostas. Assim, estas situações experimentais foram escolhidas para dar seguimento aos ensaios de

imunomodulação, pelo método de qPCR em tempo real, a fim de verificar a expressão de genes indicativos de processos inflamatórios e antiinflamatórios.

Em função da ausência de diferenças nas respostas anteriormente analisadas entre os grupos CIP e DAP, o grupo contendo apenas DAP foi removido dos ensaios seguintes. Os PDHs IDRs são descritos na literatura como biomoléculas responsáveis por diversas ações antimicrobianas e imunomoduladoras e possivelmente, podem contribuir para o reparo tecidual (247,248,249). Dentre estes, o IDR-1002 tem sido considerado um potencial imunomodulador biocompatível (251). 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 (252). 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 (253). A associação do IDR-1002 ($32 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com o CIP ($0,015 \mu\text{g.mL}^{-1}$) apresentada por Sousa *et al.* também não foi capaz de reduzir a viabilidade celular tanto de macrófagos RAW 264.7, quanto fibroblastos L929 (234). Resultados semelhantes, também foram observados com os dados de viabilidade apresentados neste trabalho, em que a proposta sinérgica também não foi capaz de reduzir a viabilidade celular em culturas de DPSCs. Os resultados de ausência de toxicidade *in vitro*, permitiram que fossem realizadas as análises seguintes com a avaliação dos mediadores inflamatórios e antiinflamatórios por qPCR, a fim de melhor compreender os processos imunomodulatórios por meio de marcadores genéticos de citocinas envolvidas no processo de revascularização pulpar.

A resposta imune inata promove uma ação contra patógenos presentes no SCRs, envolvendo a atração de macrófagos teciduais ativados até o local da inflamação, para o combate dos microrganismos (254). Por outro lado, os fibroblastos, se apresentam como as células mais abundantes na região apical e podem estar diretamente envolvidas com os eventos de reconstrução tecidual após a revascularização pulpar (255). Os principais eventos relatados com a presença de antígenos no SCR estão relacionados as mudanças no padrão de resposta e produção de mediadores por essas células (256). Sabe-se que as DPSCs apresentam um papel fundamental no processo de revascularização tecidual e precisam desencadear uma série de eventos imunomodulatórios para o reestabelecimento tecidual (254). Os genes inflamatórios (TNFRSF-1, IL-8, IL-1 β e IL-6) e antiinflamatório (IL-10) foram escolhidos em função da busca do melhor

entendimento dos processos imunomodulatórios durante o processo de revascularização, buscando favorecer os eventos regenerativos do complexo pulpar, em diferentes fases do processo imuno-inflamatório.

Este é o primeiro trabalho que avalia o potencial imunomodulatório do peptídeo IDR-1002 sob condições inflamatórias em DPSCs. Até então, alguns estudos haviam relatado o papel pró-inflamatório de TAP através de achados histológicos (260,261). Pesquisadores inseriram tubos de polietileno contendo DAP 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 (261). 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).

Os processos imunomodulatórios relatados por meio da atuação de antígenos no SCR estão relacionados as mudanças no padrão de resposta e produção de citocinas inflamatórias por essas células (256). O TNFRSF-1 é responsável por ativar os receptores das proteínas sinalizadoras do fator de necrose tumoral (257). A ligação das proteínas TNF e TNFR1 permite que a célula ative vias inflamatórias e inicie o processo de apoptose celular (257). Portanto, a análise de expressão deste gene é essencial para melhor compreender os processos de sinalização e ativação das diversas condições inflamatórias do processo de revascularização pulpar. Neste estudo, observou-se que de uma forma geral, a expressão de TNFRSF-1 foi diminuída na presença do peptídeo e da associação do peptídeo com o CIP. Resultado semelhante foi observado em estudos com o peptídeo IDR-1002, na concentração de 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Observou-se aumento na expressão 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 (277). Em outro 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- κB e ativação das vias de sinalização p38, ERK1/2-MSK1 (253).

A expressão do gene IL-8 também foi avaliada nas mesmas situações experimentais. Este gene codifica proteínas reguladoras CXC, as quais participam do processo de recrutamento de mediadores inflamatórios e ativação de processos de angiogênese (258). Observou-se uma redução dos níveis da expressão do gene IL-8 nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica, sobretudo quando estimulados com os antígenos específicos. Estudos prévios revelam que através de seu potencial imunomodulador, o IDR-1002 pode contribuir para a proteção do organismo contra infecções por *S. aureus* por meio do recrutamento de leucócitos e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias (258,262).

Uma vez que a produção de IL-1 β codifica a produção de citocinas pró-inflamatórias envolvidas nos processos de diferenciação, proliferação e apoptose celular (263), a análise do gene IL-1 β também foi inserida neste estudo. Esse gene e outros oito genes da família IL-1 formam um agrupamento de genes de citocinas no cromossomo 2, os quais são os principais mediadores da resposta imune, uma vez que também estão envolvidos em vários processos fisiopatológicos (263). Este gene codifica proteínas que modulam a síntese de prostaglandinas, influxo e ativação de neutrófilos, ativação de células T e produção de citocinas, ativação de células B e produção de anticorpos e proliferação de fibroblastos, com produção de colágeno (263). Além disso, está envolvido nos protocolos de diferenciação de células tronco para a derivação de células sanguíneas (263). Desta forma, a análise da expressão desse gene pode favorecer o melhor entendimento de todos estes processos. Observou-se uma redução nos níveis de expressão do gene inflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica em várias das situações experimentais propostas. 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 (252). No entanto, observou-se aumento na expressão de IL-1 β na presença do IDR-1002 com e sem CIP, na condição experimental contendo estímulo apenas do rIFN- γ . A molécula rIFN- γ , pode estimular um perfil de macrófagos M2 quando ativada sob culturas celulares imaturas, podendo gerar uma resposta pró-inflamatória exacerbada (264).

