

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/05/2018.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia

Juliana de Carvalho Machado

**Efeito da combinação de antibióticos e sinvastatina sobre
microrganismos de interesse endodôntico e na expressão de
marcadores odontoblásticos**

Araçatuba – SP

2016



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba
Faculdade de Odontologia

Juliana de Carvalho Machado

**Efeito da combinação de antibióticos e sinvastatina sobre
microrganismos de interesse endodôntico e na expressão de
marcadores odontoblásticos**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência Odontológica, Área Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cristiane Duque

Araçatuba – SP

2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M149e Machado, Juliana de Carvalho.
Efeito da combinação de antibióticos e sinvastatina sobre microrganismos de interesse endodôntico e na expressão de marcadores odontoblásticos / Juliana de Carvalho Machado. - Araçatuba, 2016
68 f. : il. ; tab. + 1 CD-ROM

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Orientadora: Profa. Cristiane Duque

1. Antibacterianos 2. Biofilmes 3. Técnicas de cultura de células 4. Polpa dentária 5. Sinvastatina I. Título

Black D24
CDD 617.67

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha mãe Ana, à minha irmã Luísa, à minha avó Hilda e ao meu noivo Bruno. Pessoas especiais que estiveram sempre ao meu lado, me apoiando e sendo meus maiores incentivadores, mesmo frente a tantas dificuldades. Obrigada por tudo! Amo vocês!!!

Agradecimentos

Em primeiro lugar agradeço a Deus por ter permitido com que eu chegasse até aqui. Por ter me dado condições de superar todas as dificuldades que surgiram ao longo dessa caminhada e hoje poder concluir mais esta etapa em minha vida.

À minha mãe Ana, a minha avó Hilda e ao meu avô Nery (vivo para sempre em nossos corações) por não terem medido esforços para que eu tivesse uma excelente formação pessoal e profissional. Sempre estiveram ao meu lado e me ajudaram em cada passo, me orientando em todas as decisões e me apoiando sempre. Mesmo quando para a realização de mais uma meta seria necessário mora r tão longe de casa e estar ausente em alguns momentos importantes para nós.

Ao meu noivo Bruno por sua compreensão, paciência e apoio. Por me ajudar a superar os dias difíceis e estar sempre ao meu lado sem deixar que a distância de mais de 1000km fosse sentida.

À minha irmã Luísa, meus familiares e amigos pela torcida e carinho.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Cristiane Duque, por sua dedicação em transmitir seus conhecimentos, incentivo, amizade e confiança. Nesses anos de convivência, vendo seu trabalho, aprendi o verdadeiro sentido da palavra “Mestre”.

A cada um dos professores do Departamento de Endodontia e Odontopediatria da FOA por transmitirem seus conhecimentos e contribuírem para minha formação profissional.

À Kelly Limi Aida e Loiane Massunari pelo apoio e amizade ao longo do curso. E em seus nomes, à todos os colegas da pós-graduação.

À amiga Alessandra Lopes, pelo apoio e companheirismo, que dividiu comigo não só o apartamento aqui em Araçatuba, como também a saudade de casa, as tristezas e alegrias.

Ao Gabriel Abuna pela grande ajuda nos testes de Microscopia Confocal em Piracicaba.

Ao Prof.Dr.Carlos Alberto de Souza Costa e suas alunas Leopoldina Almeida, Diana Soares e Fernanda Basso, da UNESP de Araraquara, por terem me recebido tão bem e ajudado no desenvolvimento das análises de cultura de células.

À Maria Luiza Loesh, pelo acolhimento em sua casa nos meses de pesquisa em Araraquara, pelo apoio e amizade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

Aos amigos da Primeira Igreja Batista em Casimiro de Abreu, que sempre estiveram orando por mim e enviando mensagens de incentivo durante esses anos.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

MACHADO, JC. **Efeito da combinação de antibióticos e sinvastatina sobre microrganismos de interesse endodôntico e na expressão de marcadores odontoblásticos.** Araçatuba, 2016. 68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica – Área de Endodontia) Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

