

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta
tese será disponibilizado somente
a partir de 19/02/2019.

Loiane Massunari

Efeito de flavonoides sobre microrganismos de
interesse endodôntico e sua influência na expressão
de marcadores de mineralização

Araçatuba - SP

2018

Loiane Massunari

Efeito de flavonoides sobre microrganismos de
interesse endodôntico e sua influência na expressão
de marcadores de mineralização

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

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane
Duque

Araçatuba - SP

2018

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação – FOA / UNESP

M422e Massunari, Loiane.
Efeito de flavonoides sobre microrganismos de interesse endodôntico e sua influência na expressão de marcadores de mineralização / Loiane Massunari. - Araçatuba, 2018
152f. : il. ; tab.

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

1. Flavonoides 2. Testes de sensibilidade microbiana
3. Dentinogênese 4. Osteogênese 5. Técnicas de cultura de células I. T.

Black D24
CDD 617.67

Responsável: Claudio Hideo Matsumoto – CRB-8/5550

Dedicatória

À Deus

Meu criador

Sempre em primeiro lugar

À minha família

Pai, Mãe, Ni, Glau, Jhone, Mia e Márcio

Nada teria sentido sem vocês!!!

Agradecimentos Especiais

À Deus

Por estar sempre comigo, guiando os meus passos e pensamentos;

Pelo seu amor e misericórdia perante os meus erros;

Por seus ensinamentos que nunca me faltaram.

“Ao único Deus, nosso Salvador, mediante Jesus Cristo, Senhor nosso, glória, magestade, império e soberania, antes de todas as eras, e agora, e por todos os séculos. Amém” Judas 1:25

Aos meus pais Jorge e Elenice

Pelo amor incondicional;

Por toda a dedicação e cuidados;

Pelas correções e conselhos sempre oportunos;

Por sempre me proporcionarem muito mais do que precisei;

Por me aguardarem aos finais de semana sempre com muito amor e carinho.

Pessoas essenciais na minha formação, os responsáveis por cada conquista minha, vocês sempre serão as minhas melhores referências de integridade, honestidade e dedicação. Amo vocês!!

Aos meus irmãos Nicole e Glauber

Pelo amor e cuidados;

Por serem tão presentes;

Pelos momentos únicos;

Por me ouvirem e me aconselharem.

Os maiores presentes da minha vida, juntos nós passamos por muitos momentos, aprendemos e crescemos. Nosso amor é incomparável, inexplicável e eterno. Vocês realmente me completam! Amo vocês!!

Ao meu noivo Márcio

Pelo amor e carinho;

Pelos conselhos e cuidados;

Pelos momentos únicos que tivemos e ainda teremos.

Você realmente entrou na minha vida para acrescentar. Sempre me encorajando e apoiando nos momentos difíceis. Quero você sempre ao meu lado!

Às minhas avós Mineco e Rosa

(in memoriam)

Pela companhia e cuidados;

Pelos ensinamentos transmitidos,

Por tudo que fizeram pela nossa família.

Vocês sempre serão grandes exemplos para mim, donas dos corações mais puros e bondosos que Deus me permitiu amar. Guardarei cada ensinamento por toda a minha vida, buscando sempre ser uma pessoa melhor.

À minha cunhada Jaqueline

Pela amizade;

Pelos momentos de alegria;

Por ser tão presente e cuidadosa.

Você já faz parte da nossa família, sempre muito atenciosa e disposta a ajudar.

À Faculdade de Odontologia de Araçatuba - Unesp

Nas pessoas dos professores, Dr. Wilson Roberto Poi digníssimo Diretor e, Dr. João Eduardo Gomes Filho digníssimo Vice-Diretor.

À minha orientadora Prof. Dra. Cristiane Duque

Por toda ajuda durante a elaboração desse trabalho, pelas sugestões e auxílio sempre que precisei. A senhora sempre esteve disponível para me ajudar, me orientando e buscando extrair o meu melhor. O aprendizado não foi apenas técnico, terá sempre a minha admiração e gratidão.

Aos meus colegas de Pós-Graduação da Endodontia, Farmacologia e Pediatría

Pela amizade, convívio, ajuda e experiências trocadas.

À minha professora Dra Ana Cláudia Okamoto

Pela orientação durante a graduação e no trabalho de conclusão de curso. A senhora me inspirou a entrar na pós-graduação; agradeço cada ensinamento transmitido e conselho dado. Lembro como se fosse hoje, a senhora me incentivando a participar de congressos e fazer aulas de inglês. Será sempre um exemplo para mim.

À minha professora Dra Daniela Micheline dos Santos

Pela orientação durante a iniciação científica, sempre orientando com muito amor e carinho, muito obrigada por toda a paciência e ensinamentos.

À minha amiga Índia

Por ter me acompanhado e ensinado os primeiros passos na cultura de células, sempre muito centrada e disposta a ajudar. Agradeço também as conversas e momentos de descontração durante todo esse período de pós-graduação. Sua amizade foi um presente para mim.

À minha amiga Paula

Por todas as conversas, conselhos e carinho. Quantas vezes você me lembrou que o maior significado disso tudo é Deus, me acalmando em momentos difíceis sempre com palavras sábias e de muito carinho. Mesmo distante, sempre se fez presente quando precisei, agradeço a Deus por ter te colocado em meu caminho durante a pós-graduação.

As minhas amigas Gabry, Juliana, Annelise e Livia

Pela amizade, carinho, conversas e conselhos. Estarei sempre torcendo por cada uma de vocês e espero tê-las sempre por perto.

Aos docentes da disciplina de Endodontia da FOA - 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. Luciano Tavares Ângelo Cintra, Prof. Dr. Rogério Castilho Jacinto e Prof. Dr. Gustavo Sivieri Araújo.

Pelos ensinamentos transmitidos e contribuição na minha formação profissional.

À Prof. Dr^a Sandra Helena Penha de Oliveira

Por ter aberto as portas do seu laboratório, me permitindo realizar parte desse trabalho.

Agradeço o carinho, disponibilidade e sugestões.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto de Souza Costa

Por ter me recebido em seu laboratório, me permitindo realizar parte desse trabalho. Sou muito grata por todos os ensinamentos e carinho transmitidos durante esse período. O senhor realmente inspira todos à sua volta, não somente pelo saber, mas também pelo lado humano e íntegro que possui.

Às meninas do Laboratório de Patologia Experimental e Biomateriais

Pelo ótimo convívio, ensinamentos e ajuda sempre que precisei.

À querida Malu

Por ter me recebido em sua casa durante todo o período que precisei, sempre com muito carinho e disponibilidade para me ajudar. Muito obrigada pelos ensinamentos no laboratório, ajuda durante os experimentos, conversas e conselhos que tornou a minha estadia em Araraquara muito melhor do que eu poderia imaginar. Você sempre estará guardada no meu coração.