Ainda buscando compreender melhor o perfil inflamatório do peptídeo IDR-1002 em culturas de DPSCs *in vitro*, observou-se a expressão do gene IL-6. Esse

gene ativa células T e macrófagos durante a resposta da fase aguda após lesão ou trauma, apresentando, portanto, propriedades pró e anti-inflamatórias. Evidências científicas demonstram que a IL-6 exacerba a resposta imune pulpar, uma vez que está envolvida na vasodilatação pulpar e permeabilidade vascular (265). Ademais, a produção de IL-6 pode estar associada ao edema pulpar pela ação de bactérias Gram-positivas infiltradas nos túbulos dentinários (266). Quando se trata do reparo tecidual, a IL-6 parece ter um papel fundamental nos processos de diferenciação celular (267). A produção de IL-6 aumenta a diferenciação osteogênica e adiposa, além de estar relacionada com a diferenciação condrogênica de células tronco pulpares (268). 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 (269). 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 (270). Neste estudo, observou-se que houve redução dos níveis de expressão do gene inflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica. Verificando-se que quando estimuladas com rIFN- γ , o grupo exposto ao IDR-1002 com rIFN- γ reduziu a expressão de IL-6. A IL-6 pode desempenhar um papel 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 (271,272). Nos ensaios estimulados com LPS verificou-se redução dos níveis de expressão do gene IL-6, nos grupos expostos ao peptídeo com CIP. Observou-se que o padrão de redução de expressão gênica de IL-6 manteve-se nos ensaios estimulados com os antígenos microbianos *HK-E. faecalis* e de *HK-S. aureus* sem rIFN- γ , para os grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica. Nos resultados de Sousa *et al.* (2017), o IDR-1002 foi responsável por reduzir IL-6 (na ausência de estímulos) em fibroblastos L929.

Analisando o perfil anti-inflamatório do peptídeo IDR-1002 e da associação sinérgica em culturas de DPSCs *in vitro*, observou-se a expressão do gene IL-10. A IL-10 é uma das principais citocinas anti-inflamatórias produzidas por quase todos os leucócitos, possuindo efeitos amplamente supressivos em vários tipos de células imunológicas (275). Durante infecções bacterianas, a IL-10 modula a resposta imune

pró-inflamatória, permitindo a eliminação do patógeno com redução do dano tecidual (275). Esse gene regula a resposta imune de células do sistema imunológico, exercendo função anti-inflamatória controlando a ruptura excessiva de vias inflamatórias (274). Tem como alvo células apresentadoras de antígeno, como macrófagos e monócitos e inibe a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (274). Neste trabalho, observou-se uma redução dos níveis de expressão do gene antiinflamatório nos grupos expostos ao peptídeo e à combinação sinérgica, em várias das condições experimentais analisadas. Em adição, a inalteração de sua expressão também foi observada em outras poucas condições testadas. No estudo de Sousa *et al.* (2017), também foi observada redução da produção dessa citocina, quando exposta à antígenos de *S. aureus* juntamente com rIFN- γ . O grupo contendo CIP (0,015 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), em que reduziu a produção desta citocina em relação aos grupos contendo LPS com rIFN- γ e RAW estimuladas com HK-*S. aureus* e rIFN- γ). Ademais, verificou-se redução na expressão do gene IL-10, mas em valores menores que no grupo controle, na presença da associação sinérgica em comparação com os respectivos controles, nas situações experimentais de estímulo com HK-*E. faecalis* e HK-*E. faecalis* com rIFN- γ .

Este estudo engloba resultados de experimentos *in vitro* e desta forma, alguns pontos podem se distanciar da realidade dos processos imunomodulatórios na cavidade oral. No entanto, diante dos diversos questionamentos sobre as abordagens terapêuticas nos processos de revascularização pulpar, os dados aqui apresentados surgem como mais uma análise do potencial da associação sinérgica entre o CIP e o IDR-1002. Neste estudo, utilizando as DPSCs que promovem uma adição aos conhecimentos adquiridos ao trabalho de Sousa *et al.* (2017). Compreender como DPSCs podem reagir na presença do CIP, IDR-1002 e da associação CIP e IDR-1002 pode contribuir para o entendimento sobre como essas biomoléculas atuam sobre bactérias comumente encontradas no SCR, além de serem potenciais terapêuticos para revascularização pulpar. Como perspectivas aos resultados deste trabalho, ainda serão realizados ensaios de avaliação da produção de tecido mineralizado e análise da expressão de DSPP nas culturas pulpares na presença do peptídeo e da associação sinérgica. Em adição, outros estudos do

grupo de pesquisa estão em andamento com a incorporação desta associação em sistemas de *drug delivery* para revascularização pulpar.

6 CONCLUSÃO

- As células isoladas da polpa dentária apresentam potencial regenerativo, uma vez que em cultura demonstraram marcação superior a 97% para os marcadores positivos para CTMs.
- A exposição das culturas celulares ao peptídeo IDR-1002 e à combinação sinérgica em ambos os tempos experimentais favoreceu a migração celular assim como potencializou a proliferação destas células.
- Não houve alteração da viabilidade celular nos grupos expostos ao peptídeo IDR-1002 e à combinação sinérgica, assim como não apresentou perfil citotóxico nos tempos experimentais de 24 e 48 horas.
- Observou-se que tanto o grupo exposto ao IDR-1002, quanto o grupo exposto à combinação sinérgica, apresentaram diminuição na expressão de interleucinas inflamatórias (TNFRSF-1, IL-8, IL-1 β e IL-6), mesmo nas situações envolvendo resposta imune.
- Observou-se que tanto o grupo exposto ao IDR-1002, quanto o grupo exposto à combinação sinérgica, apresentaram diminuição na expressão da interleucina antiinflamatória IL-10, mesmo nas situações envolvendo resposta imune.