Resumo

Terapias biológicas tem buscado novas substâncias/protocolos que promovam a eliminação microbiana e induzam ou estimulem a regeneração pulpar e o desenvolvimento completo radicular de dentes permanentes jovens com processos patológicos pulpares. Os objetivos do estudo foram avaliar a atividade antimicrobiana/antibiofilme de algumas combinações de antibióticos sobre microrganismos de interesse endodôntico e analisar o efeito da combinação de antibióticos com melhor ação antimicrobiana associada à sinvastatina na expressão de marcadores odontoblásticos em células da polpa dental humana (CPDH). A atividade antimicrobiana dos seguintes antibióticos: Metronidazol (ME), Ciprofloxacina (CI), Minociclina (MI), Doxicilina (DO) e Fosfomicina (FO), isolados ou em combinação dupla (ME+CI, ME+MI, ME+DO, ME+FO, CI+MI, CI+DO, CI+FO, DO+FO, MI+FO) ou tripla (ME+CI+MI, ME+CI+FO, ME+MI+FO, ME+CI+DO, ME+DO+FO, CI+DO+FO, CI+MI+FO) foram testados contra *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* e *Candida albicans* em condições planctônicas. Biofilmes mono-espécie de *E. faecalis* e biofilmes em dual-espécies de *E. faecalis* and *C. albicans* foram preparados em blocos de dentina para testar a atividade antibiofilme das combinações de antibióticos com os melhores resultados microbiológicos. O efeito antibiofilme das combinações antibióticas sobre biofilme de *E. faecalis* dentro dos túbulos dentinários foi também avaliada por microscopia confocal. Culturas de CDPH foram expostas à combinação antibiótica com melhor resultado microbiológico e sinvastatina e determinada a viabilidade celular, atividade da fosfatase alcalina (ALP), deposição de nódulos de mineralização e expressão de DSPP (sialofosfoproteína dentinária), importante marcador odontoblástico de mineralização dentinária. Os dados foram

analisados estatisticamente, considerando $p < 0,05$. Todas as combinações de antibióticos reduziram o crescimento bacteriano, exceto por CI+DO e DO+FO para *A. israelii*. ME+CI+MI e ME+MI+FO inibiram significativamente o crescimento de *A. israelii* e *E. faecalis*, e ME+MI+FO eliminou *S. mutans*. ME+MI+FO e ME+CI+FO tiveram o melhor efeito contra biofilme de *E. faecalis*, em mono ou dual-espécies e dentro dos túbulos dentinários. CI e ME+CI+FO afetaram a viabilidade das células pulpares, em 1 e 7 dias. A atividade de ALP aumentou com a presença de sinvastatina para todos os grupos, exceto para CI e ME+CI+FO. Grupos contendo sinvastatina mostram maior deposição de nódulos de mineralização e expressão de DSPP que os grupos sem sinvastatina. Pode-se concluir que a combinação de antibióticos tripla ME+CI+FO teve efeito marcante contra os microrganismos endodônticos, em condições planctônicas e em biofilme. A sinvastatina estimulou a expressão de marcadores odontoblásticos de mineralização dentinária pelas HDPC; entretanto, seu efeito foi reduzido pela presença da CI.

Palavras-chave: antibacterianos, biofilme, técnicas de cultura de células, polpa dentária, sinvastatina

MACHADO, JC. Combined effect of antibiotics and simvastatin on endodontic microorganisms and the expression of odontoblast markers. Araçatuba, 2015.68p. Dissertação (Mestrado em Ciência Odontológica – Área de Endodontia) Faculdade de Odontologia de Araçatuba, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2016.

Abstract

Biological therapies have searching for substances/protocols, which promote microbial elimination and induce or stimulate pulp regeneration and completion of apical root development in young permanent teeth with pulp pathological processes. The objectives of this study were to evaluate the antimicrobial/anti-biofilm activity of some antibiotics combinations on endodontic microorganisms and the effect of the combination of antibiotics with the best antimicrobial action associated with simvastatin on expression of odontoblast markers by human dental pulp cells (HDPC). The antimicrobial activity of the following antibiotics: Metronidazole (ME), Ciprofloxacin (CI), Minocycline (MI), Doxycycline (DO) and Fosfomicin (FO), either alone or in double (ME+CI, ME+MI, ME+DO, ME+FO, CI+MI, CI+DO, CI+FO, DO+FO, MI+FO) or triple combinations (ME+CI+MI, ME+CI+FO, ME+MI+FO, ME+CI+DO, ME+DO+FO, CI+DO+FO, CI+MI+FO) were tested against *Streptococcus mutans*, *Enterococcus faecalis*, *Actinomyces israelii* and *Candida albicans* in planktonic conditions. Mono-species biofilm of *E. faecalis* and dual-species biofilms of *E. faecalis* and *C. albicans* were prepared in dentin blocks to test the anti-biofilm activity of antibiotic combinations with the best microbiological results. Antibiofilm effect of antibiotic combination on *E. faecalis* biofilm inside dentin tubules was also evaluated by confocal microscopy. Cultures of HDPC were exposed to the antibiotic combination with the best antimicrobial effect and simvastatin and determined cell viability, alkaline phosphatase activity, deposition of mineralization nodules and expression of *Dspp* (dentin sialophosphoprotein), important odontoblast markers of dentin mineralization. Data were analyzed statistically, considering $p < 0.05$. All antibiotic combinations reduced statistically the growth of bacteria tested, except by CI+DO and DO+FO for *A. israelii*. ME+CI+MI and ME+MI+FO inhibited significantly growth of *A.*

