

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado somente
a partir de 22/04/2021.

Karina Sampaio Caiaffa

**EFEITO ISOLADO OU COMBINADO DE
FLAVONOIDES E PEPTÍDEOS CATIÔNICOS
SOBRE BIOFILME ENDODÔNTICO E SUA
INFLUÊNCIA NA VIABILIDADE CELULAR,
CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO E INIBIÇÃO DE
CITOCINAS EM FIBROBLASTOS**

**Araçatuba – SP
2019**

Karina Sampaio Caiaffa

**EFEITO ISOLADO OU COMBINADO DE
FLAVONOIDES E PEPTÍDEOS CATIÔNICOS
SOBRE BIOFILME ENDODÔNTICO E SUA
INFLUÊNCIA NA VIABILIDADE CELULAR,
CAPACIDADE DE MIGRAÇÃO E INIBIÇÃO DE
CITOCINAS EM FIBROBLASTOS**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção de título de Doutora em Ciência Odontológica - Área de Concentração: Endodontia.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Cristiane Duque

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra

Araçatuba - SP
2019

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

C133e Caiaffa, Karina Sampaio.
Efeito isolado ou combinado de flavonoides e peptídeos catiônicos sobre biofilme endodôntico e sua influência na na viabilidade celular, capacidade de migração e inibição de citocinas em fibroblastos / Karina Sampaio Caiaffa. – Araçatuba, 2019
115 f. : il. ; tab.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Duque
Coorientador: Prof. Luciano Tavares Angelo Cintra

1. Peptídeos catiônicos antimicrobianos 2. Flavonoides
3. Biofilmes 4. Citocinas I. T.

Black D24
CDD 617.67

Claudio Hideo Matsumoto CRB-8/5550

Dados Curriculares

Karina Sampaio Caiaffa

| | |
|--------------------|---|
| Nascimento | 02.06.1989 – Petrópolis - RJ |
| Filiação | Gerson da Silva Caiaffa Irani Sampaio Caiaffa |
| 2008/2013 | Curso de Graduação em Odontologia pela Faculdade de Odontologia da Universidade Federal Fluminense – Polo Universitário de Nova Friburgo, FOUFF/NF. |
| 2010/2012 | Desenvolvimento de Projeto de Iniciação Científica, com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. |
| 2013/2014 | Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. |
| 2014/2015 | Desenvolvimento de Projeto de Mestrado com auxílio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. |
| 2015/2017 | Desenvolvimento de Projeto de Doutorado com auxílio CAPES. |
| 2018/2019 | E Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq. |
| 2017/2017 | Desenvolvimento de Projeto de Doutorado Sanduíche com auxílio CAPES/ Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE. |
| Associações | CROSP - Conselho Regional de Odontologia de São Paulo. SBPqO - Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica. |

COMISSÃO EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Prof^a. Dr^a. Cristiane Duque - Orientadora. Professora Associada do Departamento de Odontologia Infantil e Social, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia - Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, São Paulo.

Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho - Professor Titular do Departamento de Odontologia Restauradora, Disciplina de Endodontia da Faculdade de Odontologia - Araçatuba, UNESP - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araçatuba, São Paulo.

Prof^a. Dr^a. Thais Marchini de Oliveira Valarelli - Professora Doutora do Departamento de Odontopediatria, Ortodontia e Saúde Coletiva, Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de Odontologia de Bauru, USP - Universidade de São Paulo, Bauru, São Paulo.

Prof^a. Dr^a. Mariana Emi Nagata - Professora Colaboradora do Departamento de Odontologia, Disciplina de Clínica Integrada Infantil I e II da UENP - Universidade Estadual do Norte do Paraná, Jacarezinho, Paraná.

Prof^a. Dr^a. Christine Men Martins - Professora Titular Universitária do Departamento de Odontologia, Disciplina de Endodontia e Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Presidente Prudente, NOESTE - Universidade do Oeste Paulista, Presidente Prudente, São Paulo.

"Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o que ensina." (Cora Coralina)

Karina Sampaio Caiáffa

Dedicatória

Karina Sampaio Caiáffa

Dedico este trabalho,

Aos meus pais *Irani, Paulo, Gerson e Ana*, meus avós (*Irany e Octacílio - in memoriam*) e a minha orientadora *Cristiane Duque*.

Por estarem comigo em todos os momentos, principalmente os mais difíceis, me apoiando e dando força para continuar... Pelo exemplo de simplicidade, perseverança e carinho. Agradeço por todos os momentos que estiveram juntos comigo e por todas as palavras de conforto e de incentivo que me mostraram que os momentos mais felizes que passei foram aqueles que tive força para lutar.

Sem vocês, esse dia tão especial em minha vida não estaria se realizando, pois muitas vezes o cansaço e a vontade de desistir surgiram, e foram nesses momentos que me lembrava de não estar sozinha, e que existiam pessoas como vocês;

Meus amores, vocês são tudo para mim!

Amo vocês!

“O amor não vê com os olhos, vê com a mente; por isso é alado, é cego e tão potente.”

William Shakespeare

Karina Sampaio Caiassa

Agradecimentos Especiais

Karina Sampaio Caiáffa

A Deus,

Obrigada meu querido amigo, por tudo que tens me proporcionado, por todos os sonhos alcançados e por me acompanhar em todos os momentos da minha vida, cuidando da minha maior riqueza, minha família, enquanto estava longe... O senhor é o meu guia e nada me faltará...

Agradeço-te imensamente.

AOS MEUS QUERIDOS AVÓS OCTACÍLIO E IRANY (IN MEMORIAM),

Sou eternamente grata pelos maiores ensinamentos que tive com vocês, acredito que boa parcela do que sou hoje devo aos conselhos e palavras sábias, por mais simples que fossem... Agradeço pelas orações diárias, e a Deus por ter me dado os avós mais doces do mundo, mesmo que a vida tenha sido tão dura com vocês! Agradeço por terem me ensinado o que é honestidade, sinceridade e fé. Tenho muito orgulho das minhas raízes no interior... Recentemente meus queridos avós nos deixaram nesta vida, ficando um vazio em meu coração, porém sei que onde quer que eles estejam, estarão sempre olhando por nossa família. Amo tanto vocês dois!!

“Aprenda a viver dentro das suas possibilidades. Buscar uma vida de aparências, fora da sua realidade, só o levará para o abismo sem volta. Construa a sua vida aos poucos, lutando a cada dia e extraíndo da vida o que ela tem de melhor: a Simplicidade.” Chico Xavier

À minha querida Mãe e Esposo

Mãe, cada dia que passa mais pareço com você, mesmo que isso parece bem estranho, pois somos completamente diferente, isto porque, somos guerreiras e fortes. Tenho orgulho da minha criação e imensa gratidão por tudo que fez por mim. Hoje sinto-me aliviada em saber que tem felicidade em seu coração por ter o Eduardo em sua vida, e ele acaba me ajudando muito pois, esta aí do seu lado nos momentos de minha ausência. Por isso, muito obrigada Eduardo por estar conosco hoje e sempre. E mãe, obrigada por me ensinar que caráter é aquilo que você é quando ninguém está olhando...

Ao meu querido Pai (Tio Paulão - Pai do coração)

Por todo amor, ensinamentos, carinho, incentivo e respeito que tem por mim. Agradeço todos os dias por existirem pessoas como o senhor, porque mesmo não havendo laços genéticos, existem laços irreversíveis que são os do coração, e que permitem-se doar como pais inteiramente. Deus não poderia ter me dado presente maior. Muitas coisas bonitas não podem ser vistas ou tocadas, elas são apenas sentidas. O que o senhor faz por mim é uma delas. Obrigada por estar sempre ao meu lado e nunca deixar que meus sonhos sejam esquecidos. Te amo muito!

Ao meu querido Pai Gerson e Esposa (Tia Ana)

Sinto-me honrada e agradecida por ter pais como vocês, pessoas simples, honestas e de enorme coração. Adoro quando chego de visita e sou recebida de forma tão especial por vocês e quando parto para mais uma jornada, vejo que vocês ficam tristes porém com confiança de que tudo vai dar certo. Agradeço imensamente o apoio, compreensão e amor que me oferecem todos os dias. Amo muito vocês!!

Ao meu irmão Marcos Paulo,

Obrigada meu pequeno grande homem, pelo carinho e torcida por minha felicidade.... Ver você crescendo e amadurecendo é um privilégio e espero que papai do céu permita que um dia eu consiga te ajudar nos seus estudos e que você se torne um homem honrado e feliz em suas escolhas. Te amo muito.

Ao meu querido Namorado Franci,

Hoje sei que não é por a caso que Deus nos uniu. Somos companheiros, sempre torcendo pela felicidade um do outro, mesmo que a distância nos separe fisicamente, nossas mentes são unidas por laços jamais conhecidos por mim. Acredito que os planos de Deus nunca falham, apesar de nos depararmos com momentos bastante difíceis, sei que tudo vai ficar bem, pois tenho você comigo. Obrigada por ser assim, do jeitinho que é... Te amo muito!

