

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Faculdade de Odontologia

Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia

Marina Verçosa Assumpção Soares da Silva

**INFLUÊNCIA DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS EM
PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO EM MOLARES
DE RATOS**

**Belo Horizonte
2023**

Marina Verçosa Assumpção Soares da Silva

**INFLUÊNCIA DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS EM
PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO EM MOLARES
DE RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Endodontia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Francine Benetti

Belo Horizonte
2023

Ficha Catalográfica

S586i Silva, Marina Verçosa Assumpção Soares da.
2023 Influência da fibrina rica em plaquetas em procedimento
T endodôntico regenerativo em molares de ratos / Marina
Verçosa Assumpção Soares da Silva. -- 2023.

48 f. : il.

Orientadora: Francine Benetti.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Fibrina rica em plaquetas. 2. Proloterapia. 3. Osteocalcina. 4. Antígeno nuclear de célula em proliferação. I. Benetti, Francine. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

INFLUÊNCIA DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS EM PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO EM MOLARES DE RATOS

MARINA VERÇOSA ASSUMPÇÃO SOARES DA SILVA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração ENDODONTIA.

Aprovada em 26 de setembro de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Francine Benetti - Orientadora
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Isabella Faria da Cunha Peixoto
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Vanessa Abreu Sanches Marques Costa
Universidade Estadual do Norte do Paraná - UENP

Belo Horizonte, 26 de setembro de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Francine Benetti, Professora do Magistério Superior**, em 26/09/2023, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Isabella Faria da Cunha Peixoto, Professora do Magistério Superior**, em 26/09/2023, às 10:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa Abreu Sanches Marques Costa, Usuário Externo**, em 26/09/2023, às 10:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2638541** e o código CRC **723DFE64**.

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos e esposo, que estiveram comigo ao longo de toda essa jornada. Sem o incentivo de vocês, nada seria possível. A todos vocês, meu amor e minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

A dissertação de mestrado é a finalização de um grande sonho e, com certeza, o início de outro. É impossível não lembrar os momentos que me fizeram chegar até aqui. Foram 24 meses intensos, de muito trabalho e dedicação, onde eu pude enfrentar grandes desafios. Ao mesmo tempo, foram meses leves, onde fiz grandes amigos, dei boas risadas e aprendi muito. Todos os anos que eu estive na UFMG serão lembrados com muita gratidão e carinho. A realização desse sonho só foi possível porque estava cercada de pessoas que me incentivaram e que me deram todo o apoio.

Gostaria de agradecer à Deus por ter me colocado no caminho de pessoas tão iluminadas que fazem de mim uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais, Simone e Ricardo, por todo apoio, amor e exemplo que recebi ao longo da vida.

Aos meus irmãos, Ricardo, Maria Clara e Maria Luiza, por todos os momentos incríveis que compartilhamos nessa jornada.

Aos meus tios e primos, por entenderem minha ausência e me apoiarem incondicionalmente.

Ao meu esposo, Bruno, por todo apoio, carinho, amor e incentivo. Sem você, esse sonho não seria possível.

À minha orientadora, Prof^a Francine Benetti, por todo ensinamento, disponibilidade e condução, lado a lado, na pesquisa. Todo seu carinho, paciência, dedicação e amizade foram decisivos na construção deste trabalho e em minha construção pessoal. Você é uma inspiração para todos que queiram participar do mundo docente e da pesquisa.

Ao nosso grupo de pesquisa e de pós-graduação, pela oportunidade de trabalharmos e crescermos juntos, em especial, ao meu grande amigo, Alexandre Henrique Reis Prado, que não mediu esforços para me ajudar em cada etapa desse processo.

À todas as pessoas que de alguma forma fizeram parte dessa jornada, meu muito obrigada. Cada um de vocês contribuiu um pouquinho com esse trabalho.