A associação entre o CIP e o peptídeo IDR-1002 apresentou um potencial imunomodulatório mais favorável, quando comparado ao CIP. Apesar de ser um trabalho com resultados pontuais, estes surgem em adição a resultados prévios, aumentando o potencial desta associação para aplicações biotecnológicas no contexto de revascularização/regeneração pulpar. Desta forma, justificando a necessidade de investimento em novas frentes de pesquisa desta associação para o futuro.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Yu, T., A. A. Volponi, et al. (2015). "Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration." *Curr Top Dev Biol* 115: 187-212
2. Glasstone S. The development of halved tooth germs; a study in experimental embryology. *Journal of anatomy*. 1952;86(1):12-5.
3. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clinics in dermatology*. 2000;18(5):499-511.
4. Applebaum E. Oral histology and embryology. I. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology. 1951;4(8):1057-69.
5. Applebaum E. Oral histology and embryology. II. Oral surgery, oral medicine, and oral pathology. 1951;4(9):1185-99.
6. 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.
7. 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.
- 8 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.
- 9 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.
10. Rodd HD, Boissonade FM. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *Journal of anatomy*. 2003;202(2):195-203.
11. 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.
12. 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.

13. 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.
14. 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.
15. Lesot H. Odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Journal of dental research*. 2000;79(9):1640-4.
16. 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.
17. Dhillon H, Kaushik M, Sharma R. 2016. Regenerative endodontics—Creating new horizons. *J Biomed Mater Res Part B* 2016:104B:676–685.
18. 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.
19. Nikiforuk G. Post-eruptive effects of nutrition on teeth. *Journal of dental research*. 1970;49(6):1252-62.
20. 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.
21. 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.
22. Vacek Z, Plackova A, Bures H. Electron microscopy of innervation of human dental pulp. *Folia morphologica*. 1969;17(2):97-101.
23. Harris R, Griffin CJ. Fine structure of nerve endings in the human dental pulp. *Archives of oral biology*. 1968;13(7):773-8.
24. Abd-Elmeguid A, Yu DC. Dental pulp neurophysiology: part 1. Clinical and diagnostic implications. *Journal*. 2009;75(1):55-9.

25. 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.
26. 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.
27. Huang, G. T., Gronthos, S., & Shi, S. (2009). Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine. *Journal of Dental Research*, 88, 792–806.
28. Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Gehron, R. P., & Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 97, 13625–13630.
29. Tomoatsu K., Bin G., Phyo P., Su Y., Hiroki M., Zar Z, Takashi O. Dental Pulp Tissue Engineering Using Mesenchymal Stem Cells: a Review with a Protocol. *Stem Cell Reviews and Reports*. Department of Pulp Biology and Endodontics, Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University (TMDU), Yushima 1-5-45, 113-8549.
30. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Tsiptsoglou A, Garefis P, Koidis P, Geurtsen W. Comparative analysis of in vitro osteo/ odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol* 2011;56:709–721.
31. P. Montero-Miralles¹, J. Martín-González¹, O. Alonso-Ezpeleta³, M.C. Jiménez-Sánchez¹, E. Velasco-Ortega², J. J. Segura-Egea¹. Effective and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontics procedures: a review. *International Endodontic Journal*. 51. 10.1111/iej.12913.
32. 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
33. Lin LM, Ricucci D, Huang GT-J. Regeneration of the dentine–pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. *International Endodontic Journal*, (2013), 35;01-12.

34. Shimizu E, Jong G, Partiridge N, et al. (2012) Histological observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/revitalization procedure. *Journal of Endodontics* 38, 1293–7.
35. Huang GT-J, Lin LM (2008) Letter to the editor: comments on the use of the term “revascularization”. *Journal of Endodontics* 34, 511.
36. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A (2011) 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* 17, 133–8.
37. Durand SH, Flacher V, Romeas A, et al. (2006) Lipoteichoic acid increases TLR and functional chemokine expression. while reducing dentin formation in in vitro differentiated human odontoblasts. *Journal of Immunology* 176, 2880–7
38. Smith AJ (2012) Formation and repair of dentin in the adult. In: Hargreaves KM, Goodis HE, Tay FR, eds. *Seltzer and Bender’s Dental Pulp*, 2nd edn. Chicago, MI, USA: Quintessence, pp. 27–46.
39. Lesot H, Begue-Kim C, Kubler MD, at. (1993) Experimental induction of odontoblast differentiation and stimulation during reparative processes. *Cell Materials* 3, 201–17.
40. Mason C; Dunnill P. A brief definition of regenerative medicine. *Regen. Med.* 3(1), 1–5 (2008).
41. MASON, C.; MANZOTTI, E. Regen: the industry responsible for cell-based therapies. *Regen. Med.* 4(6), 783–785 (2009).
42. NAKASHIMA, M.; REDDI, A.H. The application of bone morphogenetic proteins to dental tissue engineering. *Nature Biotech* 2003;21:1025–32
43. DHILLON, H.; KAUSHIK, M.; SHARMA, R. 2016. Regenerative endodontics—Creating new horizons. *J Biomed Mater Res Part B* 2016:104B:676–685
44. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: away forward. *J Am Dent Assoc* 2016;147:372–80.

45. Rodd H, Boissonade F. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *J Anat.* 2003 Feb; 202(2): 195–203.
46. Tatullo, Marco et al. Strategic Tools in Regenerative and Translational Dentistry. *International Journal of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1879-13, 16 abr. 2019. MDPI AG.
47. Eba H, et al. The Anti-Inflammatory Effects of Matrix Metalloproteinase-3 on Irreversible Pulpitis of Mature Erupted Teeth. *PLoS One.* 2012;7(12):e52523.
48. Beltrame AP, et al. Bacterial intensity and localization in primary molars with caries disease. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012 Jan-Mar;30(1):32-40.
49. Boyle M, et al. Chronic Inflammation and Angiogenic Signaling Axis Impairs Differentiation of Dental-Pulp Stem Cells. *PLoS One.* 2014 Nov 26;9(11):e113419
50. Matsushita K, et al. Lipopolysaccharide Enhances the Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Human Pulp Cells in Culture. *Infect Immun.* 1999 Apr; 67(4): 1633–1639.
51. Zhang W, Yelick P. Vital Pulp Therapy—Current Progress of Dental Pulp Regeneration and Revascularization. *Int J Dent.* 2010 Apr; 2010: 856087.
52. Ravindran S, George A. Biomimetic extracellular matrix mediated somatic stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. *Front Physiol.* 2015 Apr; 6: 118.
53. W. Zhang and P. C. Yelick, "Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization," *International Journal of Dentistry*, vol. 2010, Article ID 856087, 9 pages, 2010.
54. R. Vijayaraghavan, V. M. Mathian, A. M. Sundaram, R. Karunakaran, and S. Vinodh, "Triple antibiotic paste in root canal therapy," *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, vol. 4, supplement 2, pp. 230–233, 2012.
55. Yu, T., A. A. Volponi, et al. (2015). "Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration." *Curr Top Dev Biol* 115: 187-212.
56. Yu, T., A. A. Volponi, et al. (2015). "Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration." *Curr Top Dev Biol* 115: 187-212.