“Fundamental é mesmo o amor, é impossível ser feliz sozinho.” Tom Jobim

À minha querida Orientadora e Amiga

Profa. Dra. Cristiane Duque,

O meu maior orgulho é dizer que sou sua orientada e principalmente amiga. Conquistei muitas coisas na vida graças ao seu apoio, mas uma delas foi mais importante de todas, nossa amizade, construída por longo destes quase 8 anos de convívio. Sei que as escolhas que fazemos durante a vida não são, nem de longe, fáceis. Mas muitas escolhas que fiz foram inspiradas em sua garra e foco. Você é um espelho pra mim e para muitos que conheço! Por sua dedicação ao seu trabalho e carinho com seus alunos. Espero, torna-me um pouquinho semelhante ao seu espírito iluminado e bondoso. Entre meus amigos, contumamos nos referir a senhora com um “ser evoluído”, e brincadeiras à

Karina Sampaio Caiassa

parte, sei o quanto você se empenha para dar seu melhor e tonar as pessoas ao seu lado mais felizes. Muito obrigada pelos ensinamentos e acolhida! Cresci muito como pessoa nestes últimos anos e sei que nossa amizade seguirá sempre em frente. Muito obrigada e você sabe o quanto significa pra mim!

“Ninguém cruza nosso caminho por acaso e nós não entramos na vida de ninguém sem nenhuma razão.”
“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.” Chico Xavier

À querida Família Duque Talora

Luiz Fernando, Doraci, Sônia, Edenizia e ao meu querido Felipe. Agradeço tudo que fizeram por mim... Pelo acolhimento dentro de suas casas e por todo carinho que sempre tiveram comigo... Sem vocês tudo teria sido muito mais difícil, principalmente pela distância da minha família de sangue, pois hoje posso dizer que ganhei uma nova família... Vocês significam muito para mim... Ensinaram-me muitas coisas boas e sou muito grata por tudo. Adoro vocês!

Às queridas Famílias Sampaio e Caiaffa

Ao apoio dado, carinho e torcida para que tudo desse certo nos meus estudos. Por tudo o que já fizeram por mim, minha eterna gratidão. Minha admiração por vocês é imensa, assim como a alegria de tê-los sempre por perto. Obrigado por existirem em minha vida. Amo vocês!

À Família Alves da Costa,

Jusemar, Antônio Lorenço, Wanderléia e Vanusa... Agradeço minha segunda família por todo apoio e carinho e por terem me recebido tão bem em sua casa, e principalmente por terem criado o grande amor da minha vida com tanta dedicação e

Karina Sampaio Caiaffa

carinho, tornando-o um homem honesto e tão especial... Conhecendo vocês é fácil entender que pessoas boas e honestas existem. Obrigada por tudo! Adoro todos vocês!

À minha amiga Vanessa R. dos Santos

Agradeço por todo apoio, carinho e amizade... Nos momentos que me sentia triste, ansiosa ou mesmo desanimada, lembrava-me que você estava comigo, e isso ajudou-me a seguir em frente e conquista o tão sonhado dia da defesa de doutorado, pois sabemos o quão difícil é a distância de nossas famílias e as incertezas de nossas escolhas. Aprendemos muitas coisas juntas, no laboratório (pelo seu companheirismo e ajuda em todas as fases da realização deste trabalho), em nossas viagens (pelas risadas e conversas) e principalmente no dia a dia (pelo fato de sermos tão diferentes uma da outra e mesmo assim nos compreendermos tão bem). Agradeço tudo que fez por mim. Seremos eternamente amigas e tenha certeza que você sempre estará em meu coração, mesmo quando estivermos longe. Muito obrigada Van! (Obs. Queria colocar as carinhas do whats app mas não tem aqui, infelizmente, combinam muito com você).

“Depois de um tempo você aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias”.

William Shakespeare

Às minhas amigas Thayse Hosida, Mariana Nagata e Marjully

O que dizer destas amigas lindas? Na verdade tenho muitas coisas para dizer, pois somos grandes amigas. Muitas conversas e risadas, coisas que irão ficar para sempre na memória e no coração. Mulheres completamente diferentes e que eu admiro do jeitinho que são. Sou muito grata pelo companheirismo e força que me dão, pois sabemos bem que as coisas na pós-graduação não são fáceis, envolvem muitas abdições e perseverança para continuarmos e alcançarmos nossos objetivos. Adoro estar no laboratório com vocês, adorava quando eu ia na casa de vocês, quando a gente saía para lanchar ou mesmo caminhar e jogar conversa fora. Deus coloca em nossos caminhos pessoas muito especiais e certeza que ele colocou vocês nestes momentos longe da

Karina Sampaio Caiuffa

minha família, pois sabia o quanto iriam me dar apoio e que eu não estava sozinha nesta. Muito obrigada pela amizade!! Adoro vocês!!

Ao meu grande Amigo José Antônio

Este menino não é mole não, mas ele nem imagina o quanto é importante para mim. Adoro sua companhia, fico muito mais contente quando escuto sua risada característica dentro do laboratório, avisando que ele já está na área. Em 2012, ainda como aluna de iniciação científica, vinha para Araçatuba fazer parte do meu TCC e foi quando conheci esta figura doce (mas nem tanto) e “santinho” (mas nem tanto). Foi afinidade a primeira vista, desde então construímos uma amizade sincera, leve e de grande valor para mim. Muito obrigada meu amigo, espero que possamos sempre manter essa alegria e relação quando nos encontrarmos. Te adoro meu amigo do coração!

À minha grande amiga Marcelle Danelon

Mesmo longe, ela sempre esteve presente na minha vida, me ajudando de todas as formas, seja dando força para a realização deste trabalho ou mesmo me incentivando profissionalmente e pessoalmente. Te adoro amiga, tenho muito orgulho de você e de nossa amizade.

Aos amigos Caio, Leonardo e Igor

Amigos que alegrem meus dias no laboratório e na vida! Cada um com seu jeitinho particular e que me cativaram por serem pessoas adoráveis! Vocês sempre estarão em meu coração. Meu muito Obrigada!

Aos alunos Colaboradores do trabalho: Bruno, Thainara, Jesse, Rafaela, Gabriela, Warley, Norival e Gabriel Abuna.

Obrigada amigos pelo companheirismo no laboratório e por acreditarem que o projeto daria certo, vocês foram fundamentais em minha jornada no doutorado.

**Às alunas e alunos de Iniciação Científica, Mestrado, Doutorado e
Pós-Doutorado**

Aos meus amigos que sempre me acompanham na Odontopediatria: Thamires, Sara, Gabriel, Márjuly, Carla Mendes, Priscila, Francienne, Nayara, Mayra, Isabel, Laís, Jorge, Heitor, Isabela, Ana Paula, Gabriela Fernandes.

Aos amigos da Endodontia: Amanda, Leopoldo, Francine, Carlos, Camila, Renan.

*A amizade e colaboração de cada um foram essenciais para a conclusão
desta pesquisa. Admiro todos vocês!*

**Aos docentes da Disciplina de Endodontia da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba, UNESP**

Prof. Dr. Roberto Holland, Prof. Dr. Mauro Juvenal Nery, Prof. Dr. José Arlindo Otoboni Filho, Prof. Dr. Elói Dezan Júnior, Prof. Dr. João Eduardo Gomes Filho, Prof. Dr. Gustavo Sivieri Araújo, Prof. Dr. Rogerio Castilho Jacinto e ao meu coorientador que tanto admiro Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra (Obrigada por toda colaboração).

Por todos os ensinamentos a mim transmitidos, contribuindo na minha formação profissional.

**Aos docentes da Disciplina de Odontopediatria da Faculdade de
Odontologia de Araçatuba, UNESP**

Prof. Dr. Alberto Carlos B. Delbem, Prof. Dr. Célio Percinoto, Prof. Dr. Robson Federico Cunha, Prof. Dr. Juliano Pelim Pessan e Prof^a Dra. Sandra M. H. C. Ávila de Aguiar, pela

Karina Sampaio Caiuffa

agradável convivência, acolhimento no departamento e conhecimentos transmitidos. Muito obrigada!

Aos professores e alunos colaboradores: Prof^a Dra. Juliana Nascimento Santos, Prof^o Dr. Daniel Grenier, à aluna Amel Benlagha da Universidade de Laval (UL) – Canadá (PDSE) e ao Prof. Dr. Eduardo M. Cilli pelo desenvolvimento dos peptídeos estudados e por toda colaboração no trabalho

Obrigada por toda confiança gentilmente cedida ao trabalho e por toda ajuda que foi de fundamental importância para o andamento e finalização do trabalho. Muito obrigada!

Aos colegas do laboratório da UL – Québec – Canadá: Amel Benlagha, Jabrane (técnico do lab. da UL), Phillip e Eve.

Agradeço imensamente toda a ajuda e apoio que me deram no laboratório da universidade de Laval no Canadá, sem vocês seria impossível a realização desta etapa do trabalho.

Aos amigos Alessandra, Jéssica, Murilo, Fernando, Niedjna, Fernanda, Mariana, Salvador, Hany Geagea, Cas Mosterd, Iness e Victor

Obrigada pelo companheirismo e apoio durante minha estadia em Québec, sem vocês tudo seria mais difícil. Foram muitas descobertas juntos e uns dos melhores momentos que passei em minha vida. Foi um prazer conhece-los e ter a amizade de vocês.