israelii and *E. faecalis*, and ME+MI+FO eliminated *S. mutans*. ME+MI+FO and ME+CI+FO had the best effect against *E. faecalis* biofilm, in mono and dual-species biofilms and inside dentin tubules, similar to CHX. CI and ME+CI+FO affected HDPC viability, 1 and 7 days. ALP activity increased with the presence of simvastatin for all groups, except by CI and ME+CI+FO. Groups containing simvastatin had higher mineralized nodule deposition and higher DSPP expression than groups without simvastatin. It can be concluded that triple antibiotic combination of ME+CI+FO had remarkable effect against endodontic microorganisms, in planktonic and biofilm conditions. Simvastatin stimulated the expression of odontoblast markers of dentin mineralization by HDPC; however, its effect was reduced in the presence of CI.

Keywords: anti-bacterial agents, biofilm, cell culture, dental pulp, simvastatin

Lista de figuras

Figure 1 - Antimicrobial activity of double combinations of antibiotics after 24h of exposure, in planktonic conditions	34
Figure 2 - Antimicrobial activity of triple combinations of antibiotics after 24h of exposure, in planktonic conditions	35
Figure 3 - Effect of triple combination of antibiotics on mono-species biofilm (<i>E. faecalis</i>) and dual-species biofilm (<i>E. faecalis</i> and <i>C. albicans</i>) formed in dentin slices	36
Figure 4 - Effect of antibiotic in triple combination on <i>E. faecalis</i> biofilm formed inside dentin tubules, observed by confocal microscopy	37
Figure 5 - HDPC viability after 1 and 7 days of antibiotic exposure, using Alamar blue assays.....	38
Figure 6 - Percentage of ALP activity of HDPC for each group of antibiotic containing or not simvastatin (SIM -or SIM+), after 14 days of exposure	39
Figure 7 - Alizarin red assays. Panel of mineralized nodule deposition for each group of antibiotic containing or not simvastatin (SIM- or SIM+) after 21 days of exposure. Light-microscopy images (10X) are from representative areas of HDPC in the wells. Groups with CI presented the lowest levels of nodule deposition	40
Figure 8 - PCR assays. Levels of mRNA for DSPP gene of HDPC after 21 days of antibiotic exposure in the presence or not of simvastatin (SIM-or SIM+)	41

Lista de tabelas

Table 1 - Antibiotic combinations and controls	25
Table 2 - Minimal inhibitory concentration (MIC) and Minimal lethal concentration (MLC) values obtained by antibiotics and controls after 24 h of exposure, in planktonic conditions	34

Lista de abreviaturas

MTA = Agregado de Trióxido Mineral

ME = Metronidazol

CI = Ciprofloxacina

MI = Minociclina

DO = Doxiciclina

SIM = Sinvastatina

CHX = Clorexidina

ANF = Anfotericina

MIC = Mínima Concentração Inibitória

MLC = Mínima Concentração Letal

ALP = Fosfatase Alcalina

HDPC = human dental pulp cells (células da polpa humana)

DSPP = Sialofosfoproteína dentinária

GAPDH = gliceralde- hude-3-phosphate dehydrogenase (gene endógeno)

CLSM = Microscopia Confocal de Varredura à Laser

DAP = Pasta Diantibiótica

TAP = Pasta Triantibiótica

Sumário

Introdução Geral	16
Artigo	21
Abstract	22
Introduction	23
Material and Methods	24
Results	33
Discussion	42
Conclusion	45
Acknowledgement	46
References	46
Referências – Introdução Geral	50
Anexos	57