À Giovana

Por ter me ensinado a executar todos os protocolos que realizei em Araraquara, sempre com muito carinho e atenção. Você foi essencial para a finalização desse trabalho.

Ao curso de pós-graduação em Ciência Odontológica da FOA

Na pessoa do coordenador Prof. Dr. Luciano Tavares Ângelo Cintra.

Aos funcionários do Departamento de Odontopediatria

Ricardo, Mário e Luisinho.

Pela amizade e ajuda sempre que precisei;

Por manterem a organização no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Endodontia

Nelci, Elaine e Peterson.

Pela amizade e ajuda sempre que precisei.

Aos funcionários da biblioteca da FEA

Ana Cláudia, Luzia, Ivone, Cláudio, Maria Cláudia, Luiz, Denise e Izamar.

Pela atenção e disponibilidade.

Aos funcionários da sessão de Pós Graduação da FEA

Valéria, Cristiane e Lilian.

Pelo profissionalismo e disponibilidade.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

Pela concessão da bolsa de estudo (Processo 2015/00812-0).

Muito Obrigado!!!

Resumo

Massunari, L. **Efeito de flavonoides sobre microrganismos de interesse endodôntico e sua influência na expressão de marcadores de mineralização.** [Tese] Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia de Araçatuba. Araçatuba, 2018.

Resumo

O tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens representa um grande desafio clínico devido a presença de paredes dentinárias finas, divergentes ou paralelas e ápice aberto, o que dificulta a desinfecção e a execução dos procedimentos convencionais. Terapias de regeneração endodôntica envolvem o uso de materiais capazes de promover uma desinfecção eficaz sem causar citotoxicidade, além de induzir a diferenciação de células-tronco ou bioestimular células remanescentes do tecido pulpar mesmo após a injúria. Nesse contexto, os flavonoides, polifenóis presentes em frutas e vegetais, poderiam ser agentes interessantes para o tratamento endodôntico de dentes imaturos devido a sua amplitude terapêutica. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano, citotóxico e indutor de mineralização de flavonoides com finalidade de aplicação endodôntica. Este trabalho de tese foi dividido em três capítulos. O capítulo 1 avaliou a toxicidade dos flavonoides taxifolina, crisina, pinocembrina e galangina sobre fibroblastos pelo ensaio de MTT, a atividade antimicrobiana pela determinação da concentração inibitória e bactericida mínima, e a ação antibiofilme do flavonoide com melhor efeito antimicrobiano, por meio de ensaios em placas de poliestireno e em dentina radicular bovina por meio da análise por microscopia confocal. Os resultados mostraram que o flavonoide taxifolina não foi tóxico para os fibroblastos em nenhuma das concentrações analisadas, enquanto que os flavonoides crisina, pinocembrina e galangina apresentaram efeitos citotóxicos. Crisina, pinocembrina e galangina não apresentaram efeito antimicrobiano frente *E. faecalis* and *S. mutans* nas concentrações testadas. A taxifolina foi capaz de inibir todas as bactérias testadas, eliminar biofilmes de *E. faecalis* e *S. mutans* em placas de poliestireno e reduzir significativamente o biofilme de *E. faecalis* em túbulos dentinários. O capítulo 2 avaliou a citotoxicidade do flavonoide taxifolina e o seu potencial sobre a indução de marcadores de mineralização dentinária (produção de fosfatase alcalina - ALP, nódulos de mineralização – NM e expressão dos genes DSPP – sialofosfoproteína dentinária e

DMP-1 – proteína da matriz dentinária - 1) em células semelhantes a odontoblastos MDPC-23, após tratamentos de 24, 72h e contínuo. A taxifolina não apresentou citotoxicidade em nenhum dos três tipos de tratamento analisados. Todas as concentrações do tratamento de 24h e as concentrações de 10 e 5 μ M do tratamento de 72h aumentaram a atividade de ALP. A formação de NM aumentou com os tratamentos de taxifolina à 10 μ M em ambos os tratamentos de 24 e 72h, e à 5 μ M no tratamento de 24h. A expressão de DMP-1 aumentou com o tratamento de taxifolina em ambos os tratamentos de 24 e 72h, enquanto que a de DSPP aumentou apenas com o tratamento de 72h na concentração de 5 μ M. O capítulo 3 avaliou a citotoxicidade da taxifolina, e o seu potencial sobre a indução de marcadores de mineralização óssea (ALP, NM e expressão dos genes ALP e colágeno 1 - Col-1) em células semelhantes a osteoblastos Saos-2, após tratamentos de 24, 72h e contínuo. Os resultados mostraram que os tratamentos com taxifolina nas concentrações de 10, 5 e 1 μ M não foram citotóxicos em nenhum dos períodos analisados. O tratamento de 72h da taxifolina à 10 μ M foi capaz de aumentar a atividade de ALP e a formação de NM, além de aumentar a expressão de Col-1 após 13 dias. O tratamento de 24h da taxifolina na concentração de 10 μ M aumentou a expressão de ALP após 6 dias. Conclui-se que a taxifolina é um flavonoide com potencial uso para o tratamento endodôntico de dentes permanentes jovens, devido à sua ação antimicrobiana/antibiofilme, baixa citotoxicidade e capacidade de estimular a mineralização em odontoblastos e osteoblastos.

Palavras-chave: Flavonoides, testes de sensibilidade microbiana, dentinogênese, osteogênese, técnicas de cultura de células.

Abstract

Massunari, L. **Effect of flavonoids on endodontic microorganisms and their influence on the expression of mineralization markers.** [Thesis] São Paulo State University (Unesp), School of Dentistry, Araçatuba, 2018.

Abstract

The endodontic treatment of young permanent teeth represents a great clinical challenge due to the presence of thin, divergent or parallel dentin walls and the open apex that makes it difficult to disinfect and perform conventional endodontic procedures. Endodontic regeneration therapies involve the use of materials capable of promoting effective disinfection without causing cytotoxicity, in addition to inducing differentiation of stem cells or biostimulating remaining pulp tissue cells even after injury. In this context, the flavonoids, polyphenols present in fruits and vegetables, could be interesting agents for the endodontic treatment of immature teeth due to the wide therapeutic use. Thus, the objective of the present study was to evaluate the antimicrobial, cytotoxic effects and capacity of mineralization induction of flavonoids for endodontic application. This thesis was divided into three chapters. The chapter 1 evaluated the toxicity of taxifolin, chrysin, pinocembrin and galangin flavonoids on fibroblasts by the MTT method, antimicrobial activity by determining the minimum inhibitory and bactericidal concentrations and analyzed the antibiofilm action of the flavonoid with the best antimicrobial effect, by means of the biofilm assays in polystyrene plates and in bovine root dentin and confocal microscopy analysis. The results showed that the flavonoid taxifolin was not toxic on fibroblasts in any tested concentration, while chrysin, pinocembrin and galangin flavonoids showed cytotoxic effects. Chrysin, pinocembrin and galangin showed no antimicrobial effect against *E. faecalis* and *S. mutans* in any tested concentrations. Taxifolin was able to inhibit all tested bacteria, to eliminate *E. faecalis* and *S. mutans* biofilms on polystyrene plates and significantly reduce *E. faecalis* biofilms from the dentin tubules. The chapter 2 evaluated the cytotoxicity of taxifolin and its potential on the induction of dentin mineralization markers (alkaline phosphatase production - ALP, mineralization nodules - MN and expression of genes DSPP - dentin sialophosphoprotein and DMP-1 - dentin matrix protein - 1) on odontoblast-like cells MDPC-23, after treatments of 24, 72h and continuous. Taxifolin did not present cytotoxicity at any of the three types of