**Aos queridos Técnicos dos laboratórios da UNESP - Araçatuba,
Araraquara e UNICAMP – Piracicaba: Ricardo, Mário e Flávia.**

Obrigada por toda ajuda e ensinamentos, aprendi muito com vocês. Todos que ajudaram, foram peças importantíssimas deste trabalho. Muito obrigada!!

"Nosso carinho e gratidão, a vocês, que além de transmitirem seus conhecimentos e suas experiências, souberam apoiar-nos em nossas dificuldades."

Aos funcionários do Departamento de Odontopeiatria

Ricardo, Mário e Luizinho. Por manterem a organização no laboratório; Por toda a ajuda e dedicação. Muito Obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Endodontia

Nelci, Cláudia, Elaine, Peterson, Kazu e Grazi. Mesmo nos poucos momentos que passei com vocês, agradeço a ajuda e sei o quanto profissionais dedicados são.

À Banca do Exame Geral de Qualificação e à Banca de Defesa

Muito obrigada por toda contribuição no trabalho e pelos conhecimentos trocados.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba, na pessoa dos professores Dr. Wilson Roberto Poi, digníssimo Diretor e Dr. João Eduardo Gomes Filho, digníssimo Vice-Diretor.

Karina Sampaio Caiatta

Ao Curso de Pós-Graduação em Ciência Odontológica da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, na pessoa do coordenador Prof. Dr. Luciano Tavares Angelo Cintra.

À Valéria, Cristiane e Lilian da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Araçatuba-UNESP, pelo profissionalismo e atenção sempre carinhosa.

Aos funcionários da biblioteca da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da UNESP, Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar pela atenção e disponibilidade com que nos recebem.

Ao Frigorífico Friboi, que permitiram a coleta dos dentes bovinos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq(140467/2018-1), CAPES, CAPES-PROCAD(88881.068437/2014-01) e CAPES - PDSE(88881.135824/2016-01) pela concessão de recursos que possibilitaram a realização deste Curso de Doutorado.

À todos que, de alguma forma contribuíram para a elaboração e conclusão deste trabalho...

Minha eterna gratidão...

Karina Sampaio Caiuffa

A arte de ser feliz

*Houve um tempo em que minha janela se abria
sobre uma cidade que parecia ser feita de giz.
Perto da janela havia um pequeno jardim quase seco.
Era uma época de estiagem, de terra esfarelada,
e o jardim parecia morto.
Mas todas as manhãs vinha um pobre com um balde,
e, em silêncio, ia atirando com a mão umas gotas de água sobre as plantas.
Não era uma rega: era uma espécie de aspersão ritual, para que o jardim não morresse.
E eu olhava para as plantas, para o homem, para as gotas de água que caíam de seus dedos
magros e meu coração ficava completamente feliz.
Às vezes abro a janela e encontro o jasmineiro em flor.
Outras vezes encontro nuvens espessas.
Avisto crianças que vão para a escola.
Pardais que pulam pelo muro.
Gatos que abrem e fecham os olhos, sonhando com pardais.
Borboletas brancas, duas a duas, como refletidas no espelho do ar.
Marimbondos que sempre me parecem personagens de Lope de Vega.
Às vezes, um galo canta.
Às vezes, um avião passa.
Tudo está certo, no seu lugar, cumprindo o seu destino.
E eu me sinto completamente feliz.
Mas, quando falo dessas pequenas felicidades certas,
que estão diante de cada janela, uns dizem que essas coisas não existem,
outros que só existem diante das minhas janelas, e outros,
finalmente, que é preciso aprender a olhar, para poder vê-las assim.*

Cecília Meireles

Epígrafe

Karina Sampaio Caiáffa

Resumo Geral

Karina Sampaio Caiáffa

Caiaffa KS. Efeito isolado ou combinado de flavonoides e peptídeos catiônicos sobre biofilme endodôntico e sua influência na viabilidade celular, capacidade de migração e inibição de citocinas em fibroblastos. 115 f. [Tese] Doutorado em Ciência Odontológica, área Endodontia, Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2019.

Resumo Geral

Este trabalho foi dividido em dois capítulos que objetivou avaliar: 1) o efeito isolado ou combinado do flavonoide epigallocatechin-3-gallate (EGCG) em associação com o peptídeo LL-37 e seu análogo KR-12-a5 sobre a viabilidade celular de fibroblastos e sobre cultura planctônica, biofilme simples, dual-espécies e túbulos dentinários e 2) as interações sinérgicas do EGCG e proantocianidina do oxicoco (A-type cranberry proanthocyanidins, AC-PAC), quando usado em combinação com LL-37 ou KR-12-a5 sobre a viabilidade celular, a capacidade de migração e inibição das citocinas em cultura de fibroblastos (HGF-1), quando estimuladas ou não pelo lipopolissacarídeo de *A. actinomycetencomitans* (LPS). No capítulo 1, a concentração inibitória mínima (MIC), a concentração bactericida mínima (MBC) e concentração inibitória fracionária (FIC) de EGCG, LL-37 e KR-12-a5 foram determinadas a partir de valores decrescentes dos compostos por meio dos métodos de microdiluição e checkerboard contra *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* e *Fusobacterium nucleatum* após 24 horas de tratamento. Fibroblastos da linhagem L-929 foram expostos a combinações de EGCG com peptídeos em diferentes concentrações e o metabolismo celular avaliado por ensaios de MTT. Os compostos com melhor efeito antimicrobiano e citotóxico foram avaliados por 24-36h, isoladamente ou em combinação, em biofilmes individuais ou biofilmes de dual-espécies com *E. faecalis* formados em placas de poliestireno por 48h por meio de contagem bacteriana. Os biofilmes de *E. faecalis* também foram cultivados em túbulos dentinários por 2 semanas, tratados com EGCG, KR-12-a5 e EGCG + KR-12-a5 e a porcentagem de células mortas foi determinada pela análise de imagens usando Microscopia Confocal. No capítulo 2, a linhagem celular de fibroblastos gengivais humanos primários HGF-1 foi pré-tratada durante 2 h com EGCG ou AC-PAC a 25 e 12,5 µg / mL, LL-37 ou KR-12-a5 a 0,06 e 0,03 µM ou com uma combinação de EGCG + AC-PAC; AC-PAC + KR-12-a5; AC-PAC + LL-37; EGCG + KR-12-a5 ou EGCG + LL-37, nas

mesmas concentrações. As culturas celulares foram então estimuladas com 50 µg/mL de LPS por 24-48h. A viabilidade celular e migração foram analisadas usando ensaios colorimétricos e fluorescentes, respectivamente. A quantificação de citocinas foi determinada por ensaios multiplex ELISA. Os resultados mostraram que em condições planctônicas, EGCG + KR-12-a5 apresentaram efeito sinérgico ou aditivo contra todas as bactérias testadas, com FIC menor que os valores de MIC obtidos pelos compostos isolados. As combinações de EGCG e peptídeos testados não foram tóxicas para os fibroblastos, uma vez que o crescimento celular foi superior a 70%. Em condições de biofilme simples, EGCG + KR-12-a5 eliminou *S. mutans* e *A. israelii* e reduziu *E. faecalis* e *F. nucleatum*. Para biofilmes de duas espécies, quando *E. faecalis* foi combinado com *S. mutans*, EGCG + KR-12-a5 teve efeito sinérgico eliminando *S. mutans* e reduzindo estatisticamente as contagens de *E. faecalis*. Em biofilmes associando *E. faecalis* e *A. israelii* ou *F. nucleatum*, EGCG + KR-12-a5 eliminaram *E. faecalis* e promoveram redução de *A. israelii* e *F. nucleatum*, embora não tenha sido observada diferença estatística entre os compostos. EGCG + KR-12-a5 reduziu mais de 80% dos biofilmes de *E. faecalis* nos túbulos dentinários. Dentre os grupos experimentais estudados, o EGCG, principalmente a 25 e 12,5 µg/mL estimulou o crescimento de fibroblastos, protegendo-os dos efeitos do LPS. Efeito sinérgico entre EGCG + AC-PAC, EGCG + LL-37 e EGCG + KR-12-a5 no metabolismo celular também foi observado na presença de LPS. Combinações do EGCG com AC-PAC ou KR-12-a5 e AC-PAC com LL-37 foram capazes de aumentar estatisticamente a migração celular. EGCG, AC-PAC, LL-37 e KR-12-a5 promoveram a redução de citocinas individualmente ou em combinação (EGCG + AC-PAC e EGCG + KR-12-a5) mais especificamente para IL-6, IL-8, GM-CSF e TNF-α. Conclui-se que a associação de EGCG e KR-12-a5 é citocompatível e promove um efeito sinérgico contra bactérias associadas a infecções endodônticas, sob condições planctônicas e de biofilme. O EGCG, isoladamente ou associado ao AC-PAC e ao KR-12-a5, aumenta a viabilidade e migração celular, bem como a inibição de citocinas por fibroblastos estimulados por LPS. A associação de EGCG com KR-12-a5 poderia ser uma opção de princípio ativo em medicações para fins endodônticos.