Introdução Geral

O tratamento de danos pulpares irreversíveis em dentes com rizogênese incompleta tem sido considerado um desafio clínico. Estes dentes, além de não apresentarem a formação completa da raiz, apresentam paredes finas, frágeis e divergentes que tornam o tratamento mais difícil e delicado (AL ANSARY *et al.*, 2009). Atualmente, as terapias endodônticas tradicionais para esses casos consistem na apicificação, que pode ser realizada de duas maneiras. A primeira utiliza um anteparo de MTA (Agregado de Trióxido Mineral) na porção apical, permitindo a obturação posterior com gutta-percha e a segunda, a mais utilizada, se refere às trocas periódicas de hidróxido de cálcio, como medicação intracanal até o fechamento apical (Rafter, 2005). Para ambas as formas de tratamento a instrumentação vigorosa é necessária, o que pode fragilizar as paredes dentinárias, além de eliminar qualquer remanescente celular no ápice radicular e a possibilidade de revascularização e, portanto, ausência do término da formação radicular. Além disso, o tratamento com hidróxido de cálcio envolve um grande tempo de trocas do medicamento até a formação de uma barreira apical, que tem se apresentado com consistência porosa e não contínua (SHAH *et al.*, 2008; IGLESIAS-LINARES *et al.*, 2013).

As técnicas de tratamento endodôntico atuais possibilitam uma redução substancial na quantidade e na diversidade de microrganismos presentes no interior dos canais radiculares. Porém, é importante considerar que para o preparo químico-mecânico, são indicadas substâncias químicas irrigadoras como o hipoclorito de sódio ou a clorexidina, que em concentrações antimicrobianas, não são consideradas biocompatíveis, podendo inviabilizar as células tronco presentes na região periapical e impedindo a aderência na superfície dentinária e sua proliferação para posterior secreção de dentina (RING *et al.*, 2008). 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). Entretanto, diversos autores têm detectado uma média de 5 espécies bacterianas, atingindo em torno de 10^2 a 10^5

células/canal, mesmo após o preparo químico-mecânico, seguido ou não de medicação intracanal (BYSTRÖM E SUNDQVIST, 1985; SJÖGREN *et al.*, 1997; VIANNA *et al.*, 2006; SAKAMOTO *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2007a,b). Comparando esses dados com os obtidos para as infecções endodônticas primárias, nas quais são verificadas até 30 espécies bacterianas e contagem até 10^8 células por canal infectado (SIQUEIRA *et al.*, 2004b, SIQUEIRA E RÔÇAS, 2005b; VIANNA *et al.*, 2006b; SAKAMOTO *et al.*, 2007; SIQUEIRA *et al.*, 2007b), nota-se uma redução substancial da diversidade/nível microbiano, entretanto ainda há espécies que resistem após os tratamentos atuais.

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 frequentes 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. alactolyticus*, lactobacilos (*L. paracasei*, *L. acidophilus*), *Enterococcus faecalis*, entre outros (SIQUEIRA E RÔÇAS, 2009).

Antimicrobianos naturais ou sintéticos estão sendo empregados como alternativas às medicações intracanaís tradicionais, com o intuito de eliminar as bactérias e suas toxinas e não agredir os tecidos periapicais adjacentes, buscando a regeneração tecidual e a completa formação radicular apical em dentes imaturos (IGLESIAS-LINARES *et al.*, 2013; MORENO-HIDALGO *et al.*, 2014). O tratamento de regeneração/revascularização pulpar é uma abordagem alternativa biológica para o tratamento de dentes com comprometimento pulpar e rizogênese incompleta. Este tratamento, ao contrário da técnica de apicificação, permite a continuação do desenvolvimento da raiz (BÜYÜKBAYRAM *et al.*, 2014). As pesquisas na área de revascularização iniciaram nas décadas de 50 e 60 com estudos voltados para dentes reimplantados ou transplantados (MYERS E FLANAGAN, 1958; ÖSTBY, 1961). Estes estudos mostraram que para que ocorra a regeneração tecidual, é importante a formação do coágulo sanguíneo, pois este irá induzir a formação do tecido conectivo

fibroso no interior dos canais radiculares. Sendo assim, para o sucesso dos protocolos de revascularização é essencial a assepsia do canal radicular (ÖSTBY, 1961).

Há algumas teorias que buscam explicar o mecanismo da revascularização em dentes permanentes imaturos. Alguns autores acreditam que estes dentes apresentam células pulpares ainda vitais no ápice radicular e estas poderiam se diferenciar em odontoblastos por estímulo dos restos epiteliais de Mallassez e sintetizar dentina (BANCHS E TROPE, 2004). Outra teoria refere-se à sobrevivência de células indiferenciadas da polpa dental que poderiam se aderir às paredes internas do canal radicular, se diferenciando em odontoblastos e depositando dentina, terminando, assim, a formação do ápice radicular (GRONTHOS *et al.*, 2002). Uma terceira teoria estaria relacionada à presença de células indiferenciadas provenientes da papila apical ou da medula óssea no interior do canal radicular, que após a indução de sangramento na região periapical, poderiam proliferar e na presença de fatores de crescimento do coágulo, se diferenciar em células odontoblásticas sintetizadoras de dentina (WANG *et al.*, 2007).