Compartilho minha conquista com vocês. A todos, meu amor e minha eterna gratidão.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”

José de Alencar

RESUMO

Este estudo avaliou a influência da fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF) no reparo após procedimento endodôntico regenerativo (REP) em molares imaturos de ratos. Molares superiores direito ou esquerdo de 18 ratos foram divididos em grupos (n = 6): SI – foi removido o tecido pulpar do canal mesial, feita irrigação com hipoclorito de sódio e ácido etilenodiaminotetracético, e induzido o sangramento intracanal (SI); i-PRF – após protocolo de irrigação, foi inserido no interior do canal radicular a i-PRF, sem indução do SI; i-PRF-SI – foi realizado o tratamento como no grupo i-PRF, e então, induzido o SI. Ao término, os dentes foram selados. Para produzir a i-PRF, outros 3 animais foram utilizados para a coleta sanguínea intracardíaca, e o sangue foi centrifugado (1200 rpm, 8 min). Aos 21 dias, os animais foram eutanasiados e as peças preparadas para análise histológica e imunohistoquímica para antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e osteocalcina (OCN). Teste estatístico foi aplicado ($p < 0,05$). Houve formação de tecido mineralizado em comprimento ou espessura da raiz em todos os grupos ($p > 0,05$). A formação de tecido conjuntivo nos canais ocorreu até terço médio na maior parte dos espécimes de SI, e até terço cervical em i-PRF e i-PRF-SI ($p < 0,05$). Houve células semelhantes a odontoblastos no terço apical de metade dos espécimes de i-PRF, e terços apical e médio na maior parte dos espécimes de i-PRF-SI; estas células não foram encontradas no grupo SI ($p < 0,05$). Os espécimes dos grupos i-PRF e i-PRF-SI tiveram significativo número de células positivas para PCNA ($p < 0,05$) e maior imunomarcagem de OCN, principalmente o grupo i-PRF-SI quando comparado ao grupo SI ($p < 0,05$). Conclui-se que i-PRF auxiliou o processo de reparo após REP em ratos, induzindo formação de tecido conjuntivo nos canais radiculares, presença de células semelhantes a odontoblastos e células positivas para PCNA, e imunomarcagem de OCN, principalmente quando associada ao SI.

Palavras-chave: fibrina rica em plaquetas; terapia regenerativa; osteocalcina; PCNA.

ABSTRACT

Influence of injectable platelet rich fibrin on regenerative endodontic procedure in rat's immature molars

This study evaluated the influence of injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) on repair after regenerative endodontic procedure (REP) in immature molars of rats. Right or left upper molars of 18 rats were divided into groups (n = 6): IB – the pulp tissue of the mesial canal was removed, irrigation with sodium hypochlorite and ethylenediaminetetraacetic acid was performed, and intracanal bleeding (IB) was induced; i-PRF – after the irrigation protocol, i-PRF was inserted inside the root canal, without inducing of IB; i-PRF-IB – the treatment was carried out as in the i-PRF group and then the IB was induced. At the end, the teeth were sealed. To produce the i-PRF, another 3 animals were used for intracardiac blood collection, and the blood was centrifuged (1200 rpm, 8 min). After 21 days, the animals were euthanized and the samples were prepared for histological and immunohistochemical analysis for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and osteocalcin (OCN). Statistical test was applied ($P < 0.05$). There was formation of mineralized tissue in root length or thickness in all groups ($P > 0.05$). The formation of connective tissue in the canals occurred up to the medium third in most IB specimens, and up to the cervical third in i-PRF and i-PRF-IB ($P < 0.05$). There were odontoblast-like cells in the apical third of half of the PRF specimens, and apical and medium thirds in most of the i-PRF specimens; these cells were not found in the IB group ($P < 0.05$). The i-PRF and i-PRF-IB group had significant higher number of PCNA-positive cells ($P < 0.05$), and higher OCN immunolabeling, mainly i-PRF-IB compared to IB group ($P < 0.05$). It is concluded that i-PRF helped the repair process after REP in rats, inducing connective tissue formation in root canals, presence of odontoblast-like and PCNA-positive cells, and OCN immunolabeling, mainly when associated with IB.