Palavras-chave: Peptídeos Catiônicos Antimicrobianos, Flavonoides, Biofilmes, Citocinas.

General Abstract

Karina Sampaio Caiáffa

Caiaffa KS. Effect of flavonoids and cationic peptides, alone or in combination, on endodontic biofilm and their influence on cell viability, migration capacity and inhibition of cytokines in fibroblasts. 115 f. [Tese] Doutorado em Ciência Odontológica, área Endodontia, Araçatuba: Universidade Estadual Paulista, 2019.

General Abstract

This study was divided in two chapters that aimed to evaluate: 1) the effect of flavonoid epigallocatechin-3-gallate (EGCG), cationic peptide LL-37 peptide and its analogue KR-12-a5, alone or in combination, on fibroblast cell viability and on bacteria in planktonic and single/dual-species biofilms/dentin tubules; 2) the synergistic interactions of EGCG and cranberry proanthocyanidins (A-type cranberry proanthocyanidins, AC-PAC), when used in combination with LL-37 or KR-12-a5 on cell viability, the ability to induce cell migration and inhibit cytokines in culture of fibroblasts (HGF-1) when stimulated or not by the lipopolysaccharide of *A. actinomycetencomitans* (LPS). For the chapter 1, Minimum inhibitory concentration (MIC), minimum bactericidal concentration (MBC) and fractional inhibitory concentration (FIC) of EGCG, LL-37 and KR-12-a5 were determined from decreasing values of the compounds by *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* and *Fusobacterium nucleatum* against microdilution and checkerboard after 24 hours of treatment. L-929 fibroblasts were exposed to combinations of EGCG with peptides at different concentrations and cell metabolism assessed by MTT assays. The compounds if the best antimicrobial and cytotoxic effect were also evaluated for 24-36h, alone or in combination, in 48h single- or dual-species biofilms with *E. faecalis* formed on polystyrene plates by bacterial counting. *E. faecalis* biofilms were also cultured in dentin tubules for 2 weeks and treated with EGCG, KR-12-a5 and EGCG + KR-12-a5 to determine the percentage of dead cells by analysis of images using Confocal Microscopy. For the chapter 2, primary human gingival fibroblast HGF-1 cell line was pretreated for 2 h with either EGCG or AC-PAC at 25 and 12.5 µg/mL, LL-37 or KR-12-a5 at 0.03 and 0.06 µM or with a combination of EGCG + AC-PAC; AC-PAC + KR-12-a5; AC-PAC + LL-37; EGCG + KR-12-a5 or EGCG + LL-37, at the same concentrations. Cell cultures were then stimulated with 50 µg/mL LPS for 24-48h. Cell viability and migration were analyzed using colorimetric and

fluorescent assays, respectively. Quantification of cytokines was determined by multiplex ELISA assays. The results show that in planktonic conditions, EGCG + KR-12-a5 showed a synergistic or additive effect against all the bacteria tested, with FIC lower than the MIC values obtained by the compounds alone. Combinations of EGCG and peptides tested were not toxic to fibroblasts, since cell growth was higher than 70%. Under single biofilm conditions, EGCG + KR-12-a5 eliminated *S. mutans* and *A. israelii* and reduced *E. faecalis* and *F. nucleatum*. For dual-species biofilms, when *E. faecalis* was combined with *S. mutans*, EGCG + KR-12-a5 had a synergistic effect by eliminating *S. mutans* and statistically reducing *E. faecalis* counts. In biofilms associated with *E. faecalis* and *A. israelii* or *F. nucleatum*, EGCG + KR-12-a5 eliminated *E. faecalis* and promoted reduction of *A. israelii* and *F. nucleatum*, although no statistical difference was observed between the compounds. EGCG + KR-12-a5 reduced more than 80% of the *E. faecalis* biofilms in the dentin tubules. Among the experimental groups studied, EGCG, mainly at 25 and 12.5 µg/mL stimulated the growth of fibroblasts, protecting them from the effects of LPS. Synergistic effect between EGCG + AC-PAC, EGCG + LL-37 and EGCG + KR-12-a5 on cell metabolism was also observed in the presence of LPS. Combinations of EGCG with AC-PAC or KR-12-a5 and AC-PAC with LL-37 were able to increase statistically cell migration. EGCG, AC-PAC, LL-37 and KR-12-α5 promoted cytokine reduction individually or in combination (EGCG + AC-PAC and EGCG + KR-12-a5) more specifically for IL-6, IL-8, GM-CSF and TNF-α. The association of EGCG and KR-12-a5 was cytocompatible and promoted a synergistic effect against bacteria associated with endodontic infections under planktonic and biofilm conditions. EGCG, alone or in combination with AC-PAC and KR-12-a5, increases cell viability and migration, as well as inhibition of cytokines by LPS-stimulated fibroblasts. The association of EGCG with KR-12-a5 could be an option as active principle for medications to be used for endodontic purposes.

Key words: Antimicrobial Cationic Peptides, Flavonoids, Biofilms, Cytokines.

Lista de Figuras

Karina Sampaio Caiáffa

Lista de Figuras

Capítulo 1

- Figure 1** Effect of EGCG combinations with the peptides KR-12-a5 and LL-37 on the viability of fibroblasts (L-929). 64
- Figure 2** Effect of EGCG and KR-12-a5 treatments, alone or in combination, on 48 h-single species biofilm of *S. mutans* (A), *E. faecalis* (B), *A. israelii* (C) and *F. nucleatum* (D) for 24 h. 65
- Figure 3** Effect of EGCG and KR-12-a5 treatments, alone or in combination, on 48 h dual-species biofilm of *E. faecalis* associated with *S. mutans* (A), *A. israelii* (B) and *F. nucleatum* (C) for 36 h. 66
- Figure 4** Proportion of dead cells obtained after CLSM analysis of *E. faecalis* biofilms on dentin blocks after exposure to EG, KR, EG+KR and CHX. 67
- Figure 5** Representative 2-D CLSM images of *E. faecalis* biofilms on dentin blocks exposed to (A) EGCG 0.6 mg/mL; (B) KR 0.3 mg/mL; (C) EGCG 0.6 mg/mL + KR-12-a5 0.3 mg/mL; (D) CHX 0.05 mg/mL; (E) CHX 0.5 mg/mL and (F) Control *E. faecalis*. 68

Capítulo 2

- Figure 1** Effect of EGCG and AC-PAC (A), KR-12-a5 and LL-37 (B) on fibroblasts viability (HGF-1), after exposure or not of LPS. 85

| | | |
|-----------------|---|----|
| Figure 2 | Effect of EGCG, AC-PAC, KR-12-a5 and LL-37 combinations on fibroblasts viability (HGF-1), after exposure or not of LPS. | 86 |
| Figure 3 | Effect of EGCG, AC-PAC, KR-12-a5 and LL-37 combinations on fibroblasts migration (HGF-1), after exposure or not of LPS. | 87 |

Lista de Tabelas

Karina Sampaio Caiáffa

Lista de Tabelas

Capítulo 1

| | | |
|----------------|--|----|
| Table 1 | MIC, MBC and FIC values (mg/mL) obtained for EGCG, KR-12-a5 and LL-37 against oral bacteria. | 63 |
|----------------|--|----|

Capítulo 2

| | | |
|----------------|--|----|
| Table 1 | Effect of EGCG, AC-PAC, KR-12-a5 and LL-37, alone or in combination, on cytokines levels (% reduction), after exposure of LPS. | 88 |
|----------------|--|----|

Sumário

Karina Sampaio Caiáffa

Sumário

| | |
|-------------------------|-----|
| Introdução Geral | 32 |
| Capítulo 1 | 42 |
| Abstract | 43 |
| Introduction | 44 |
| Material and Methods | 46 |
| Results | 53 |
| Discussion | 54 |
| References | 58 |
| Tables and Figures | 63 |
| Capítulo 2 | 70 |
| Abstract | 71 |
| Introduction | 72 |
| Material and Methods | 74 |
| Results | 77 |
| Discussion | 78 |
| References | 81 |
| Tables and Figures | 85 |
| Anexo A | 90 |
| Anexo B | 99 |
| Anexo C | 101 |
| Anexo D | 102 |
| Anexo E | 104 |
| Anexo F | 105 |
| Anexo G | 107 |
| Anexo H | 109 |
| Anexo I | 114 |
| Anexo J | 115 |

Introdução Geral

Karina Sampaio Caiáffa

Introdução Geral

O tratamento de dentes permanentes jovens que sofreram danos irreversíveis devido à infecção ou trauma local antes do fechamento fisiológico normal do ápice radicular representa um verdadeiro desafio clínico. Após a erupção completa do dente na cavidade bucal ainda são necessários 3 a 4 anos para que ocorra o desenvolvimento completo dos canais e o fechamento dos ápices radiculares (Bhasker, 1991). Durante este período, se ocorrer algum tipo de trauma ou infecção, esses processos são interrompidos e o fechamento natural do ápice não acontece. As paredes dentinárias finas divergentes ou paralelas do dente imaturo dificultam a desinfecção e a execução dos procedimentos endodônticos convencionais, comprometendo o resultado a longo prazo (Rafter, 2005; Wang *et al.*, 2010; Iglesias-Linares *et al.*, 2013). Além disso, devido à complexa malha de canais secundários e acessórios e a persistência de algumas espécies microbianas, o preparo químico-mecânico não possibilita a total desinfecção do sistema de canais radiculares, levando à necessidade do uso de medicação intracanal (Byström e Sundqvist, 1981; Chávez De Paz *et al.*, 2003).