A maioria dos protocolos de revascularização utiliza a irrigação passiva com hipoclorito de sódio associada à medicação intracanal com uma pasta composta de três antibióticos (THIBODEAU E TROPE, 2007; REYNOLDS *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2010; IWAYA *et al.*, 2011). O objetivo deste tratamento é criar um ambiente apropriado no interior do espaço do canal radicular, incluindo a ausência de bactérias e tecido necrótico pulpar e permitir a presença de uma estrutura de suporte e um vedamento coronal. Isso promove o repovoamento das células-tronco, a regeneração do tecido pulpar e a conclusão da formação do ápice radicular (BÜYÜKBAYRAM *et al.*, 2014).

Sato *et al.* (1993) e Hoshino *et al.* (1996) foram os primeiros investigadores a utilizarem a pasta triantibiótica contendo metronidazol, ciprofloxacina e minociclina. Hoshino *et al.* (1996) avaliaram a eficácia antibacteriana destes medicamentos isoladamente e em combinação contra bactérias de dentina infectada, polpas infectadas e periodontite apical e observaram que nenhum deles sozinho poderia eliminar todas as bactérias, mas em combinação eram suficientemente potentes para erradicar as bactérias em todas as amostras. Em 1996, Sato *et al.* observaram que esta mesma combinação foi eficaz contra bactérias em camadas profundas do canal radicular. Desde então, outros pesquisadores vem utilizando esta mesma associação

antibiótica em diversos estudos, em sua maioria de caráter clínico, como parte de protocolos de revascularização (BANCHS E TROPE, 2004; THIBODEAUD *et al.*, 2007; JUNG *et al.*, 2008; DING *et al.*, 2009; TANEJA *et al.*, 2010) alcançando bons resultados, com a eliminação das bactérias e promoção do reparo dos tecidos periapicais.

O metronidazol é um composto nitroimidazol que exibe ampla atividade antiprotozoária, antibacteriana contra bacilos e cocos anaeróbios. A ciprofloxacina é uma fluoroquinolona que apresenta ação bactericida, principalmente contra Gram-negativas. A minociclina é um derivado semi-sintético da tetraciclina com amplo espectro de ação, similar ao metronidazol (VIJYAGARAGHAVAN *et al.*, 2012). O uso da pasta contendo esses três antibióticos vem gerando algumas discussões com relação à resistência bacteriana, descoloração da coroa e possível reação alérgica (COHENCA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2010; AKCAY *et al.*, 2014). Os genes de resistência antibiótica mais prevalentes detectados em amostras de infecções endodônticas crônicas foram os das tetraciclinas: tetM (42%) e tetW (29%). As tetraciclinas também podem causar manchamento dentário, devido à sua reação com o cálcio via quelatação formando um complexo insolúvel (TANASE *et al.*, 1998). Assim, novas alternativas à minociclina têm sido estudadas para a pasta triantibiótica, como a fosfomicina, um potente inibidor da proteína MurA, envolvida na biogênese da parede celular, com amplo espectro de ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (TROPE, 2010).

Embora a ação antimicrobiana seja uma propriedade primordial de uma medicação intracanal, é interessante que, nos casos de dentes permanentes com ápice aberto, essa medicação também tenha a capacidade de induzir células remanescentes a se diferenciarem em odontoblastos e a produzirem dentina interradicular para o término da formação radicular.

As estatinas são inibidores específicos da redutase da coenzima A 3-hydroxy-3-methylglutaryl, amplamente utilizadas como agente redutor de colesterol na prevenção e tratamento de aterosclerose. Elas apresentam certos efeitos adicionais, como a ação anti-inflamatória e aumento da função das células endoteliais vasculares e a angiogênese (KWAK *et al.*, 2000; SAKODA *et al.*, 2006). Vários estudos têm sido realizados para verificar os efeitos benéficos das estatinas, principalmente a sinvastatina, em Odontologia. Efeitos pós-cirúrgicos têm sido apontados em alguns estudos que utilizaram a sinvastatina, como o auxílio na remodelação óssea,