treatments analyzed. All concentrations of 24h-treatment and 10 and 5 μ M of 72h-treatment increased ALP activity. NM formation increased with taxifolin treatments at 10 μ M in both 24 e 72h treatments, and at 5 μ M in the 24h-treatment. Expression of DMP-1 increased with taxifolin in both 24 e 72h-treatments, whereas DSPP expression increased only with 72h-treatment at 5 μ M. The chapter 3 evaluated the cytotoxicity of taxifolin and its potential on the induction of bone mineralization markers (ALP, NM and expression of ALP and collagen 1 -Col-1 genes) on Saos-2 osteoblast-like cells, after treatments of 24, 72h and continuous. The results showed that taxifolin treatments at 10, 5 and 1 μ M were not cytotoxic in any of the periods analyzed. The 72h-treatment of taxifolin at 10 μ M was able to increase ALP activity and NM formation, in addition to increasing Col-1 expression after 13 days. The 24h-treatment of taxifolin at 10 μ M increased ALP expression after 6 days. It is concluded that taxifolin is a flavonoid with potential use for endodontic treatment of young permanent teeth due to its antimicrobial/antibiofilm action, low cytotoxicity and ability to stimulate mineralization in odontoblasts and osteoblasts.

Keywords: Flavonoids, microbial sensitivity tests, dentinogenesis, osteogenesis, cell culture techniques.

Lista de Abreviaturas

Lista de abreviaturas

A. israelii – *Actinomyces israelii*

ALP – Fosfatase alcalina (*alkaline phosphatase*)

ANOVA – Análise de variância (*analysis of variance*)

BHI – Infusão cérebro e coração (*brain heart infusion*)

BSA – Albumina do soro bovino (*bovine serum albumin*)

C. albicans – *Candida albicans*

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar (*complementary deoxyribonucleic acid*)

CFU – Unidades formadoras de colônia (*colony-forming unit*)

CH – Hidróxido de cálcio (*calcium hydroxide*)

CHX – Digluconato de clorexidina (*chlorhexidine digluconate*)

CLSI – Instituto de padrões clínicos e laboratoriais (*Clinical and Laboratory Standard Institute*)

CLSM – Microscopia confocal de varredura a laser (*confocal laser scanning microscopy*)

CO₂ – Gás carbônico (*carbon dioxide*)

Col-1 – Colágeno 1 (*collagen 1*)

Ct – Ciclo limiar (*Threshold cycle*)

CT – Tratamento contínuo (*continuous treatment*)

d – Dias (*days*)

DAP – Pasta biantibiótica (*double antibiotic paste*)

$\Delta\Delta Ct$ – Delta delta ciclo limiar (*delta delta threshold cycle*)

DMEM – Meio de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco Modified Eagle's Medium*)

DMP-1 – Proteína da matriz dentinária (*dentin matrix protein – 1*)

DMSO – Dimetilsulfóxido (*dimethyl sulfoxide*)

DPSCs – Células-tronco da polpa dentária (*Dental pulp stem cells*)

DSPP – Sialofosfoproteína dentinária (*dentin sialophosphoprotein*)

E. coli – *Escherichia coli*

E. faecalis – *Enterococcus faecalis*

EGCG – Epigallocatequina galato (*Epigallocatechin gallate*)

FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (*São Paulo Research Foundation*)

FBS – Soro fetal bovino (*Fetal bovine serum*)

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz (*Oswaldo Cruz Foundation*)

FOA – Faculdade de Odontologia de Araçatuba (*School of Dentistry, Araçatuba*)

g – Aceleração da gravidade (*Gravitational acceleration*)

g/mL – Gramas por mililitros (*Grams per milliliters*)

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*)

h – Horas (*Hours*)

HDPCs – Células da polpa dentária humana (*Human dental pulp cells*)

HGF – Fibroblastos gengivais humanos (*Human gingival fibroblasts*)

IL- 1 – Interleucina 1 (*Interleukin 1*)

IL-17 – Interleucina 17 (*Interleukin 17*)

IL-1 β – Interleucina 1 beta (*Interleukin 1 beta*)

IL-6 – Interleucina 6 (*Interleukin 6*)

ISO – Organização internacional de normalização (*International Organization for Standardization*)

L929 – Linhagem celular de fibroblastos de camundongo (*Murine fibroblast cell line*)

LDH – Lactato desidrogenase (*Lactate dehydrogenase*)

Log – Logaritmo (*Logarithm*)

MBC – Concentração bactericida mínima (*Minimum bactericidal concentration*)

MDPC-23 – Células da papila dentária de camundongo (*Mouse dental papilla cells*)

mg/mL – Miligramas por mililitros (*Milligrams per milliliters*)

MIC – Concentração inibitória mínima (*Minimum inhibitory concentration*)

min – Minutos (*Minutes*)

mm – Milímetros (*Millimeters*)

mM – Milimolar (*Millimolar*)

mmol/L – Milimol por litro (*Milimol per liter*)

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro (*Messenger ribonucleic acid*)

MSA – Ágar mitis salivarius (*Mitis salivarius agar*)

MTA – Agregado de trióxido mineral (*Mineral trioxide aggregate*)

MTT – Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

n – Tamanho da amostra (*Sample size*)

NF- κ B – Fator nuclear Kappa beta (*Nuclear factor kappa beta*)

nm – Nanômetros (*Nanometers*)

NM – Nódulos de mineralização (*Mineralization nodule*)

$^{\circ}\text{C}$ – Grau Celsius (*Degrees Celsius*)

OD – Densidade óptica (*Optical density*)

OH – Radical hidroxila (*Hydroxyl radical*)

PDSCs – Células-tronco do ligamento periodontal (*Human periodontal ligament stem cells*)

qPCR – Reação da polimerase em cadeia (*Quantitative Polymerase Chain Reaction*)