Bactérias Gram-negativas, membros comuns das infecções primárias, são geralmente eliminadas após procedimento de tratamento químico-mecânico. Exceções podem incluir alguns bacilos anaeróbios como *Fusobacterium nucleatum*, *Prevotella species* e *Campylobacter rectus*, que estão entre as espécies encontradas em amostras após instrumentação/medicação. Entretanto, a maioria dos estudos tem revelado que as bactérias Gram-positivas são as mais frequentemente presentes nestes casos, incluindo estreptococos (*S. mitis*, *S. gordonii*, *S. anginosus*, *S. sanguinis*, *S. oralis*), *P. micra*, *Actinomyces species* (*A. israelii* e *A. odontolyticus*), *Propionibacterium species* (*P. acnes* e *P. propionicum*), *P. aeruginosa*, *P. alactolyticus*, lactobacilos, *Enterococcus faecalis*, etc (Siqueira e Rôças, 2009).

Mesmo eliminando as bactérias, diversas toxinas são liberadas no canal radicular durante a infecção e quando em contato com as células do hospedeiro levam a resposta inflamatória. Entre esses fatores de virulência, está o lipopolissacarídeo (LPS). Embora o mecanismo exato de como o LPS atua não esteja completamente elucidado, ele é reconhecido e age ativando fagócitos mononucleares (monócitos e macrófagos), que conseqüentemente aumentam sua atividade fagocítica e a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, fator de necrose tumoral (TNF- α), interleucinas (IL-1 β , IL-6,

entre outras), além das prostaglandinas (PGE₂). Sabe-se que a resposta inflamatória é uma aliada ao processo de reparo, entretanto, a secreção descontrolada dessas citocinas induz a expressão de RANKL (ligante do receptor de NF- κ B), um crítico fator de diferenciação dos osteoblastos em osteoclastos, podendo levar à destruição tecidual (Raetz e Whitfield, 2002; Walsh *et al.*, 2006). Assim, uma importante característica para uma medicação intracanal é a neutralização dessas toxinas bacterianas, pois somente o preparo químico-mecânico (com hipoclorito de sódio, por exemplo) não tem se mostrado efetivo em eliminar LPS (De Oliveira *et al.*, 2007).

Idealmente, a medicação intracanal deve promover a eliminação e impedir a proliferação de microrganismos remanescentes, atuar como barreira físico-química contra a infecção ou a reinfecção por microrganismos, reduzir a inflamação perirradicular, neutralizar produtos tóxicos, controlar a reabsorção dentinária inflamatória externa, além de estimular a reparação por tecido mineralizado (Siqueira e Lopes, 1999). Em casos onde o comprometimento pulpar evolui para necrose pulpar o tratamento mais indicado é realizado através da técnica de apicificação, que se baseia na indução do fechamento do forame apical, por meio da deposição de uma barreira de tecido duro, na região apical ou ainda pela indução do desenvolvimento apical, o que se encontra diretamente relacionado à manutenção da bainha epitelial de Hertwig (American Association of Endodontics 2004; Rafter 2005; Soares *et al.*, 2008).

Os materiais sintéticos mais indicados para o tratamento de dentes permanentes com comprometimento pulpar/periapical são o hidróxido de cálcio (HC) e agregado de trióxido mineral (MTA). Diversos trabalhos têm mostrado que estes materiais apresentam biocompatibilidade e atividade antimicrobiana, além de estimular a apicificação em dentes permanentes jovens (Sheehy e Roberts, 1997; Shabahang e Torabinejad, 2000; Rafter, 2005, Parirokh e Torabinejad, 2010, da Silva *et al.*, 2010). Porém, na técnica de apicificação com o hidróxido de cálcio (HC) ocorre um processo chamado de selamento biológico originando a formação de um tecido duro, semelhante ao cimento. Entretanto, a capacidade indutora de mineralização do HC é dependente da manutenção de sua alcalinidade durante todo o período de tratamento, onde são necessária trocas periódicas deste material para que ocorra constante renovação de suas propriedades, principalmente de sua propriedade alcalina, o tratamento pode variar de 8 – 12 meses (Soares *et al.*, 2008). O fato da necessidade de múltiplas sessões pode

aumentar o risco de contaminação, além da formação de paredes dentinárias delgadas e raiz encurtadas, tornando o dente suscetível à fratura (Hargreaves *et al.*, 2013).

Outra técnica utilizada para alcançar a apicificação é através de materiais à base de agregado de trióxido mineral (MTA) sendo empregada por meio da colocação de uma barreira apical artificial (plug de MTA) que permite a obturação do canal radicular na mesma sessão (American Association of Endodontists, 2004). A indicação do MTA tem sido preconizada principalmente em casos onde há a impossibilidade de acompanhamento a longo prazo, e seu efeito tem mostrado induzir a formação da barreira apical, semelhante ao HC (Shabahang *et al.*, 1999). O emprego do MTA também tem sido associado a um menor número de fraturas (Jeeruphan *et al.*, 2012), devido à redução no número de sessões durante o tratamento (Damle *et al.*, 2012; Marí-Beffa *et al.*, 2017).

A técnica de apicificação, seja com HC ou plug de MTA não pode ser considerada completamente biológica, pois não permite a regeneração pulpar e o desenvolvimento radicular completo, tanto em largura quanto em comprimento (Jeeruphan *et al.*, 2012). Independente do material, a apicificação leva ao encurtamento da raiz e à manutenção das paredes dentinárias finas, o que aumenta o risco de fratura radicular no dente permanente jovem (Andreasen *et al.*, 2002; Doyon *et al.*, 2005). Além disso, o contato desses materiais sintéticos com o tecido periapical vital residual pode causar impacto negativo sobre a viabilidade das células da bainha epitelial de Hertwig, o que indubitavelmente inibirá sua capacidade de estimular as células indiferenciadas da papila apical em se diferenciar em odontoblastos (Banchs e Trope, 2004). Embora esses tratamentos frequentemente conduzam à resolução dos sinais e sintomas das doenças pulpares (Sheehy e Roberts, 1997; Bose *et al.*, 2009; Parirokh e Torabinejad, 2010), promovem pouco benefício para a continuidade do desenvolvimento radicular, manutenção da nocicepção pulpar normal e defesa imune esperada para um dente permanente jovem (Ruparel *et al.*, 2012; Althumairy *et al.*, 2014).

Atualmente estão surgindo novas propostas para tratamento de dentes imaturos como alternativas aos tratamentos convencionais, visando a resolução da periodontite apical e mantendo as funções fisiológicas pulpares normais. Uma pasta tripla de antibióticos (metronidazol, ciprofloxacina, minociclina) vem sendo utilizada em diversos estudos clínicos (Banchs e Trope, 2004; Thibodeaud *et al.*, 2007; Jung *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009; Taneja *et al.*, 2010) alcançando bons resultados clínicos, com a eliminação

das bactérias e promoção do reparo dos tecidos periapicais. O primeiro estudo com esta pasta triantibiótica foi realizado por Hoshino *et al.* (1996) que verificaram que nenhuma dessas drogas isoladamente foi eficaz em eliminar bactérias de dentina infectada, polpas infectadas e lesões periapicais, entretanto, em combinação foram capazes de esterilizar todas as amostras. Metronidazol é um composto nitroimidazol que exibe ampla atividade antiprotozoária, antibacteriana contra bacilos Gram-negativos anaeróbios, bacilos Gram-positivos esporulados e cocos anaeróbios. Ciprofloxacina é uma fluoroquinolona que apresenta ação bactericida, principalmente contra Gram-negativas. Minociclina é um derivado semi-sintético da tetraciclina com amplo espectro de ação, similar ao metronidazol (Vijayaraghavan *et al.*, 2012). Uma crítica sobre o uso da pasta de antibióticos refere-se à sua resistência bacteriana. Em amostras de infecções endodônticas crônicas ou agudas, genes de resistência antibiótica foram detectados antes e após tratamento. Os genes mais prevalentes foram blaTEM (24%) (beta-lactâmicos) e ermC (24%) (eritromicina) nos abscessos e tetM (42%) e tetW (29%) (tetraciclinas) em casos assintomáticos. Outra crítica em relação ao uso da pasta tripla antibiótica é em relação ao uso da minociclina, que causa manchamento do dente, devido à sua reação com o cálcio via quelação formando um complexo insolúvel (Tanase *et al.*, 1998) e ainda foi observada uma significativa redução na viabilidade de fibroblastos do ligamento periodontal após sua utilização (Yadlapati *et al.*, 2014).