osseointegração em implantes de titânio e aumento do reparo de áreas de fraturas (LIU *et al.*, 2009; DU *et al.*, 2009; SALLAM *et al.*, 2011). Em Periodontia, a sinvastatina tem mostrado reduzir a perda óssea alveolar e a mobilidade dentária em casos de periodontite crônica (PRADEEP *et al.*, 2010; FAJARDO *et al.*, 2010). Em Endodontia, estudos têm mostrado efeito na regeneração dentinária e óssea, aumentando o crescimento celular e a diferenciação odontogênica (OKAMOTO *et al.*, 2009; LEE *et al.*, 2012). Varalskshmi *et al.* (2013) avaliaram a ação da sinvastatina e atorvastatina associadas ao carreador alpha-TCP (fosfato tricálcico) e verificaram que a atividade da fosfatase alcalina - ALP, a expressão de marcadores de mineralização (Sialofosfoproteína Dentinária (DSPP), Proteína da Matriz Dentinária-1 (DMP-1), Fosfatase Alcalina (ALP)) e a proliferação/diferenciação celular foi maior no grupo tratado com as estatinas que no grupo com MTA, indicando o efeito indutor de diferenciação de células pulpares desse material. Assim, os objetivos do estudo foram avaliar a atividade antimicrobiana/antibiofilme de algumas combinações de antibióticos sobre microrganismos de interesse endodôntico e analisar o efeito da combinação de antibióticos com melhor ação antimicrobiana associada à sinvastatina na expressão de marcadores odontoblásticos em células da polpa dental humana. Esse estudo pretende contribuir para a área de Endodontia com o estudo de novas alternativas biológicas que auxiliem na eliminação da infecção e favoreçam a regeneração tecidual de dentes permanentes imaturos.

Referências – Introdução Geral¹

AKCAY, M.; ARSLAN, H.; TOPCUOGLU, H.S; TUNCAY, O. Effect of Calcium Hydroxide and Double and Triple Antibiotic Pastes on the Bond Strength of Epoxy Resin–based Sealer to Root Canal Dentin. **J. Endod.**, v. 40, n. 10, p. 1663-1667, oct. 2014.

AL ANSARY, M.A.; DAY, P.F.; DUGGAL M.S.; BRUNTON, P.A. Interventions for treating traumatized necrotic immature permanent anterior teeth: inducing a calcific barrier & root strengthening. **Dent Traumatol.**, v.25, p.367-379, 2009.

BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of Immature Permanent Teeth With Apical Periodontitis: New Treatment Protocol? **J. Endod.**, v. 30, n. 4, p. 196-200, apr. 2004.

BÜYÜKBAYRAM, I.K.; ÖZALP, S.; AYTUGAR, E.; AYDEMIR, S. Regenerative Endodontic Treatment of an Infected Immature Dens Invaginatus with the Aid of Cone-Beam Computed Tomography: Case Report. **Case Rep Dent.**, v.30, oct. 2014. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229997/>>. Acesso em: 17 jun. 2015.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriological evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 89, p. 321-328, 1981.

BYSTRÖM, A.; SUNDQVIST, G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. **Int. Endod. J.**, v. 18, n. 1, p. 35-40, jan. 1985.

CHÁVEZ DE PAZ, L.E.; DAHLÉN, G.; MOLANDER, A.; MÖLLER, A.; BERGENHOLTZ, G. Bacteria recovered from teeth with apical periodontitis after antimicrobial endodontic treatment. **Int. Endod. J.**, v. 36, n. 7, p. 500-508, jul. 2003.

¹ Referências de acordo com as normas da ABNT.

COHENCA, N.; HEILBORN, C.; JOHNSON, J.D.; FLORES, D.S.H.; ITO, I.Y.; SILVA, L.A.B. Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth. **Oral Surg. Oral Med. Oral Phatol. Oral Radiol. Endod.**, v. 109, n. 1, p. 42-46, jan. 2010.

DING, R.Y.; CHEUNG, G.S.; CHEN, J.; YIN,X.Z.; WANG, Q.Q.; ZHANG, C.F. Pulp Revascularization of Immature Teeth With Apical Periodontitis: A Clinical Study. **J. Endod.**, v. 35, n. 5, p. 745-749, may 2009.

DU, Z.; CHEN, J.; YAN, F.; XIAO, Y. The effects of simvastatin on bone healing around titanium implants in osteoporotic rats. **Clin. Oral Imp. Res.**, v. 20, n. 2, p. 145-150, feb. 2009.

FAJARDO, M.E.; ROCHA, M.L.; SANCHEZ-MARIN, F.J.; ESPINOSA-CHÁVES, E.J. Effect of atorvastatin on chronic periodontitis: a randomized pilot study. **J. Clin. Periodontol.**, v. 37, n. 11, p. 1016-1022, nov. 2010.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L.W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P.G.; SHI, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. **J. Dent. Res.**, v. 81, n. 8, p. 531-535, aug. 2002.