57. Simon, S., Smith, A. J., Berdal, A., Lumley, P. J., & Cooper, P. R. (2010). The MAP kinase pathway is involved in odontoblast stimulation via p38 phosphorylation. *Journal of Endodontics*, 36, 256–259.
58. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A (2011) 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* 17, 133–8.
59. Kim JY, Xin X, Moiola EK, et al. (2010) Regeneration of dental- pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Engineering: Part A* 16, 3023–31.
60. Nanci A (2007) Ten Cate's Oral Biology. Development, Structure, and Function, 7th edn. St. Louis, MO, USA: Mosby.
61. 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.
62. 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.
63. Diogenes A, Ruparel NB. Regenerative Endodontic Procedures: Clinical Outcomes. *Dental clinics of North America*. 2017;61(1):111-25.
64. 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.
65. Kreter F. [Endodontic surgery in immature tooth roots]. *Zahnärztliche Praxis*. 1975;26(4):78-80.
66. Chugal N, Mallya SM, Kahler B, Lin LM. Endodontic Treatment Outcomes. *Dental clinics of North America*. 2017;61(1):59-80.
67. Shabahang S. Treatment options: apexogenesis and apexification. *Journal of endodontics*. 2013;39(3 Suppl):S26-9.
68. Breillat J. [Apexification. Apexogenesis]. *Revue d'odonto-stomatologie*. 1990;19(6):483-92.

69. STAFFOLI, Simone et al. Regenerative Endodontic Procedures Using Contemporary Endodontic Materials. *Materials* 2019, 12, 908; Doi:10.3390/ma12060908. Department of Endodontics, Catholic University Of Sacred Heart, 00100 Rome, Italy;, p. 1-28. 13 mar. 2019.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *Journal of the American Dental Association*. 1966;72(1):87-93.
74. Heithersay GS. Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1970;29(4):620-30.
75. Steiner JC, Van Hassel HJ. Experimental root apexification in primates. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;31(3):409-15.
76. Dylewski JJ. Apical closure of nonvital teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;32(1):82-9.
77. 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.
78. 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.
79. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2003;11(4):269-82.

80. 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.
81. Dhillon H, Kaushik M, Sharma R. 2016. Regenerative endodontics—Creating new horizons. *J Biomed Mater Res Part B* 2016;104B:676–685.
82. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S52-7.
83. 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.
84. P. Montero-Miralles¹, J. Martín-González¹, O. Alonso-Ezpeleta³, M.C. Jiménez-Sánchez¹, E.Velasco-Ortega², J. J. Segura-Egea¹. Effectives and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontics procedures: a review. *International Endodontic Journal*. 51. 10.1111/iej.12913.
85. 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
- 86 Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp Regeneration: Current Approaches and Future Challenges. *Frontiers in physiology*. 2016;7:58.
- 87 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.
88. Parhizkar A, Nojehdehian H, Asgary S. Triple antibiotic paste: momentous roles and applications in endodontics: a review. *Restor Dent Endod*. 2018 Aug;43(3):e28 pISSN 2234-7658·eISSN 2234-7666.
89. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. In vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125-130.

90. 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. *Int Endod J* 1996;29:118-124.
91. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008;34 (Supplement):S51-S56.
- 92 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.
93. Mohammadi Z. Strategies to manage permanent non-vital teeth with open apices: a clinical update. *International dental journal*. 2011;61(1):25-30.
94. 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.
95. Adl A, Hamed 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.
96. 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.
97. 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.
98. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125–30.
99. Sabrah A.H.A., Yassen G.H., Gregory R.L. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *enterococcus faecalis* and *porphyromonas gingivalis*. *Journal of Endodontics*, (2013) 39 (11) , pp. 1385-1389.

100. 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.
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. 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.
106. 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.
107. Kuratate M, Yoshida K, Shigetani Y, Yoshida 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.
108. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *Journal of endodontics*. 2006;32(5):425-8.
114. 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. *Biotechnol Adv* 2015;33(1):203-213.
115. Chellat MF, Raguž L, Riedl R. Targeting Antibiotic Resistance. Vol. 55, *Angewandte Chemie - International Edition*. 2016. p. 6600–26.