Produtos naturais derivados de plantas medicinais são fontes abundantes de compostos biologicamente ativos que poderiam ser base para o desenvolvimento de novos medicamentos. Em Odontologia, produtos derivados de plantas estão sendo incorporados em dentifrícios, enxaguatórios e materiais dentários, devido às suas propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas, além de não promoverem resistência antibiótica e serem biocompatíveis em concentrações terapêuticas, criando novas perspectivas biológicas integrando o tratamento odontológico (Hotwani *et al.*, 2014). Estudos têm demonstrado a eficácia antimicrobiana e anti-inflamatória de extratos de plantas isolados e/ou combinados com outras substâncias naturais ou sintéticas contra patógenos da cárie dentária e periodontais (Chandra *et al.*, 2015; Panche *et al.*, 2016). No caso de tratamento de dentes permanentes jovens, fitoterápicos poderiam auxiliar no controle da infecção microbiana e inflamação, estimulando a regeneração tecidual e a completa formação radicular.

Devido à natureza polimicrobiana e a consequente liberação de componentes inflamatórios nas infecções endodônticas, a combinação de drogas poderia tornar possível alcançar melhores resultados de tratamento com doses mais baixas de agentes terapêuticos (Bedran *et al.*, 2014 e 2015). Fitoquímicos são moléculas promissoras que estão sendo estudadas na prevenção e tratamento de doenças bucais, pois atuam tanto na eliminação dos patógenos quanto no controle da resposta inflamatória do organismo (Palaska *et al.*, 2013). Flavonoides são compostos fenólicos encontrados em células vegetais, detectados nas frutas, sementes, nozes, caules e flores, bem como nos derivados das plantas, como chás, vinho, própolis e mel e representam um constituinte comum da dieta humana (Cushnie e Lamb, 2005). Os flavonoides apresentam estrutura química comum, sendo constituídos por dois anéis aromáticos (A e B) unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C. De acordo com as variações no anel C, os flavonoides são divididos em seis classes principais: flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonoides e antocianidinas. Substituições dos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides (Cushnie e Lamb, 2005). Diversas são as propriedades clínicas dos flavonoides já relatadas na literatura, entre elas, atividade antioxidante, inibição enzimática, atividade anti-inflamatória, atividade vascular, estrogênica, anti-tumor e atividade antimicrobiana. Assim, não é surpresa que o interesse pela pesquisa com essas substâncias tem crescido na área biomédica (Harborne e Williams, 2000).

O chá verde é composto por 24 a 40% de flavonoides, incluindo flavanóis, flavonols, flavanonas, e ácidos fenólicos (Nkhili *et al.*, 2009). O galato de epigallocatequina (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) é uma das mais abundantes e importantes catequinas, componente bioativo do chá verde (Harborne e Williams, 2000). O EGCG é produzido a partir da folha da planta *Camellia sinensis* e tem sido consumido por humanos há muitos anos (Saito *et al.*, 2009). Pesquisas mostram os variados efeitos benéficos do EGCG incluindo ação anti-inflamatória, anti-tumoral, diminuição da absorção de gordura, anti-envelhecimento, prevenção e proteção de doenças cardiovasculares, efeitos imunoreguladores e neuroprotetores, além da inibição de infecção por vírus e bactérias (Chacko *et al.*, 2010; Steinmann *et al.*, 2013; Legeay *et al.*, 2015), bem como efeito anticariogênico, auxílio no tratamento da halitose, prevenção e regressão de tumores bucais (Nawrotzki *et al.*, 2012; Morin *et al.*, 2015). Apresentando ainda atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis*, tanto em células

planctônicas como em biofilme (Lee e Tan, 2015). EGCG também pode inibir a adesão de *Streptococcus mutans* de maneira dose-dependente e suprimir a expressão de genes relacionados com a formação de biofilme (Xu *et al.*, 2012). Além de inibir o crescimento de agentes patogênicos bucais, o EGCG reduz a secreção de citocinas pró-inflamatórias por fibroblastos gengivais, células epiteliais, e por células endoteliais (Wheeler *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2009; Hosokawa *et al.*, 2010a e 2010b; Asahi *et al.*, 2014). A presença de EGCG tem reduzido significativamente, de modo dependente da concentração, a expressão de IL-6 e IL-8 em células de polpa dentária expostas ao LPS (Nakanishi *et al.*, 2010). EGCG demonstrou capacidade para inibir a produção citocinas e quimiocinas em fibroblastos, impedindo a fosforilação da MAPK / ERK e vias JNK, componentes chave na transdução de sinais celulares (Hosokawa *et al.*, 2009, 2010a e 2010b).

O *American Cranberry* (*Vaccinium macrocarpon*), também conhecido como oxicoco, é um fruto/planta que apresenta metabolismo secundários bioativos com implicação importante à saúde humana. O Cranberry é um flavonoide polifenólico conhecido por possuir atividade farmacológica e largo potencial terapêutico composto por tipos flavonóis, antocianidinas e de proantocianidinas, bem como ácidos fenólicos (Wang *et al.*, 2017). As Protocianidinas de *Cranberry* (PAC) são oligômeros de Flavan-3-ols que apresentam, além da reconhecida atividade antioxidante, propriedades imunoestimulantes, anti-carcinogênicas, antialérgicas, anti-inflamatórias, antimicrobianas e efeitos cardioprotetores (Fine, 2000). Estudos têm relatado a ação de de proantocianidinas de *cranberry* na inibição da secreção de citocinas inflamatórias pelas células imunes e das mucosas (Bodet *et al.*, 2006; La *et al.*, 2010).

A Protocianidina de Cranberry do tipo A (PAC) apresenta efeito inibitório sobre a adesão e proliferação de bactérias formadoras de biofilme dental (Koo *et al.*, 2010; Feng *et al.*, 2013). Essa atividade biológica foi atribuída à atividade de PAC sobre fatores de virulência específicos de *Streptococcus mutans*, como a inibição da atividade de glicosiltransferases (Gtf) (Gregoire *et al.*, 2007; Yoo, Murata e Duarte, 2011). Outros estudos apontam também benefícios do *Cranberry* na prevenção e tratamento da periodontite, uma doença inflamatória de origem bacteriana que afeta os tecidos de suporte dentário, exercendo potente ação inibitória na formação de biofilme por *Porphyromonas gingivalis* e impedindo significativamente a ligação de *P. gingivalis* a superfícies revestidas com colágeno tipo I, fibrinogênio ou soro humano. Dentre os mecanismos de ação dos PAC de *cranberry* estão a inibição de enzimas proteolíticas

bacterianas, da resposta inflamatória do hospedeiro e da diferenciação e atividade de osteoclastos (Feghali *et al.*, 2011).

Outros agentes biológicos que também apresentam efeito terapêutico são os peptídeos catiônicos antimicrobianos (PCAM) quem vêm sendo estudados em diversos campos da Medicina e, atualmente, na Odontologia (Hölzl *et al.*, 2008; Gorr e Abdolhosseini, 2011; Caiaffa *et al.*, 2017; Sierra *et al.*, 2017). Dentre os PCAMs, o peptídeo catiônico humano (hCAP-18) é a única catelicidina identificada em seres humanos isolada primeiramente em grânulos de neutrófilos. hCAP-18 é produzida também por células epiteliais do pulmão, intestino, cavidade bucal e trato urogenital, sendo encontrada no plasma seminal e plasma sanguíneo. Após a secreção, ocorre a quebra de hCAP-18 pela ação de proteases em pequenos fragmentos de peptídeos RK-31 e KS-30 e em um peptídeo ativo de cadeia longa LL-37, todos com ação antimicrobiana. Esse último fragmento do peptídeo hCAP-18, o LL-37, é um modulador multifuncional da imunidade inata, envolvendo a função antibacteriana, estímulo de angiogênese, cicatrização cutânea e quimiotaxia de células inflamatórias e do sistema imune. LL-37 atenua a produção de citocinas induzidas por LPS e a expressão de quimiocinas por fibroblastos (Jönsson e Nilsson, 2012). A ação antimicrobiana de LL-37 está relacionada à formação de poros na membrana das bactérias e a lise celular, entretanto em altas concentrações (>13 μ M) pode se tóxica para as células eucarióticas (Johansson *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2008; McCormick e Weinberg, 2010). LL-37 tem mostrado excelente ação antimicrobiana contra patógenos orais, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas facultativas ou estritas, como *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *F. nucleatum*, *S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguis*, *S. mitis* e *L. casei* (Ouhara *et al.*, 2005) e fungos, como *C. albicans* (Harder *et al.*, 2001; Wong *et al.*, 2011). Além disso, esses PCAM tem mostrado ação antimicrobiana e atividade neutralizante de LPS de *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis*, *P. intermedia* e *F. nucleatum* para LL-37 (Suphasiroj *et al.*, 2013).