HOSHINO, E.; KURIHARA-ANDO, N.; SATO, I. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. **Int. Endod. J.**, v. 29, p. 125-130, 1996.

IGLESIAS-LINARES, A.; YÁÑEZ-VICO, R.M.; SÁNCHEZ-BORREGO, E.; MORENO-FERNÁNDEZ, A.M.; SOLANO-REINA, E.; MENDOZA-MENDOZA, A. Stem cells in current paediatric dentistry practice. **Arch. Oral Biol.**, v. 58, n. 3, p. 227-238, mar. 2013.

IWAYA, S.; IKAWA, M.; KUBOTA, M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. **Dent. Traumatol.**, v. 27, p. 55-58, 2011.

JUNG, Y.; LEE, S.J.; HARGREAVES, K.M. Biologically Based Treatment of Immature Permanent Teeth with Pulpal Necrosis: A Case Series. **J. Endod.**, v. 34, n. 7, p. 876-887, jul. 2008.

KIM, J.H.; KIM, Y.; SHIN, S.J.; PARK, J.W.; JUNG, Y. Tooth Discoloration of Immature Permanent Incisor Associated with Triple Antibiotic Therapy: A Case Report. **J. Endod.**, v. 36, n. 6, p. 1086–1091, jun. 2010.

KWAK, B.; MULHAUPT, F.; MYIT, S.; MACH, F. Statins as a newly recognized type of immunomodulator. **Nat. Med.**, v. 6, n. 12, p. 1399-1402, dec. 2000.

LEE, S.Y.; MIN, K.S.; CHOI, G.W.; PARK, J.H.; PARK, S.H.; LEE, S.I.; KIM, E.C. Effects of simvastatin and enamel matrix derivative on Portland cement with bismuth oxide-induced growth and odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. **J. Endod.**, v. 38, n. 3, p. 405-410, mar. 2012.

LIU, C.; WU, Z.; SUN, H.C. The effect of simvastatin on mRNA expression of transforming growth factor- β , bone morphogenetic protein-2 and vascular endothelial growth factor in tooth extraction socket. **Int. J. Oral Sci.**, v. 1, n. 2, p. 90-98, jun. 2009.

MORENO-HIDALGO, M.C.; CALEZA-JIMENEZ, C.; MENDOZA-MENDOZA, A.; IGLESIAS LINARES, A. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 47, n. 4, p. 321-331, apr. 2014.

MYERS, H.I.; FLANAGAN, V.D. A comparison of the results obtained from transplantation and replantation experiments using Syrian hamster teeth. **Anat. Rec.**, v. 130, n. 3, p. 497-513, mar. 1958.

OKAMOTO, Y.; SONOYAMA, W.; ONO, M.; AKIYAMA, K.; FUJISAWA, T.; OSHIMA, M.; TSUCHIMOTO, Y.; MATSUKA, Y.; YASUDA, T.; SHI, S.; KUBOKI, T. Simvastatin induces the odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells in vitro and in vivo. **J. Endod.**, v. 35, n. 3, p. 367-372, mar. 2009.

ÖSTBY, B.N. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. **Acta. Odontol. Scand.**, v. 19, p. 324-353, dec. 1961.

PRADEEP, A.R.; THORAT, M.S. Clinical effect of subgingivally delivered simvastatin in the treatment of patients with chronic periodontitis: a randomized clinical trial. **J. Periodontol.**, v. 81, n. 2, p. 214-222, feb. 2010.

RAFTER, M. Apexification: a review. **Dent. Traumatol.**, v. 21, n. 1, p.1-8, feb. 2005.

REYNOLDS, K.; JOHNSON, J.D.; COHENCA, N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. **Inter. Endod. J.**, v. 42, n. 1, p. 84–92, jan. 2009.

RING, K.C.; MURRAY, P.E.; NAMEROW, K.N.; KUTTLER, S.; GARCIA-GODOY, F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. **J. Endod.**, v. 34, n. 12, p. 1474–1479, dec. 2008.

SAKAMOTO, M.; SIQUEIRA JR, J.F.; RÔÇAS, I.N.; BENNO Y. Bacterial reduction and persistence after endodontic treatment procedures. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 22, n. 1, p. 19-23, feb. 2007.

SAKODA, K.; YAMAMOTO, M.; NEGISHI, Y.; LIAO, J.K.; NODE, K.; IZUMI, Y. Simvastatin decreases IL-6 and IL-8 production in epithelial cells. **J. Dent. Res.**, v. 85, n. 6, p. 520-523, jun. 2006.