116. Karaiskos I, Giamarellou H. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin Pharmacother*. 2014;15(10):1351–70.
117. Mulder KCL, Lima LA, Miranda VJ, Dias SC, Franco OL. Current scenario of peptide-based drugs: the key roles of cationic antitumor and antiviral peptides. *Front Microbiol*. 2013;4(October):1–23.
118. Afacan NJ, Yeung AT, Pena OM, Hancock RE. Therapeutic potential of host defense peptides in antibiotic-resistant infections. *Curr Pharm Des* 2012;18(6):807-819.
119. Wang G, Li X, Wang Z. APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res* 2016;44(D1):D1087-1093.
120. Wang G, Mishra B, Epanand RF, Epanand RM. High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments. *Biochim Biophys Acta* 2014;1838(9):2160-2172.
121. Lopez-Otin C, Matrisian LM. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007;7(10):800-808.
122. Diehnelt CW. Peptide array based discovery of synthetic antimicrobial peptides. *Front Microbiol* 2013;4:402.
123. Marin-Luevano P, Trujillo V, Rodriguez-Carlos A, Gonzalez-Curiel I, Enciso-Moreno JA, Hancock REW, et al. Induction by innate defence regulator peptide 1018 of pro-angiogenic molecules and endothelial cell migration in a high glucose environment. *Peptides* 2018;101:135-144.
124. Hahn CL, Liewehr FR. Innate immune responses of the dental pulp to caries. *J Endod* 2007;33(6):643-651.
125. Widbiller M, Eidt A, Lindner SR, Hiller KA, Schweikl H, Buchalla W, et al. Dentine matrix proteins: isolation and effects on human pulp cells. *Int Endod J* 2017.
126. Choi KY, Chow LN, Mookherjee N. Cationic host defence peptides: multifaceted role in immune modulation and inflammation. *J Innate Immun* 2012;4(4):361-370.
127. Hancock RE, Haney EF, Gill EE. The immunology of host defence peptides: beyond antimicrobial activity. *Nat Rev Immunol* 2016;16(5):321-334.
128. 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*. *Dev Comp Immunol* 2017;69:1-11.

129. Wimley WC. Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chem Biol* 2010;5(10):905-917.

130. da Silva BR, de Freitas VA, Nascimento-Neto LG, Carneiro VA, Arruda FV, de Aguiar AS, et al. Antimicrobial peptide control of pathogenic microorganisms of the oral cavity: a review of the literature. *Peptides* 2012;36(2):315-321.

131. Tong Z, Ni L, Ling J. Antibacterial peptide nisin: a potential role in the inhibition of oral pathogenic bacteria. *Peptides* 2014;60:32-40.

132. Lima SMF, Freire MS, Gomes ALO, Cantuaria APC, Dutra FRP, Magalhaes BS, et al. Antimicrobial and immunomodulatory activity of host defense peptides, clavanins and LL-37, in vitro: An endodontic perspective. *Peptides* 2017;95:16-24

133. Wang Y, Fan Y, Zhou Z, Tu H, Ren Q, Wang X, et al. De novo synthetic short antimicrobial peptides against cariogenic bacteria. *Arch Oral Biol* 2017;80:41-50.

134. Siqueira JF, Jr., Rocas IN. Bacterial pathogenesis and mediators in apical periodontitis. *Braz Dent J* 2007;18(4):267-280.

135. Stashenko P, Teles R, D'Souza R. Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(4):498-521.

136. Marton IJ, Kiss C. Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol* 2000;15(3):139-150.

137. Winfred SB, Meiyazagan G, Panda JJ, Nagendrababu V, Deivanayagam K, Chauhan VS, et al. Antimicrobial activity of cationic peptides in endodontic procedures. *Eur J Dent* 2014;8(2):254-260.

138. Wang D, Shen Y, Ma J, Hancock REW, Haapasalo M. Antibiofilm Effect of D-enantiomeric Peptide Alone and Combined with EDTA In Vitro. *J Endod* 2017;43(11):1862-1867.

139. Dantas E, Lima SMF, Cantuaria APC, Amorim IA, Almeida JA, Cunha TF, et al. Synergistic activity of chlorhexidine and synoeca-MP peptide against *Pseudomonas aeruginosa*. *J Cell Physiol* 2019.

140. 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. *J Leukoc Biol* 2013;94(1):159-170.
141. Rivas-Santiago B, Castañeda-Delgado JE, Rivas Santiago CE, Waldbrook M, González-Curiel I, et al. (2013) Ability of Innate Defence Regulator Peptides IDR-1002, IDR-HH2 and IDR-1018 to Protect against *Mycobacterium tuberculosis* Infections in Animal Models. *PLoS ONE* 8(3): e59119. doi:10.1371/journal.pone.0059119
142. 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.
143. 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.
144. 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.
145. 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.
146. 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.
147. Laurence Madera, Robert E.W.Hancock. Anti-infective peptide IDR-1002 augments monocyte chemotaxis towards CCR5 chemokines. Centre for microbial diseases and immunity research. Department of Microbiology and Immunology, Science direct Biochemical and Biophysical research journal.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.07464(3):870.

148. CHALISSERRY, Elna Paul et al. Therapeutic potential of dental stem cells. *Journal Of Tissue Engineering*, [s.l.], v. 8, p.1-17, jan. 2017. SAGE Publications. <http://dx.doi.org/10.1177/2041731417702531>.
149. Matsubara K, Matsushita Y, Sakai K, et al. Secreted ectodomain of sialic acid-binding Ig-like lectin-9 and monocyte chemoattractant protein-1 promote recovery after rat spinal cord injury by altering macrophage polarity. *J Neurosci* 2015; 35(6): 2452–2464.
150. Yamaguchi S, Shibata R, Yamamoto N, et al. Dental pulp-derived stem cell conditioned medium reduces cardiac injury following ischemia-reperfusion. *Sci Rep* 2015; 5: 16295.
151. 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.
152. Sousa, MGC. Avaliação de peptídeos antimicrobianos e imunomoduladores: novas estratégias biotecnológicas para o preparo do dente para revascularização pulpar. Departamento de Ciências da Saúde- Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS). Dissertação de Mestrado/PPGCS. Brasília, Brasil; p.1-198;2017.
153. Diogenes A, Ruparel NB, Shiloah Y, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: away forward. *J Am Dent Assoc* 2016;147:372–80.
154. Rodd H, Boissonade F. Immunocytochemical investigation of neurovascular relationships in human tooth pulp. *J Anat*. 2003 Feb; 202(2): 195–203.
155. Tatullo, Marco et al. Strategic Tools in Regenerative and Translational Dentistry. *International Journal Of Molecular Sciences*, [s.l.], v. 20, n. 8, p.1879-13, 16 abr. 2019. MDPI AG.
156. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement Dominici, M. et al. *Cytotherapy*, Volume 8, Issue 4, 315 – 317.