RANK - Receptor ativador do fator nuclear Kappa beta (*Receptor activator of nuclear factor-kappa beta*)

RANKL - Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa beta (*Receptor activator of nuclear factor-kappa beta ligand*)

RE – Regeneração endodôntica (*Regenerative Endodontics*)

RET – Terapias de regeneração endodôntica (*Regenerative endodontic therapies*)

RNA – Ácido ribonucleic (*Ribonucleic acid*)

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. mutans – *Streptococcus mutans*

Saos-2- Linhagem de células semelhantes a osteoblastos humanos (*Human osteoblast-like cell line*)

SD = Desvio padrão (*Standard deviation*)

SHED – Células-tronco de dentes decíduos exfoliados humanos (*Stem cells from human exfoliated deciduous teeth*)

TAP – Pasta triantibiótica (*Triple antibiotic paste*)

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa (*Tumor necrosis factor alpha*)

U/L – Unidades por litro (*Units per liter*)

U/mL – Unidades por mililitros (*Units per milliliters*)

UNESP – Universidade Estadual Paulista (*São Paulo State University*)

VPT – Terapia de vitalidade pulpar (*Vital pulp therapy*)

µg/mL – Microgramas por mililitros (*Micrograms per milliliters*)

µL – Microlitros (*Microliters*)

µm – Micrometros (*Micrometers*)

µM – Micromolar (*Micromolar*)

Lista de Figuras

Lista de Figuras

Capítulo 1

Figure 1. Mean (bars) of the percentage of cell viability of fibroblasts from L929 line after exposure to different concentrations of flavonoids, using MTT assays.....58

Figure 2. Bacterial recovery (Log CFU+1) after 24h of taxifolin and chlorhexidine digluconate (CHX) treatments (10x MBC) on 48h-growth biofilm.....59

Figure 3. Representative CLSM images (63x) of *E. faecalis* biofilms inside dentin tubules after 48h of the treatments59

Figure 4. Means (bars-standard deviation) of the percentage of dead cells obtained after CLSM analysis of *E. faecalis* biofilm.....60

Capítulo 2

Figure 1. Cell viability immediately after 24 and 72 h of treatments with different concentrations of taxifolin, using MTT assays.79

Figure 2. Cell viability of cells after 6 and 13 days of the three forms of treatment (24h, 72h, and continuous treatment) with taxifolin, using MTT assays.....80

Figure 3. Alkaline phosphatase (ALP) activity of cells after 6 days of the three forms of treatment with taxifolin.....81

Figure 4. Mineralization ability of cells after 13 days of the three forms of treatment with taxifolin, using alizarin red staining.....81

Figure 5. Representative images of alizarin red staining showing mineralization ability of MDPC-23 cells after 13 days of taxifolin treatment.....82

Figure 6. Expression of dentin matrix protein - 1 (A) and dentin sialophosphoprotein (B) from MDPC-23 cells after 6 and 13 days of treatment with taxifolin.....	83
---	----

Capítulo 3

Figure 1. Cell viability immediately after 24 and 72h of treatments with different concentrations of taxifolin, using MTT assays	101
---	-----

Figure 2. Cell viability of cells after 6 and 13 days of the three forms of treatment (24h, 72h and continuous treatment) with taxifolin, using MTT assays	101
---	-----

Figure 3. Alkaline phosphatase (ALP) activity of cells after 6 days of the three forms of treatment with taxifolin.....	102
--	-----

Figure 4. Mineralization ability of cells after 13 days of the three forms of treatment with taxifolin, using alizarin red staining.....	102
---	-----

Figure 5. Representative images of alizarin red staining showing mineralization ability of Saos-2 cells after 13 days of taxifolin treatments.....	103
---	-----

Figure 6. Expression of alkaline phosphatase (A) and collagen-1 (B) from Saos-2 cells after 6 and 13 days of treatment with taxifolin.....	104
---	-----

Lista de Tabelas

Lista de Tabelas

Capítulo 1

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimal bactericidal concentration (MBC) of flavonoids.....	58
--	----

Capítulo 2

Table 1. Description of groups chosen for the present study.....	79
---	----

Capítulo 3

Table 1. Description of groups chosen for this study.....	100
--	-----

Table 2. Nucleotides sequence of primers used for each selected gene.....	100
--	-----

Sumário

Sumário

Introdução geral	29
Proposição	36
Capítulo 1	38
<i>Anti-biofilm and cytotoxic effect of flavonoids intended for endodontic purposes</i>	38
Capítulo 2	62
<i>Cytotoxicity and potential of taxifolin, a catechol-type flavonoid, to induct mineralization markers in odontoblast-like cells</i>	62
Capítulo 3	85
<i>Effect of Taxifolin on viability and mineralization markers of osteoblast-like cells</i>	85
Conclusão	106
Referências Bibliográficas	108
Anexo A	117
<i>Guidelines for Publishing Papers in the Biofouling</i>	117
Anexo B	121
<i>Guidelines for Publishing Papers in the International Endodontic Journal</i>	121
Anexo C	135
<i>Guidelines for Publishing Papers in the Archives of Oral Biology</i>	135
Anexo D	143
<i>Comitê de Ética no Uso de Animais</i>	143
Anexo E	144
<i>Protocolos Experimentais</i>	144

Introdução Geral

Introdução geral

Após a erupção do dente permanente na cavidade bucal ainda são necessários aproximadamente 3 anos para o desenvolvimento completo das raízes e o fechamento dos respectivos ápices radiculares (Bhasker 1991). Desta forma, durante esta fase, a ocorrência de traumatismos dentários ou lesões de cárie que comprometam a vitalidade do tecido pulpar, podem interromper a formação da raiz, resultando na presença de paredes dentinárias finas, divergentes ou paralelas e ápice aberto, o que dificultará a execução dos procedimentos endodônticos convencionais, vindo a comprometer o resultado do tratamento a longo prazo (Rafter 2005, Iglesias-Linares *et al.* 2013). Além disso, nesses casos de dentes permanentes jovens, além da necessidade de um tratamento que promova a descontaminação do sistema de canais radiculares, é desejável que esse permita a continuação do desenvolvimento radicular, bem como a recuperação dos tecidos periapicais quando já estiverem comprometidos (Hargreaves *et al.* 2013).

Durante muitos anos, o tratamento de dentes permanentes com rizogênese incompleta baseou-se na vitalidade do tecido pulpar afetado. Assim, para dentes que apresentam vitalidade pulpar tem se indicado procedimentos, como a pulpotomia, que consiste na remoção da polpa infectada e manutenção da polpa radicular, estimulando o desenvolvimento fisiológico contínuo e o término da formação radicular pelo processo de apicogênese. Os casos de dentes que apresentam vitalidade pulpar, porém o tecido pulpar encontra-se inflamado irreversivelmente, bem como os casos de dentes que apresentam necrose pulpar indica-se a 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 2003; Rafter 2005; Soares *et al.* 2008).