Devido à dificuldade e alto custo da sua síntese, diversos estudos têm proposto reduções e/ou modificações na estrutura dos PCAMs. KR-12 é o menor fragmento com similar atividade antimicrobiana do seu original LL-37 (Wang, 2008). Análogos de KR-12 foram propostos por Jacob *et al.*, (2013) e apresentaram potente ação antimicrobiana contra cepas de *S. aureus* meticilina-resistentes e mantiveram a ação neutralizante contra LPS, sem causar toxicidade às células eucarióticas. Destes, o fragmento KR-12-a5

apresentou a maior atividade antiendotóxica, bastante similar à do próprio LL-37. Caiaffa *et al.*, (2017) mostraram reduzido efeito citotóxico do fragmento KR-12-a5 sobre a viabilidade de fibroblastos da linhagem L-929 e reduzidos valores de MIC/MBC, mostrando sua excelente ação antimicrobiana, além de efeito sobre biofilme de *S. mutans* e *E. faecalis*, importantes microrganismos associados às infecções endodônticas.

Estudos têm apontado que a associação entre os flavonoides ou peptídeos antimicrobianos e flavonoides melhoram seus efeitos antimicrobianos e anti-inflamatórios (Harasstani *et al.*, 2010; Feldman e Grenier, 2012; Bedran *et al.*, 2015). A ação sinérgica entre proantocianidinas e licocalcona A, ambos os flavonoides de *cranberry* e alcaçuz, respectivamente, levou a uma redução do crescimento de biofilme de *P. gingivalis*, bem como a redução da secreção de mediadores pró-inflamatórios em macrófagos induzidos por LPS (Feldman e Granier, 2012). O único estudo encontrado que avaliou sinergismo entre flavonoides e peptídeos antimicrobianos foi conduzido por Bedran *et al.*, (2015) mostrando que a combinação de LL-37 e EGCG ou proantocianidinas reduziu a secreção de várias citocinas induzida por LPS em modelo de co-cultura de células da mucosa bucal.

Baseado na filosofia de se utilizar materiais biocompatíveis com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e ainda que possam estimular a completa formação apical, novos protocolos de tratamento estão surgindo para dentes permanentes jovens (Iglesias-Linares *et al.*, 2013; Moreno-Hidalgo *et al.*, 2013). Assim, o presente trabalho pretende avaliar: 1) o efeito isolado ou combinado do flavonoide galato de epigallocatequina (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) em associação aos peptídeos LL-37 ou KR-12-a5 sobre a viabilidade de fibroblastos da linhagem L-929, sobre cultura planctônica e biofilme simples e misto de bactérias de interesse endodôntico e 2) investigar o efeito sinérgico do galato de epigallocatequina (epigallocatechin-3-gallate, EGCG) e proantocianidinas do oxicoco (A-type cranberry proanthocyanidins, AC-PAC) em combinação com LL-37 ou KR-12-a5 sobre a viabilidade celular, a capacidade de migração e inibição das citocinas em cultura de fibroblastos da linhagem HGF-1, quando estimuladas ou não com LPS.

ANEXO A
REFERÊNCIAS INTRODUÇÃO GERAL

1. Althumairy RI, Teixeira FB, Diogenes A (2014) Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod*, **40**(4):521-5.
2. American Association of Endodontics. Guide to Clinical Endodontics (2004) 4^aed.
3. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC (2002) Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*, **18**(3):134-7.
4. Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, *et al.* (2014) Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *J Appl Microbiol*, **116**:1164–71
5. Banchs F, Trope M (2004) Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*, **30**(4):196-200.
6. Bedran TBL, Spolidorio DP, Grenier D (2015) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol*, **60**(6):845-53.
7. Bedran TBL, Mayer MP, Spolidorio DP, Grenier D (2014) Synergistic anti-inflammatory activity of the antimicrobial peptides human beta-defensin-3 (hBD-3) and cathelicidin (LL-37) in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *PLoS One*, **4**;9(9):e106766.
8. Bhasker SN (1991) Orban's oral histology and embryology, 11th ed. St. Louis: Mosby-Year Book.
9. Bodet C, Chandad F, Grenier D (2006) Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. *J Dent Res*, **85**:235–9.
10. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K (2009) A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod*, **35**(10):1343-9.

11. Byström A, Sundqvist G (1981) Bacteriological evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*, **89**:321-328.
12. Caiaffa KS, Massunari L, Danelon M, Abuna GF, Bedran TBL, Santos-Filho NA, Spolidorio DMP, Vizoto NL, Cilli EM, Duque C (2017) KR-12-a5 is a non-cytotoxic agent with potent antimicrobial effects against oral pathogens. *Biofouling*, **33**(10):807-818.
13. Chacko, S; Thambi PT, Kuttan R, Nishigaki I (2010) Beneficial effects of green tea: A literature review. *Chin Med*, **5**: 13.
14. Chandra S, Chakraborty N, Dasgupta A, Sarkar J, Panda K, Acharya K (2015) Chitosan nanoparticles: A positive modulator of innate immune responses in plants. *Sci Rep*, **16**;5:15195.
15. Chávez De Paz LE, Dahlén G, Molander A, Möller A, Bergenholtz G (2003) Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. *Int Endod J*, **36**(7):500-8.
16. Cushnie TP, Lamb AJ (2005) Detection of galangin-induced cytoplasmic membrane damage in *Staphylococcus aureus* by measuring potassium loss. *J Ethnopharmacol*, **101** (1-3): 243-8.
17. da Silva LA, Nelson-Filho P, da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N (2010) Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **109**(5):779-87.
18. Damle SG, Bhattal H, Loomba A (2012) Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent*, **36** (3): 263-8.
19. de Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC (2007) *In vitro* effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, **104**(1):135-42.
20. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF (2009) Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod*, **35**(5):745-9.

21. Doyon GE, Dumsha T, von Fraunhofer JA (2005) Fracture resistance of human root dentin exposed to intracanal calcium hydroxide. *J Endod*, **31**(12):895-7.
22. Feghali K, Feldman M, La VD, Santos J, Grenier D (2012) Cranberry proanthocyanidins: natural weapons against periodontal diseases. *J Agric Food Chem*. **13**;60(23):5728-35.
23. Feldman M, Grenier D (2012) Cranberry proanthocyanidins act in synergy with licochalcone A to reduce *Porphyromonas gingivalis* growth and virulence properties, and to suppress cytokine secretion by macrophages. *J Appl Microbiol*, **113**(2):438-47.
24. Feng G, Klein MI, Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H (2013) The specific degree-of polymerization of AType proanthocyanidin oligomers impacts *Streptococcus mutans* glucan-mediated adhesion and transcriptome responses within biofilms. *Biofouling*, **29**(6):629-40.
25. Fine AM (2000) Oligomeric proanthocyanidins complexes: history, structure and phytopharmaceutical applications. *Altern Med Rev*, **5**:144-151.
26. Gorr SU, Aldolhosseini M (2011) Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontal*, **38** Suppl 11:126-41.
27. Gregoire S, Singh AP, Vorsa N, Koo H (2007) Influence of cranberry phenolics on glucan synthesis by glucosyltransferases and *Streptococcus mutans* acidogenicity. *J Appl Microbiol*, **103**(5):1960-8.
28. Harasstani OA, Moin S, Tham CL, Liew CY, Ismail N, Rajajendram R, Harith HH, Zakaria ZA, Mohamad AS, Sulaiman MR, Israf DA (2010) Flavonoid combinations cause synergistic inhibition of proinflammatory mediator secretion from lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 cells. *Inflamm Res*, **59**(9):711-21.
29. Harborne JB, Williams CA (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, **55**(6):481-504. Review.
30. Harder J, Bartels J, Christophers E, Schroder JM (2001) Isolation and characterization of human beta -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, **23**;276(8):5707-13.
31. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB (2013) Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod*. **39** (3): 30-43.

32. Hölzl MA, Hofer J, Steinberge P, Pfistershammer K, Zlabinger GJ (2008) Host antimicrobial proteins as endogenous immunomodulators. *Immunol Lett*, **119**(1-2):4-11.
33. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M (1996) *In-vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J*, **29**(2):125-30.
34. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T (2010) Catechins inhibit CXCL10 production from oncostatin M-stimulated human gingival fibroblasts. *J Nutr Biochem*, **21**:659-664.
35. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T (2009) Catechins inhibit CCL20 production in IL-17A-stimulated human gingival fibroblasts. *Cell Physiol Biochem*, **24**:391-396.
36. Hosokawa Y, Hosokawa I, Ozaki K, Nakanishi T, Nakae H, Matsuo T (2010) Tea polyphenols inhibit IL-6 production in tumor necrosis factor superfamily 14-stimulated human gingival fibroblasts. *Mol Nutr Food Res*, **54**(Suppl. 2):S151-8.
37. Hotwani K, Baliga S, Sharma K (2014) Phytodentistry: use of medicinal plants. *J Complement Integr Med*, **11**(4):233-51
38. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrogo E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A (2013) Stem cells in current paediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol*, **58**(3):227-38.
39. Jacob B, Park IS, Bang JK, Shin SY (2013) Short KR-12 analogs designed from human cathelicidin LL37 possessing both antimicrobial and antiendotoxicactivities without mammalian cell toxicity. *J Pept Sci*, **19**(11):700-7.
40. Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM (2012) Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod*, **38** (10): 1330-6.
41. Johansson J, Gudmundsson GH, Rottenberg ME, Berndt KD, Agerberth B (1998) Conformation-dependent antibacterial activity of the naturally occurring human peptide LL-37. *J Biol Chem*, **273**(6):3718-24.