157. Beltrame AP, *et al.* Bacterial intensity and localization in primary molars with caries disease. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2012 Jan-Mar;30(1):32-40.
158. Boyle M, *et al.* Chronic Inflammation and Angiogenic Signaling Axis Impairs Differentiation of Dental-Pulp Stem Cells. *PLoS One.* 2014 Nov 26;9(11):e113419
159. Matsushita K, *et al.* Lipopolysaccharide Enhances the Production of Vascular Endothelial Growth Factor by Human Pulp Cells in Culture. *Infect Immun.* 1999 Apr; 67(4): 1633–1639.
160. Zhang W, Yelick P. Vital Pulp Therapy—Current Progress of Dental Pulp Regeneration and Revascularization. *Int J Dent.* 2010 Apr; 2010: 856087.
161. Ravindran S, George A. Biomimetic extracellular matrix mediated somatic stem cell differentiation: applications in dental pulp tissue regeneration. *Front Physiol.* 2015 Apr; 6: 118.
162. W. Zhang and P. C. Yelick, "Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization," *International Journal of Dentistry*, vol. 2010, Article ID 856087, 9 pages, 2010.
163. R. Vijayaraghavan, V. M. Mathian, A. M. Sundaram, R. Karunakaran, and S. Vinodh, "Triple antibiotic paste in root canal therapy," *Journal of Pharmacy And Bioallied Sciences*, vol. 4, supplement 2, pp. 230–233, 2012.
164. Yu, T., A. A. Volponi, *et al.* (2015). "Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration." *Curr Top Dev Biol* 115: 187-212
165. Yu, T., A. A. Volponi, *et al.* (2015). "Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration." *Curr Top Dev Biol* 115: 187-212.
166. Simon, S., Smith, A. J., Berdal, A., Lumley, P. J., & Cooper, P. R. (2010). The MAP kinase pathway is involved in odontoblast stimulation via p38 phosphorylation. *Journal of Endodontics*, 36, 256–259.
167. Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A (2011) 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* 17, 133–8.

168. Kim JY, Xin X, Muioli EK, et al. (2010) Regeneration of dental- pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. *Tissue Engineering: Part A* 16, 3023–31.
169. Nanci A (2007) *Ten Cate's Oral Biology. Development, Structure, and Function*, 7th edn. St. Louis, MO, USA: Mosby.
170. 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.
171. 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.
172. Diogenes A, Ruparel NB. Regenerative Endodontic Procedures: Clinical Outcomes. *Dental clinics of North America*. 2017;61(1):111-25.
173. 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.
174. Kreter F. [Endodontic surgery in immature tooth roots]. *Zahnärztliche Praxis*. 1975;26(4):78-80.
175. Chugal N, Mallya SM, Kahler B, Lin LM. Endodontic Treatment Outcomes. *Dental clinics of North America*. 2017;61(1):59-80.
176. Shabahang S. Treatment options: apexogenesis and apexification. *Journal of endodontics*. 2013;39(3 Suppl):S26-9.
177. Breillat J. [Apexification. Apexogenesis]. *Revue d'odonto-stomatologie*. 1990;19(6):483-92.
178. STAFFOLI, Simone et al. Regenerative Endodontic Procedures Using Contemporary Endodontic Materials. *Materials* 2019, 12, 908; Doi:10.3390/ma12060908. Department of Endodontics, Catholic University of Sacred Heart, 00100 Rome, Italy; p. 1-28. 13 mar. 2019.
179. 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.

180. 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.
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. Frank AL. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *Journal of the American Dental Association*. 1966;72(1):87-93.
183. Heithersay GS. Stimulation of root formation in incompletely developed pulpless teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1970;29(4):620-30.
184. Steiner JC, Van Hassel HJ. Experimental root apexification in primates. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;31(3):409-15.
185. Dylewski JJ. Apical closure of nonvital teeth. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 1971;32(1):82-9.
186. 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.
187. Heithersay GS. Calcium hydroxide in the treatment of pulpless teeth with associated pathology. *Journal of the British Endodontic Society*. 1975;8(2):74-93.
188. 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.
189. Estrela C, Holland R. Calcium hydroxide: study based on scientific evidences. *Journal of applied oral science : revista FOB*. 2003;11(4):269-82.
190. 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.
191. Dhillon H, Kaushik M, Sharma R. 2016. Regenerative endodontics—Creating new horizons. *J Biomed Mater Res Part B* 2016;104B:676–685.
192. Diogenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of endodontics*. 2014;40(4 Suppl):S52-7.

193. 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.
194. P. Montero-Miralles, J. Martín-González, O. Alonso-Ezpeleta, M.C. Jiménez-Sánchez, E. Velasco-Ortega, J. J. Segura-Egea. Effectiveness and clinical implications of the use of topical antibiotics in regenerative endodontics procedures: a review. *International Endodontic Journal*. 51. 10.1111/iej.12913.
195. 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.
196. Yang J, Yuan G, Chen Z. Pulp Regeneration: Current Approaches and Future Challenges. *Frontiers in physiology*. 2016;7:58.
197. 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.
198. Parhizkar A, Nojehdehian H, Asgary S. Triple antibiotic paste: momentous roles and applications in endodontics: a review. *Restor Dent Endod*. 2018 Aug;43(3):e28 pISSN 2234-7658·eISSN 2234-7666.
199. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. In vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125-130.
200. 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. *Int Endod J* 1996;29:118-124.
201. Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008;34 (Supplement):S51-S56.