Na técnica de apicificação, o hidróxido de cálcio (HC) ainda é o material mais empregado, permitindo que ocorra o selamento biológico pela formação de um tecido duro, semelhante ao cimento. Entretanto, a capacidade indutora de mineralização do

HC é dependente da manutenção da alcalinidade do mesmo, durante todo o período de tratamento, que varia de 8 – 12 meses (Soares *et al.* 2008). Sendo assim, são necessárias trocas periódicas do material, visando renovar a sua propriedade alcalina. Além da necessidade de múltiplas sessões, o que aumenta o risco de contaminação; a apicificação resulta na formação de paredes dentinárias delgadas e desenvolvimento radicular incompleto, tornando o dente suscetível à fratura (Hargreaves *et al.* 2013).

A técnica de apicificação também pode ser empregada por meio da colocação de uma barreira apical artificial - constituída por materiais à base de agregado de trióxido mineral (MTA) - que permite a obturação do canal radicular logo após o protocolo de descontaminação (American Association of Endodontists, 2003). O MTA tem sido indicado principalmente em casos onde há a impossibilidade de acompanhamento a longo-prazo, e tem se mostrado capaz de induzir a formação da barreira apical, semelhantemente ao HC (Shabahang *et al.* 1999). Além da redução no número de sessões durante o tratamento (Damle *et al.* 2012, Marí-Beffa *et al.* 2017), o emprego do MTA também tem sido associado a um menor número de fraturas (Jeeruphan *et al.* 2012). Entretanto, a técnica de apicificação, seja com HC ou plug de MTA, não permite o desenvolvimento radicular completo, tanto em espessura quanto em comprimento (Jeeruphan *et al.* 2012), além de não restabelecer funcionalmente o tecido pulpar (Hargreaves *et al.* 2013).

Recentemente, terapias biológicas denominadas de regeneração endodôntica (RE), que visam recuperar as funções fisiológicas de estruturas do complexo dentino-pulpar e permitir a formação radicular completa estão sendo estudadas (Hargreaves *et al.* 2013, Marí-Beffa *et al.* 2017). Banchs e Trope (2004) trouxeram o conceito de RE pela técnica de revascularização, por meio da indução do sangramento apical após o emprego de uma pasta triantibiótica, observando então o desenvolvimento contínuo da raiz, evidenciado não só pelo aumento do seu comprimento, mas também pelo espessamento das paredes do canal radicular. Embora a técnica de revascularização tenha se mostrado eficaz na continuação da formação radicular (Petrino *et al.* 2010) alguns estudos avaliaram o tecido neoformado no espaço do canal radicular e observaram que o mesmo corresponde a um tecido conjuntivo semelhante ao ligamento periodontal, e a um tecido semelhante ao cimento ou cimento - ósseo

(Becerra *et al.* 2014, Torabinejad *et al.* 2015). Dessa forma, do ponto de vista clínico, a regeneração do tecido perdido não pode ser alcançada, visto que não há o restabelecimento da vascularização, inervação e deposição de dentina como no tecido pulpar normal. Técnicas da bioengenharia têm sido propostas visando a formação de um tecido semelhante à polpa, bem como a diferenciação odontoblástica, por meio do uso de “*scaffolds*” - estruturas tridimensionais que permitem a adesão, proliferação e diferenciação de células tronco mesenquimais - associado ao emprego de biomateriais ou moléculas de sinalização que estimulem esses processos (Hargreaves *et al.* 2008), como o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (Chang *et al.* 2017), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) (Cai *et al.* 2016), plasma rico em plaquetas (PRP) (Torabinejad & Faras 2012, Torabinejad *et al.* 2015), fibrina rica em plaquetas (PRF) (Subash *et al.* 2016), entre outros.

A RE em dentes permanentes jovens apresenta um prognóstico favorável devido à ampla comunicação entre o canal radicular e os tecidos periapicais. Essa vascularização tem se mostrado capaz de manter a viabilidade celular mesmo após danos aos tecidos pulpar e/ou periapicais (Tsukiboshi *et al.* 2017). Células-tronco são células progenitoras que apresentam ampla capacidade de auto-renovação e diferenciação (Gronthos *et al.* 2002, Huang *et al.* 2006, Limjeerajarus *et al.* 2014, Maglione *et al.* 2017), podendo ser classificadas em totipotentes - apresentam a capacidade de originar qualquer tipo celular, inclusive tecidos extraembrionários como a placenta; pluripotentes – originam todas as células de um organismo, exceto de tecidos extraembrionários; e multipotentes – originam linhagens específicas de células (Rodriguez-Lozano *et al.* 2011). Células-tronco mesenquimais apresentam grande potencial em procedimentos de RE, uma vez que estão presentes na própria polpa dentária - DPSCs (Gronthos *et al.* 2002), dentes decíduos – SHED (Miura *et al.* 2003), ligamento periodontal - PDLSCs (Jo *et al.* 2007) e papila apical - SCAP (Huang *et al.* 2008). Mesmo na presença de processo inflamatório, células da polpa dentária e da região periapical, apresentaram alta expressão de marcadores de células-tronco mesenquimais (Alongi *et al.* 2010, Liao *et al.* 2011).

A busca por tratamentos capazes de induzir a diferenciação de células (Asgary *et al.* 2014, Chen *et al.* 2015, Huang *et al.* 2016), bioestimular células remanescentes

em concentrações não tóxicas (Washington *et al.* 2011, Kuang *et al.* 2016, Chen *et al.* 2015), promover uma desinfecção eficaz sem citotoxicidade (Bottino *et al.* 2013, Palasuk *et al.* 2014, Kamocki *et al.* 2015), ou ainda criar um *scaffold* que permita a proliferação e diferenciação celular, além de oferecer suporte adequado para biomoléculas (Bottino *et al.* 2015, Kuang *et al.* 2016) tem sido alvo de diversos estudos no campo da RE. A análise de marcadores de diferenciação osteogênica após determinado tratamento proposto em células indiferenciadas (d'Aquino *et al.* 2007, Wang *et al.* 2017), ou ainda em células diferenciadas que poderiam ser remanescentes à determinada injúria (Satué *et al.* 2013, Zeng *et al.* 2013, Liu *et al.* 2017) tem sido amplamente realizada com o intuito de analisar a capacidade bioestimulatória de diferentes materiais, visando induzir o processo de reparo. Dentre esses marcadores de mineralização estão a fosfatase alcalina (ALP – enzima responsável pela mineralização da matriz dentinária ou óssea); cuja expressão ocorre em células envolvidas no processo de mineralização, como os odontoblastos e osteoblastos, a proteína da matriz dentinária (DMP-1) e a sialofosfoproteína dentinária (DSPP) que são proteínas não-colagenosas que participam da mineralização da dentina e maturação das fibras colágenas durante o processo de dentinogênese. Essas proteínas permanecem no interior do substrato dentinário, sendo liberadas em resposta às injúrias teciduais, para estimular odontoblastos primários a produzirem dentina terciária reacional, ou ainda para estimular a diferenciação de células pulpares em odontoblastos que irão produzir dentina terciária reparadora (Ferracane *et al.* 2010, de Souza Costa *et al.* 2014).