SALLAM, M.M. The influence of oral administration of simvastatin on delayed nonunion facial fractures: clinical study. **J. Am. Sci.**, v. 7, p. 812-818, 2011.

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.**, v. 29, p. 118-124, mar. 1996.

SATO, T.; HOSHINO, E.; UEMATSU, H.; NODA, T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 8, n. 3, p. 172-176, jun. 1993.

SHAH, N.; LOGANI, A.; BHASKAR, U.; AGGARWAL, V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. **J. Endod.**, v. 34, n. 10, p. 919–925, oct. 2008.

SIQUEIRA, J.F.JR.; RÔÇAS, I.N.; ROSADO, A.S. Investigation of bacterial communities associated with asymptomatic and symptomatic endodontic infections by denaturing gradient gel electrophoresis fingerprinting approach. **Oral Microbiol. Immunol.**, v. 19, n. 6, p. 363-370, dec. 2004.

SIQUEIRA, J.F.JR.; RÔÇAS, I.N. Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2 - Redefining the endodontic microbiota. **J. Endod.**, v. 31, n. 7, p. 488-498, jul. 2005.

SIQUEIRA, J.F.JR.; PAIVA, S.S.; RÔÇAS, I.N. Reduction in the cultivable bacterial populations in infected root canals by a chlorhexidine-based antimicrobial protocol. **J. Endod.**, v. 33, n. 5, p. 541-547, may. 2007a.

SIQUEIRA, J.F.JR.; MAGALHÃES, K.M.; RÔÇAS, I.N. Bacterial reduction in infected root canals treated with 2.5% NaOCl as an irrigant and calcium hydroxide/camphorated paramonochlorophenol paste as an intracanal dressing. **J. Endod.**, v. 33, n. 6, p. 667-672, jun. 2007b.

SIQUEIRA, J.F.JR.; RÔÇAS, I.N. Diversity of endodontic microbiota revisited. **J. Dent. Res.**, v. 88, n. 11, p. 969-981, nov. 2009.

SJÖGREN, U.; FIGDOR, D.; PERSSON, S.; SUNDQVIST, G. Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. **Int. Endod. J.**, v. 30, n. 5, p. 297-306, sep. 1997.

TANASE, S.; TSUCHIYA, H.; YAO, J.; OHMOTO, S.; TAKAGI, N.; YOSHIDA, S. Reversed-phase ion-pair chromatographic analysis of tetracycline antibiotics. Application to discolored teeth. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.**, v. 20, n. 706(2), p. 279-285, mar. 1998.

TANEJA, S.; KUMARI, M.; PARKASH, H. Nonsurgical healing of large periradicular lesions using a triple antibiotic paste: a case series. **Contemp. Clin. Dent.**, v. 1, n. 1, p. 31-35, jan. 2010.

THIBODEAU, B.; TROPE, M. Pulp Revascularization of a Necrotic Infected Immature Permanent Tooth: Case Report and Review of the Literature. **Pediatric Dentistry**, v. 29, n. 1, p.47-50, jan/feb 2007.

THIBODEAU, B.; TEIXEIRA, F.; YAMAUCHI, M.; CAPLAN, D.J.; TROPE, M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. **J. Endod.**, v. 33, n. 6, p. 680-689, jun. 2007.

TROPE M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. **Dent. Clin. North. Am.**, v. 54, n. 2, p. 313-324, apr. 2010.

VARALAKSHMI, P.R.; KAVITHA, M.; GOVINDAN, R.; NARASIMHAN, S. Effect of statins with α -tricalcium phosphate on proliferation, differentiation, and mineralization of human dental pulp cells. **J. Endod.**, v. 39, n. 6, p. 806-812, jun. 2013.

VIANNA, M.E.; CONRADS, G.; GOMES, B.P.; HORZ, H.P. Identification and quantification of archaea involved in primary endodontic infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, n. 4, p. 1274-1282, apr. 2006.

VIJAYARAGHAVAN, R.; MATHIAN, V.M.; SUNDARAM, A.M.; KARUNAKARAN, R.; VINODH, S. Triple antibiotic paste in root canal therapy. **J. Pharm. Bioallied. Sci.**, v. 4, n. 2, p.230-233, aug. 2012.

WANG, Q.; LIN, X.J.; LIN, Z.Y.; LIU, G.X.; SHAN, X.L. Expression of vascular endothelial growth factor in dental pulp of immature and mature permanent teeth in human. **Shanghai Kou Qiang Yi Xue**, v. 16, n. 3, p. 285-289, jun. 2007.