202. 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.
203. Mohammadi Z. Strategies to manage permanent non-vital teeth with open apices: a clinical update. *International dental journal*. 2011;61(1):25-30.
204. 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.
205. 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.
206. 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.
207. 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.
208. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125–30.
209. Sabrah A.H.A., Yassen G.H., Gregory R.L. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *enterococcus faecalis* and *porphyromonas gingivalis*. *Journal of Endodontics*, (2013) 39 (11) , pp. 1385-1389.
210. 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.
211. 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.
212. 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.
213. 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.
214. 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.
215. 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.
216. 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.
217. 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.
218. Bozeman TB, Lemon RR, Eleazer PD. Elemental analysis of crystal precipitate from gray and white MTA. *Journal of endodontics*. 2006;32(5):425-8.
219. LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, v. 25, n. 4, p. 402-8, Dec 2001. ISSN 1046-2023.
220. YUAN, J. S. et al. Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics*, v. 7, p. 85, 2006. ISSN 1471-2105 (Electronic) 1471-2105
221. MARTIN-PIEDRA, Miguel Angel et al. Cell viability and proliferation capability of long-term human dental pulp stem cell cultures. 2014. International Society for Cellular Therapy. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
222. Qubit RNA IQ Assay: a fast and easy fluorometric RNA quality assessment. © 2018 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. All trademarks are the property

of Thermo Fisher Scientific and its subsidiaries unless otherwise specified. Agilent and Bioanalyzer are trademarks of Agilent Technologies, Inc. COL22654 0718

223. TRIzol™ LS Reagent Experimental protocol for DNA isolation. Life Technologies Corporation | Carlsbad, CA 92008 USA | Toll Free in USA 1 800 955 6288 ©2016 Thermo Fisher Scientific Inc. All rights reserved. Catalog Numbers 10296010 and 10296028.

224. MODINO, S. A.; P. T. SHARPE. Tissue engineering of teeth using adult stem cells. *Arch Oral Bio. Cambridge*, 1;119 (Pt 11):2204-13. Jun, 2005

225. CAO, Y.; SONG, M.; KIM, E.; SHON, W.; CHUGAL, N.; BOGEN, G.; LIN, L.; KM, R.H.; PARK, N.H.; KANG, M. K. 2015. Pulp-dentin Regeneration. *Journal of Dental Research*, 94(11), 1544–1551

226. SMITH, A.J.; DUNCAN, H.F.; DIOGENES, A. Exploiting the bioactive properties of the dentin-pulp complex in regenerative endodontics. *J Endod.* 2016;42:47–56.

227. ALBUQUERQUE, M.T.; RYAN, S.J.; MUNCHOW, E.A. Antimicrobial effects of novel triple antibiotic paste–mimic scaffolds on *actinomycesnaeslundii* biofilm. *J Endod.* 2015; 41:1337–43.

228. DHILLON, H.; KAUSHIK, M.; SHARMA, R. 2016. Regenerative endodontics—Creating new horizons. *J Biomed Mater Res Part B* 2016:104B:676–685.

229. CASAGRANDE, L.; DEMARCO, F.F.; ZHANG, Z.; ARAUJO, F.B.; SHI, S.; NOR, J.E. Dentin-derived BMP-2 and odontoblast differentiation. *J Dent Res* 2010;89:603–608.

230. Mohammadi Z. Antibiotics as intracanal medicaments: a review. *J Calif Dent Assoc* 2009;37:98-108.

231. 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.

232. PREFFER F; DOMBKOWSKI D. Advances in complex multiparameter flow cytometry technology research. *Cytometry B Clin Cytom.* Hoboken, 76(5):295-314.Sep, 2009.

233. da Rosa WLO, Piva E, da Silva AF. Disclosing the physiology of pulp tissue for vital pulp therapy. *Int Endod J* 2018;51(8):829-846.
234. 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.
235. Tomas-Catala CJ, Collado-Gonzalez M, Garcia-Bernal D, Onate-Sanchez RE, Forner L, Llena C, et al. Comparative analysis of the biological effects of the endodontic bioactive cements MTA-Angelus, MTA Repair HP and NeoMTA Plus on human dental pulp stem cells. *Int Endod J* 2017;50 Suppl 2:e63-e72.
236. 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.
237. 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.
238. 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.
239. 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.
240. 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.
241. 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.
242. Love RM. *Enterococcus faecalis*--a mechanism for its role in endodontic failure. *International endodontic journal*. 2001;34(5):399-405.

243. Le KY, Otto M. Quorum-sensing regulation in staphylococci-an overview. *Frontiers in microbiology*. 2015;6:1174.
244. Otto M. Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinants of pathogenicity. *Annual review of medicine*. 2013;64:175-88.
245. Brooks JL, Jefferson KK. Staphylococcal biofilms: quest for the magic bullet. *Advances in applied microbiology*. 2012;81:63-87.
246. 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.
247. 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.
248. 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.
249. 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.
250. 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.
251. 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.
252. 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.
253. 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.
254. 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.
255. 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.
256. 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.
257. Kimberley FC, Lobito AA, Siegel RM, Sreaton GR. Falling into TRAPS--receptor misfolding in the TNF receptor 1-associated periodic fever syndrome. *Arthritis Res Ther*. 2007;9(4):217. Review.
258. Hebert C.A., Luscinskas F.W., Kiely J.-M., Luis E.A., Darbonne W.C., Bennett G.L., Liu C.C. Endothelial and leukocyte forms of IL-8. Conversion by thrombin and interactions with neutrophils. *J. Immunol*. 1990;145:3033-3040
259. 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.
260. 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.
261. 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.
262. 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.

263. Tominaga K., Yoshimoto T., Torigoe K., Kurimoto M., Matsui K., Hada T., Okamura H., Nakanishi K. "IL-12 synergizes with IL-18 or IL-1beta for IFN-gamma production from human T cells." *Int. Immunol.* (2000)12:151-160

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

265. 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.

266. 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.

267. 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.

268. 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.

269. 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.

270. 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.

271. Balto K, Sasaki H, Stashenko P. Interleukin-6 deficiency increases inflammatory bone destruction. *Infection and immunity.* 2001;69(2):744-50.

272. 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.