A desinfecção do sistema de canais radiculares também representa um desafio dentro das terapias de RE, uma vez que esses dentes permanentes jovens apresentam canal radicular e ápice amplos, além de paredes dentinárias delgadas, inviabilizando o preparo biomecânico convencional. A pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacina e minociclina) tem se mostrado eficaz em tratamentos de RE para dentes imaturos (Windley *et al.* 2005, Petrino *et al.* 2010); entretanto, foi observada uma significativa redução na viabilidade de células-tronco da papila apical (Ruparel *et al.* 2012) e fibroblastos do ligamento periodontal (Yadlapati *et al.* 2014) após a sua aplicação. Esse efeito citotóxico também foi demonstrado em células da polpa humana, onde a pasta

na concentração de 2,5mg/mL, ou seja bem menor do que aquelas empregadas durante as terapias de RE (aproximadamente 1g/mL), foi capaz de reduzir a proliferação celular (Labban *et al.* 2014). Devido à algumas desvantagens, como a descoloração dentinária (Kim *et al.* 2010), a minociclina – antibiótico semisintético derivado da tetraciclina – foi removida da pasta triantibiótica. A pasta biantibiótica (metronidazol e ciprofloxacina) tem apresentado bons resultados frente à infecção endodôntica (Iwaya *et al.* 2001), porém com maior efeito citotóxico, reduzindo a viabilidade de células pulpares à partir da concentração de 0,5mg/mL (Labban *et al.* 2014). De maneira semelhante, o hidróxido de cálcio também não demonstrou toxicidade em baixas concentrações (até 2,5mg/mL), entretanto a concentração utilizada clinicamente é de aproximadamente 0,7g/mL (Labban *et al.* 2014).

Compostos biativos derivados de plantas como os flavonoides, têm recebido destaque na literatura devido à sua amplitude terapêutica. Os flavonoides são moléculas polifenólicas presentes em frutas e vegetais (Panche *et al.* 2016) que apresentam propriedades antimicrobiana, antioxidante, osteogênica e antiosteoclastogênica (Pietta 2000, Tripoli *et al.* 2007, Sharan *et al.* 2009, Pilsakova *et al.* 2010, Domitrovic 2011). Dentre eles, a taxifolina, um flavonoide tipo catecol, isolado de diversas plantas (da Costa *et al.* 2014, Wang *et al.* 2015, Park *et al.* 2016), e mais recentemente do chá verde (Wang *et al.* 2017), tem apresentado ampla ação terapêutica, entre as quais, atividade antimicrobiana contra *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina (Jeong *et al.* 2009), *Acinetobacter hemolyticus* (Chatzopoulou *et al.* 2010); atividade antifúngica (Kanwal *et al.* 2010); capacidade de estimular o aumento da expressão gênica de osteocalcina, osteoprotegerina e sialoproteína óssea, além de diminuir a expressão de RANKL (marcador de reabsorção óssea) em osteoblastos (Satué *et al.* 2013) e estimular a diferenciação de células-tronco mesenquimais em osteoblastos (Córdoba *et al.* 2015, Wang *et al.* 2017).

Própolis, substância resinosa produzida por abelhas por meio da mistura de suas secreções com produtos obtidos de diversas plantas, tem sido amplamente estudada devido as suas propriedades terapêuticas (Yokoyama *et al.* 2014, Aral *et al.* 2015, Asawahame *et al.* 2015). Dentre essas, a sua atividade antimicrobiana tem sido relatada por alguns autores (Uzel *et al.* 2005, de Luca *et al.* 2014), inclusive frente à

microrganismos de interesse endodôntico, como *Enterococcus faecalis*, *Candida albicans*, *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* (Uzel *et al.* 2005). Dentre os principais compostos isolados da própolis estão os flavonoides galangina, crisina e pinocembrina.

Huh *et al.* (2013) observou que a galangina reduziu as citocinas inflamatórias IL-1 β , TNF- α e IL-17; inibiu a formação de osteoclastos e fatores osteoclastogênicos; além de aumentar a expressão gênica de osteoprotegerina em osteoblastos. Liu *et al.* (2017) também observaram um aumento na expressão de marcadores de diferenciação osteogênica, como colágeno, fosfatase alcalina (ALP), osteocalcina e osteopontina em células derivadas de osteosarcoma após o tratamento com galangina. Esse flavonoide mostrou ainda atividade inibitória contra *S. aureus* e *Enterococcus* (Li *et al.* 2012), apresentando como possível mecanismo de ação um dano direto à membrana citoplasmática ou indireto à parede celular, por provocar a perda de íons potássio (Cushnie e Lamb 2005). O flavonoide crisina também demonstrou atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo *S. aureus* e *E. coli* com concentrações inibitórias mínimas (CIM) que variaram de 50 à 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (Liu *et al.* 2010) e promoveu aumento da expressão de marcadores osteogênicos, como colágeno, osteocalcina e osteopontina em osteoblastos (Zeng *et al.* 2013). A pinocembrina apresentou atividade antimicrobiana contra *C. albicans* e *S. aureus*, com CIMs de 6.25 e 12.5 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente (Katerere *et al.* 2012), além de atenuar a resposta inflamatória induzida por lipopolissacarídeos (Giri *et al.* 2016). Assim, os flavonoides apresentam diversas propriedades desejáveis nas terapias de regeneração endodôntica devido às suas múltiplas funções biológicas.

Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

1. Alongi DJ, Yamaza T, Song Y, Fouad AF, Romberg EE, Shi S, Tuan RS, Huang GT. (2010) Stem/progenitor cells from inflamed human dental pulp retain tissue regeneration potential. *Regen Med*, **5** (4): 617-31.
2. American Association of Endodontics. Guide to Clinical Endodontics (2004) 4^aed.
3. Aral CA, Kesim S, Greenwell H, Kara M, Cetin A, Yakan B (2015) Alveolar Bone Protective and Hypoglycemic Effects of Systemic Propolis Treatment in Experimental Periodontitis and Diabetes Mellitus. *J Med Food*, **18** (2): 195-201.
4. Asawahame C, Sutjarittangtham K, Eitssayeam S, Tragoolpua Y, Sirithunyalug B, Sirithunyalug J (2015) Antibacterial Activity and Inhibition of Adherence of *Streptococcus mutans* by Propolis Electrospun Fibers. *AAPS PharmSciTech*, **16** (1): 182-91.
5. Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N (2014) Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod*, **40** (3): 387-92.
6. Banchs F, Trope M (2004) Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*, **30** (4): 196-200.
7. Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM (2014) Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod*. **40** (1): 133-9.
8. Bhasker SN (1991) Orban's oral histology and embryology, 11th ed. St. Louis: Mosby-Year Book.
9. Bottino MC, Kamocki K, Yassen GH, Platt JA, Vail MM, Ehrlich Y, Spolnik KJ, Gregory RL (2013) Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *J Dent Res*, **92** (11): 963-9.
10. Bottino MC, Yassen GH, Platt JA, Labban N, Windsor LJ, Spolnik KJ, Bressiani AH (2015) A novel three-dimensional scaffold for regenerative endodontics: materials and biological characterizations. *J Tissue Eng Regen Med*, **9** (11): E116-23.

11. Cai S, Zhang W, Chen W (2016) PDGFR β +/*c-kit*+ pulp cells are odontoblastic progenitors capable of producing dentin-like structure in vitro and in vivo. *BMC Oral Health*, **28**;16 (1):113.
12. Chang YC, Chang MC, Chen YJ, Liou JU, Chang HH, Huang WL, Liao WC, Chan CP, Jeng PY, Jeng JH (2017) Basic Fibroblast Growth Factor Regulates Gene and Protein Expression Related to Proliferation, Differentiation, and Matrix Production of Human Dental Pulp Cells. *J Endod*, **43** (6): 936-942.
13. Chatzopoulou A, Karioti A, Gousiadou C, LaxVivancos V, Kyriazopoulos P, Golegou S, Skaltsa H (2010) Depsides and other polar constituents from *Origanum dictamnus* L. and their in vitro antimicrobial activity in clinical strains. *J Agric Food Chem*, **58** (10): 6064-8.
14. Chen YJ, Zhao YH, Zhao YJ, Liu NX, Lv X, Li Q, Chen FM, Zhang M (2015) Potential dental pulp revascularization and odonto-/osteogenic capacity of a novel transplant combined with dental pulp stem cells and platelet-rich fibrin. *Cell Tissue Res*, **361** (2): 439-55.
15. Córdoba A, Satué M, Gómez-Florit M, Hierro-Oliva M, Petzold C, Lyngstadaas SP, González-Martín ML, Monjo M, Ramis JM (2015) Flavonoid-modified surfaces: multifunctional bioactive biomaterials with osteopromotive, anti-inflammatory, and anti-fibrotic potential. *AdvHealthc Mater*, **11** (4): 540-9.
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 Costa MP, Bozinis MC, Andrade WM, Costa CR, da Silva AL, Alves de Oliveira CM, Kato L, Fernandes Ode F, Souza LK, Silva M (2014) Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. *BMC Complement Altern Med*, **14**: 245.
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. d'Aquino R, Graziano A, Sampaolesi M, Laino G, Pirozzi G, De Rosa A, Papaccio G (2007) Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: a pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ*, **14** (6): 1162-71.
20. de Luca MP, Franca JR, Macedo FA, Grenho L, Cortes ME, Faraco AA, Moreira AN, Santos VR (2014) Propolis varnish: antimicrobial properties against cariogenic bacteria, cytotoxicity, and sustained-release profile. *Biomed Res Int*, 348647.
21. de Souza Costa CA, Hebling J, Scheffel DL, Soares DG, Basso FG, Ribeiro AP (2014) Methods to evaluate and strategies to improve the biocompatibility of dental materials and operative techniques. *Dental Materials*, **30**: 769-784.
22. Domitrovic R (2011) The molecular basis for the pharmacological activity of anthocyanins. *Curr Med Chem*, **18**: 4454-69.
23. Ferracane JL, Cooper PR, Smith AJ (2010) Can interaction of materials with the dentin-pulp complex contribute to dentin regeneration? *Odontology*, **98** (1): 2-14.
24. Giri SS, Sen SS, Sukumaran V, Park SC (2016) Pinocembrin attenuates lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in Labeo rohita macrophages via the suppression of the NF- κ B signalling pathway. *Fish Shellfish Immunol*, **56**: 459-466.
25. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*, **81** (8): 531-5.
26. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB (2013) Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod*, **39** (3): S30-43.
27. Hargreaves KM, Geisler T, Henry M, Wang Y (2008) Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*, **34**: S51-S56.
28. Huang CC, Narayanan R, Alapati S, Ravindran S (2016) Exosomes as biomimetic tools for stem cell differentiation: Applications in dental pulp tissue regeneration. *Biomaterials*, **111**: 103-115.

29. Huang GT, Shagrananova K, Chan SW (2006) Formation of odontoblast-like cells from cultured human dental pulp cells on dentin in vitro. *J Endod*, **32** (11): 1066-73.
30. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S (2008) The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*, **34** (6): 645-51.
31. Huh JE, Jung IT, Choi J, Baek YH, Lee JD, Park DS, Choi DY (2013) The natural flavonoid galangin inhibits osteoclastic bone destruction and osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B in collagen-induced arthritis and bone marrow-derived macrophages. *Eur J Pharmacol*, **698** (1-3): 57-66.
32. Iglesias-Linares A, Yáñez-Vico RM, Sánchez-Borrego E, Moreno-Fernández AM, Solano-Reina E, Mendoza-Mendoza A (2013) Stem cells in current pediatric dentistry practice. *Arch Oral Biol*, **58** (3): 227-38.
33. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M (2001) Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*, **17**: 185–187.
34. 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.
35. Jeong KW, Lee JY, Kang DI, Lee JU, Shin SY, Kim Y (2009) Screening of flavonoids as candidate antibiotics against *Enterococcus faecalis*. *J Nat Prod*, **72** (4): 719-24.
36. Jo YY, Lee HJ, Kook SY, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung YH, Kim ES, Yang HC, Choung PH (2007) Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng*, **13** (4): 767-73.
37. Kamocki K, Nör JE, Bottino MC (2015) Dental pulp stem cell responses to novel antibiotic-containing scaffolds for regenerative endodontics. *Int Endod J*, **48** (12): 1147-56.
38. Kanwal Q, Hussain I, LatifSiddiqui H, Javaid A (2010) Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Nat Prod Res*, **24** (20): 1907-14.