42. Jönsson D, Nilsson BO (2012) The antimicrobial peptide LL-37 is anti-inflammatory and proapoptotic in human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, **47**(3):330-5.
43. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM (2008) Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*, **34**(7):876-87.
44. Koo H, Duarte S, Murata RM, Scott-Anne K, Gregoire S, Watson GE, Singh AP, Vorsa N (2010) Influence of cranberry proanthocyanidins on formation of biofilms by *Streptococcus mutans* on saliva-coated apatitic surface and on dental caries development *in vivo*. *Caries Res*, **44**(2):116-26.
45. La VD, Howell AB, Grenier D (2010) Anti-*Porphyromonas gingivalis* and anti-inflammatory activities of A-type cranberry proanthocyanidins. *Antimicrob Agents Chemother*, **54**:1778–84.
46. Lee AS, Jung YJ, Kim DH, Lee TH, Kang KP, Lee S, *et al.* (2009) Epigallocatechin-3-O-gallate decreases tumor necrosis factor-alpha-induced fractalkine expression in endothelial cells by suppressing NF-kappaB. *Cell Physiol Biochem*, **24**:503–10.
47. Lee P, Tan KS (2015) Effects of Epigallocatechin gallate against *Enterococcus faecalis* biofilm and virulence. *Arch Oral Biol*, **60**(3):393-9.
48. Legeay S, Rodier M, Fillon L, Faure S, Clere N (2015) Epigallocatechin Gallate: A Review of Its Beneficial Properties to Prevent Metabolic Syndrome. *Nutrients*, **7**(7): 5443–5468.
49. Bedran TBL, Palomari Spolidorio D, Grenier D (2015) Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate and cranberry proanthocyanidins act in synergy with cathelicidin (LL-37) to reduce the LPS-induced inflammatory response in a three-dimensional co-culture model of gingival epithelial cells and fibroblasts. *Arch Oral Biol*, **60**(6):845-53.
50. Marí-Beffa M, Segura-Egea JJ, Díaz-Cuenca A (2017) Regenerative Endodontic Procedures: A Perspective from Stem Cell Niche Biology. *J Endod*, **43** (1): 52-62.
51. McCormick TS, Weinberg A (2010) Epithelial cell-derived antimicrobial peptides are multifunctional agents that bridge innate and adaptive immunity. *Periodontology 2000*, **54**(1):195–206.

52. Moreno-Hidalgo MC, Caleza-Jimenez C, Mendoza-Mendoza A, Iglesias-Linares A. (2013) Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis. *Int Endod J*, Jul 3.
53. Morin MP, Bedran TB, Fournier-Larente J, Haas B, Azelmat J, Grenier D (2015) Green tea extract and its major constituent epigallocatechin-3-gallate inhibit growth and halitosis-related properties of *Solobacterium moorei*. *BMC Complement Altern Med*, **10**;15:48.
54. Nakanishi T, Mukai K, Yumoto H, Hirao K, Hosokawa Y, Matsuo T (2010) Anti-inflammatory effect of catechin on cultured human dental pulp cells affected by bacteria-derived factors. *Eur J Oral Sci*, **118**(2):145-50.
55. Narotzki B, Reznick AZ, Aizenbud D, Levy Y (2012) Green tea: a promising natural product in oral health. *Arch Oral Biol*, **57**(5):429-35.
56. Nkhili E, Tomao V, El Hajji H, El Boustani ES, Chemat F, Dangles O (2009) Microwave-assisted water extraction of green tea polyphenols. *Phytochem Anal*, **20**(5):408-15.
57. Ouhara K, Komatsuzawa H, Yamada S, Shiba H, Fujiwara T, Ohara M, Sayama K, Hashimoto K, Kurihara H, Sugai M (2005) Susceptibilities of periodontopathogenic and cariogenic bacteria to antibacterial peptides, {beta}-defensins and LL37, produced by human epithelial cells. *J Antimicrob Chemother*, **55**(6):888-96.
58. Palaska I, Papathanasiou E, Theoharides TC (2013) Use of polyphenols in periodontal inflammation. *Eur J Pharmacol*, **15**;720(1-3):77-83.
59. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR (2016) Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*, **29**;5:e47.
60. Parirokh M, Torabinejad M (2010) Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review-Part I: chemical, physical, and antibacterial properties. *J Endod*. **36**(1):16-27.
61. Raetz CR, Whitfield C (2002) Lipopolysaccharide endotoxins. *Annu Rev Biochem*, **71**:635-700.
62. Rafter M (2005) Apexification: a review. *Dent Traumatol*, **21**(1):1-8.

63. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A (2012) Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*, **38**(10):1372-5.
64. Saito ST, Gosmann G, Pungartnik C, Brendel M (2009) Green tea extract-patents and diversity of uses. *Recent Pat Food Nutr Agric*, **1**(3):203-15.
65. Shabahang S, Torabinejad M (2000) Treatment of teeth with open apices using mineral trioxide aggregate. *Pract Periodontics Aesthet Dent*. **12**(3):315-20.
66. Shabahang S, Torabinejad M, Boyne PP, Abedi H, McMillan P (1999) A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod*, **25** (1): 1-5.
67. Sheehy EC, Roberts GJ (1997) Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Br Dent J*, **11;183**(7):241-6.
68. Sierra JM, Fusté E, Rabanal F, Vinuesa T, Viñas M (2017) An overview of antimicrobial peptides and the latest advances in their development. *Expert Opin Biol Ther*, **17**(6):663-676.
69. Siqueira JF Jr, Lopes HP. (1999) Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J*, **32**(5):361-9. Review.
70. Siqueira JF Jr, Rôças IN (2009) Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*, **88**(11):969-81.
71. Soares J, Santos S, César C, Silva P, Sá M, Silveira F, Nunes E (2008) Calcium hydroxide induced apexification with apical root development: a clinical case report. *Int Endod J*, **41** (8): 710-9.
72. Steinmann J, Buer J, Pietschmann T, Steinmann E (2013) Anti-infective properties of epigallocatechin-3-gallate (EGCG), component of green tea. *Br J Pharmacol*, **168**(5):1059-73. Review.
73. Suphasiroj W, Mikami M, Shimomura H, Sato S (2013) Specificity of antimicrobial peptide LL-37 to neutralize periodontopathogenic lipopolysaccharide activity in human oral fibroblasts. *J Periodontol*, **84**(2):256-64.
74. Tanase S, Tsuchiya H, Yao J, Ohmoto S, Takagi N, Yoshida S (1998) Reversed-phase ion-pair chromatographic analysis of tetracycline antibiotics. Application to discolored teeth. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, **20**;706(2):279-85.

75. Taneja S, Kumari M, Parkash H (2010) Nonsurgical healing of large periradicular lesions using a triple antibiotic paste: A case series. *Contemp Clin Dent*, **1**(1):31-5.
76. Thibodeaud B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M (2007) Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*, **33**(6):680-9.
77. Vijayaraghavan R, Mathian VM, Sundaram AM, Karunakaran R, Vinodh S (2012) Triple antibiotic paste in root canal therapy. *J Pharm Bioallied Sci*, **4**(Suppl 2):S230-3.
78. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, Choi Y (2006) Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev. Immunol*, **24**:33-63.
79. Wang G (2008) Structures of human host defense cathelicidin LL-37 and its smallest antimicrobial peptide KR-12 in lipid micelles. *J Biol Chem*, **21**;283(47):32637-43.
80. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT (2010) Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the evitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*, **36** (1):56-63.
81. Wang Y, Johnson-Cicalese J, Singh AP, Vorsa N (2017) Characterization and quantification of flavonoids and organic acids over fruit development in American cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) cultivars using HPLC and APCI-MS/MS. *Plant Sci*, **262**:91-102.
82. Wheeler DS, Catravas JD, Odoms K, Denenberg A, Malhotra V, Wong HR (2004) Epigallocatechin-3-gallate, a green tea-derived polyphenol, inhibits IL-1 beta-dependent proinflammatory signal transduction in cultured respiratory epithelial cells. *J Nutr*, **134**:1039-44.
83. Wong JH, Ng TB, Legowska A, Rolka K, Hui M, Cho CH (2011) Antifungal action of human cathelicidin fragment (LL13-37) on *Candida albicans*. *Peptides*. **32**(10):1996-2002.
84. Xu X, Zhou XD, Wu CD (2012) Tea catechin epigallocatechin gallate inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation by suppressing *gtf* genes. *Arch Oral Biol*, **57**(6):678-83.

85. Yadlapati M, Souza LC, Dorn S, Garlet GP, Letra A, Silva RM (2014) Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J*, **47** (8): 769-75.
86. Yoo S, Murata RM, Duarte S (2011) Antimicrobial traits of tea- and cranberry-derived polyphenols against *Streptococcus mutans*. *Caries Res*, **45**(4):327-35.
87. Zhang Z, Cherryholmes G, Shively JE (2008) Neutrophil secondary necrosis is induced by LL-37 derived from cathelicidin. *J Leukoc Biol*, **84**(3):780-8.