273. Lippert DN, Cortens JP, Hancock RE, El-Gabalawy H, et al. Modulation of interleukin-1beta-induced inflammatory responses by IDR-1002, in synovial fibroblasts. *Arthritis research & therapy.* 2012;13(4):87

274. de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E. Interleukin

- 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.* (1991)174:1209-1220.
275. PEÑALOZA, Hernán F. et al. Opposing roles of IL-10 in acute bacterial infection. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 2016.
276. OSORIO, R.M., HEFTI, A., VERTUCCI, F.J., SHAWLEY, A.L. Cytotoxicity of endodontic materials. *Journal of Endodontics*, v.24, n.2, p.91-96, Feb. 1998.
277. 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.

ANEXO 1: Parecer consubstanciado de aprovação do comitê de ética.

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: PEPTÍDEO DE DEFESA DO HOSPEDEIRO IDR1002 E CIPROFLOXACINO COMO POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO PARA O PROCESSO DE REVASCULARIZAÇÃO PULPAR - ESTUDO IN VITRO

Pesquisador: Taia Maria Berto Rezende

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 94676218.5.0000.0029

Instituição Proponente: Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.823.968

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de pesquisa que envolve o Hospital Universitário de Brasília e o Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Genômicas e Biotecnologia da Universidade Católica de Brasília (ex. Universidade Católica de Brasília), a ser desenvolvido pelo estudante de mestrado Danilo César Mota Martins (Ciências da Saúde, Universidade de Brasília) sob orientação da professora Dra. Taia Maria Berto Rezende.

Projeto relatado na reunião ocorrida dia 13/08/2018.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1176625.pdf	11/07/2018 15:53:24		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	CARTEDEENCAMINHAMENTO.pdf	11/07/2018 15:52:08	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO.pdf	11/07/2018 15:50:34	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TERMODEANUENCIA.pdf	11/07/2018 15:47:15	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCEP.docx	09/07/2018 01:33:16	Taia Maria Berto Rezende	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	09/07/2018 01:31:36	Taia Maria Berto Rezende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

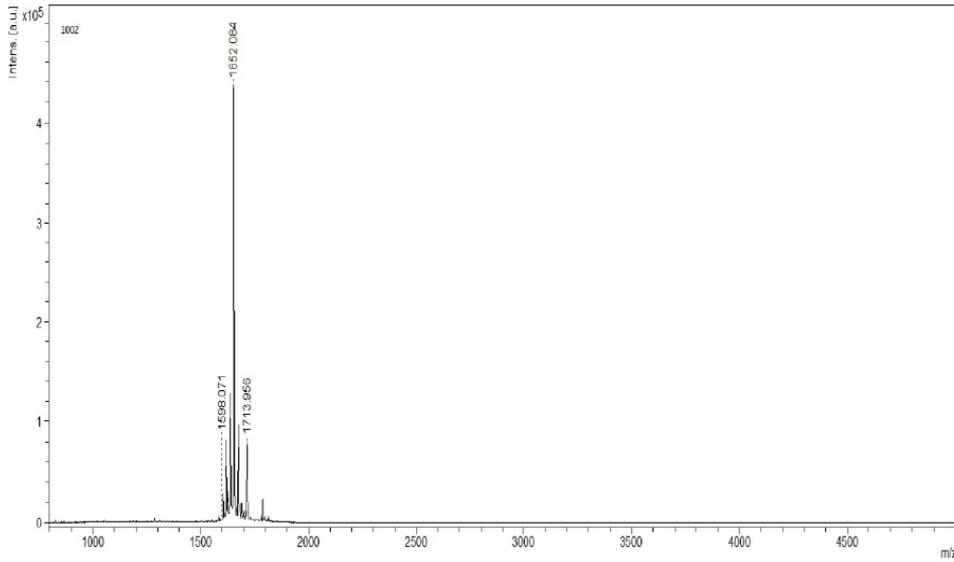
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

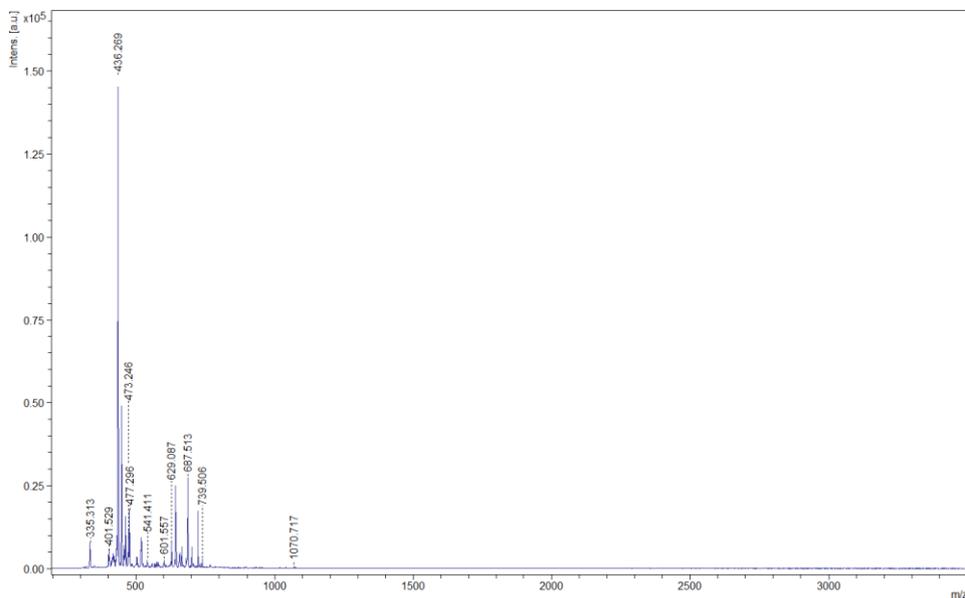
BRASILIA, 15 de Agosto de 2018

Assinado por:
Cintia do Couto Mascarenhas
(Coordenador)

ANEXO 2: Figuras suplementares.



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



(B) Espectro obtido por MALDI-ToF da massa referente ao Ciprofloxacino (Farmacotécnica)/(-436,269 Da), com pureza superior a 95%.