39. Katerere DR, Gray AI, Nash RJ, Waigh RD (2012) Phytochemical and antimicrobial investigations of stilbenoids and flavonoids isolated from three species of Combretaceae. *Fitoterapia*, **83** (5): 932-40.
40. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY (2010) Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod*, **36** (6):1086-91.
41. Kuang R, Zhang Z, Jin X, Hu J, Shi S, Ni L, Ma PX (2016) Nanofibrous spongy microspheres for the delivery of hypoxia-primed human dental pulp stem cells to regenerate vascularized dental pulp. *Acta Biomater*, **33**: 225-34.
42. Labban N, Yassen GH, Windsor LJ, Platt JA (2014) The direct cytotoxic effects of medicaments used in endodontic regeneration on human dental pulp cells. *Dent Traumatol*, **30** (6): 429-34.
43. Li W, Liu H, Xu Q (2012) Extracellular dextran and DNA affect the formation of *Enterococcus faecalis* biofilms and their susceptibility to 2% chlorhexidine. *J Endod*, **38** (7): 894-8.
44. Liao J, Al Shahrani M, Al-Habib M, Tanaka T, Huang GT (2011) Cells isolated from inflamed periapical tissue express mesenchymal stem cell markers and are highly osteogenic. *J Endod*, **37** (9): 1217-24.
45. Limjeerajarus CN, Chanarattanubol T, Trongkij P, Rujiwanichkul M, Pavasant P (2014) Iloprost induces tertiary dentin formation. *J Endod*, **40** (11): 1784-90.
46. Liu C, Ma M, Zhang J, Gui S, Zhang X, Xue S (2017) Galangin inhibits human osteosarcoma cells growth by inducing transforming growth factor- β 1-dependent osteogenic differentiation. *Biomed Pharmacother*, **89**: 1415-1421.
47. Liu C, Ma M, Zhang J, Gui S, Zhang X, Xue S (2017) Galangin inhibits human osteosarcoma cells growth by inducing transforming growth factor- β 1-dependent osteogenic differentiation. *Biomed Pharmacother*, **89**: 1415-1421.
48. Liu H, Mou Y, Zhao J, Wang J, Zhou L, Wang M, Wang D, Han J, Yu Z, Yang F (2010) Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. *Molecules*, **15** (11): 7933-45.
49. Maglione M, Spano S, Ruaro ME, Salvador E, Zanconati F, Tromba G, Turco G (2017) In vivo evaluation of chitosan-glycerol gel scaffolds seeded with stem

- cells for full-thickness mandibular bone regeneration. *J Oral Sci*, **59** (2): 225-232.
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. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100** (10): 5807-12.
 52. Palasuk J, Kamocki K, Hippenmeyer L, Platt JA, Spolnik KJ, Gregory RL, Bottino MC (2014) Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. *J Endod*, **40** (11): 1879-84.
 53. Panche AN, Diwan AD, Chandra SR. 2016. Flavonoids: an overview. *J Nutr Sci*. **29** (5): e47.
 54. Park JS, Kim IS, Shaheed Ur Rehman, Na CS, Yoo HH (2016) HPLC Determination of Bioactive Flavonoids in *Hoveniadelphicis* Fruit Extracts. *J Chromatogr Sci*, **54** (2): 130-5.
 55. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB (2010) Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod*, **36** (3): 536-41.
 56. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants (2000) *J Nat Prod*, **63**: 1035-42.
 57. Pilsakova L, Rieckensky I, Jagla F (2010) The physiological actions of isoflavone phytoestrogens. *Physiol Res*, **59**: 651-64.
 58. Rafter M (2005) Apexification: a review. *Dent Traumatol*, **21**: 1-8.
 59. Rodríguez-Lozano FJ, Bueno C, Insausti CL, Ramírez MC, Blanquer M, Marín N, Martínez S, Moraleda JM (2011) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues. *Int Endod J*, **44** (9): 800-806.
 60. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CCR, Diogenes A (2012) Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*, **38** (10): 1372-1375.
 61. Satué M, Arriero MM, Monjo M, Ramis JM (2013) Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3-E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells. *Biochemical pharmacology*, **86**: 1476-86.

62. 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.
63. Sharan K, Siddiqui JA, Swarnkar G, Maurya R, Chattopadhyay N (2009) Role of phytochemicals in the prevention of menopausal bone loss: evidence from in vitro and in vivo, human interventional and pharma-cokinetic studies. *Curr Med Chem*, **16**: 1138-57.
64. 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.
65. Subash D, Shoba K, Aman S, Bharkavi SK (2016) Revitalization of an Immature Permanent Mandibular Molar with a Necrotic Pulp Using Platelet-Rich Fibrin: A Case Report. *J Clin Diagn Res*, **10** (11): ZD21-ZD23.
66. Torabinejad M, Faras H (2012) A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod*, **38** (6): 864-8.
67. Torabinejad M, Milan M, Shabahang S, Wright KR, Faras H (2015) Histologic examination of teeth with necrotic pulps and periapical lesions treated with 2 scaffolds: an animal investigation. *J Endod*, **41** (6): 846-52.
68. Tripoli E, Guardia ML, Giammanco S, Majo DD, Giammanco M (2007) Citrus flavonoids: molecular structure, biological activity and nutritional properties: a review. *Food Chem*, **104**: 466-79.
69. Tsukiboshi M, Ricucci D, Siqueira JF Jr (2017) Mandibular Premolars with Immature Roots and Apical Periodontitis Lesions Treated with Pulpotomy: Report of 3 Cases. *Journal of endodontics*, **43**: 65-74.
70. Uzel A, Sorkun K, Onçağ O, Cogulu D, Gençay O, Salih B (2005) Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res*, **160** (2): 189-95.

71. Wang M, Yu BW, Yu MH, Gao LX, Li JY, Wang HY, Li J, Hou AJ (2015) New Isoprenylated Phenolic Compounds from *Morus laevigata*. *Chem Bio divers*, **12** (6): 937-4.
72. Wang YJ, Zhang HQ, Han HL, Zou YY, Gao QL, Yang GT (2017) Taxifolin enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially via NF- κ B pathway. *Biochemical and biophysical research communications*, **490**: 36-43.
73. Washington JT, Schneiderman E, Spears R, Fernandez CR, He J, Opperman LA (2011) Biocompatibility and osteogenic potential of new generation endodontic materials established by using primary osteoblasts. *J Endod*, **37** (8): 1166-70.
74. Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M (2005) Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod*, **31**: 439–43.
75. 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.
76. Yokoyama T, Kosaka Y, Mizuguchi M (2014) Inhibitory Activities of Propolis and Its Promising Component, Caffeic Acid Phenethyl Ester, against Amyloidogenesis of Human Transthyretin. *J Med Chem*, **57** (21): 8928-35.
77. Zeng W, Yan Y, Zhang F, Zhang C, Liang W (2013) Chrysin promotes osteogenic differentiation via ERK/MAPK activation. *Protein Cell*, **4** (7): 539-47.
78. Zeng W, Yan Y, Zhang F, Zhang C, Liang W. 2013. Chrysin promotes osteogenic differentiation via ERK/MAPK activation. *Protein Cell*, **4** (7): 539-47.