Keywords: platelet rich fibrin; regenerative endodontic procedure; PCNA; osteocalcin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Distribuição dos grupos experimentais, de acordo com os tratamentos realizados.....	18
Tabela 2- Avaliação histológica para cada parâmetro nos grupos experimentais após 21 dias de REP.....	24

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE: *American Association of Endodontists*

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

H&E: Hematoxilina e Eosina

i-PRF: Fibrina Rica em Plaquetas Injetável, do inglês *Injectable Platelet-rich Fibrin*

MTA: Agregado Trióxido Mineral

NaOCl: Hipoclorito de Sódio

OCN: Osteocalcina

PBS: Solução Salina Tampão Fosfato, do inglês *Phosphate Buffered Saline*

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular, do inglês

Proliferating Cell Nuclear Antigen

pH: Potencial Hidrogeniônico

PRF: Fibrina Rica em Plaquetas

PSR: *Picrosírius Red*

REP: Procedimento Endodôntico Regenerativo, do inglês *Regenerative Endodontic Procedure*

SBCAL: Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SI: Sangramento Intracanal

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
2	OBJETIVOS.....	13
2.1	Objetivo geral.....	13
2.2	Objetivo específico.....	13
3	METODOLOGIA EXPANDIDA	14
3.1	Animais.....	14
3.2	Divisão dos grupos.....	14
3.3	Coleta sanguínea e preparo da i-PRF.....	15
3.4	Procedimento Endodôntico Regenerativo (REP).....	16
3.5	Eutanásia e processamento laboratorial.....	19
3.6	Formas de análise dos resultados.....	20
3.6.1	Análises histológicas	20
3.6.2	Análise das fibras colágenas.....	21
3.6.3	Análise imunohistoquímica.....	22
3.7	Análise estatística.....	23
4	ARTIGO	24
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
	REFERÊNCIAS.....	42
	ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	47

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Um dos principais objetivos da endodontia é a preservação da dentição natural para a manutenção da saúde bucal e sistêmica do paciente. Após sofrerem injúrias como traumas ou lesões cariosas, dentes com rizogênese incompleta podem desenvolver necrose pulpar (ANDREASEN; KAHLER, 2015). Nesses casos, o tratamento endodôntico convencional apresenta desafios na limpeza, modelagem e obturação do sistema de canais radiculares, devido a não formação do forame apical, resultando em formato divergente da raiz e ápice amplo (DING *et al.*, 2009). Além disso, por causa da interrupção da maturação radicular, as raízes ficam finas e suscetíveis a fraturas (ANDREASEN; KAHLER, 2015; LAW, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2020).

Anteriormente, o tratamento endodôntico de dentes permanentes imaturos era a apicificação, na qual eram realizadas trocas seguidas de medicação intracanal de hidróxido de cálcio, com o objetivo de induzir a formação de tecido mineralizado no ápice (DAMLE *et al.*, 2016), fazendo com que o paciente fosse inúmeras vezes ao consultório, o que acaba sendo oneroso. Além disso, o contato prolongado entre hidróxido de cálcio e dentina acarreta uma redução na resistência à fratura radicular (ANDREASEN; FARIK; MUNKSGAARD, 2002). Outra forma de se induzir a apicificação consiste no plug apical com material biocerâmico, o que foi possibilitado após a industrialização do agregado trióxido mineral (MTA), em 1999 (DEMIRCI *et al.*, 2020). No entanto, no tratamento de apicificação, apesar dos bons resultados clínicos, não é permitido o término da formação radicular, e desta forma, as raízes permanecem finas, com maior tendência a fraturas, além da sensibilidade do dente não ser restabelecida (DEMIRCI *et al.*, 2020; DING *et al.*, 2009).

Assim, como alternativa à apicificação, atualmente, os procedimentos endodônticos regenerativos (REP, do inglês *regenerative endodontic procedure*) têm sido indicados (DING *et al.*, 2009; YOUSSEF *et al.*, 2022). Esse procedimento apresenta nova possibilidade de tratamento para dentes permanentes imaturos, onde é permitido o desenvolvimento de um novo tecido no interior dos canais radiculares, baseado na engenharia tecidual, além de permitir o término do desenvolvimento radicular com aumento da raiz em comprimento e espessura, o que reduz as chances

de fratura destes dentes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; DIOGENES *et al.*, 2013; TROPE; DEBELIAN; SIGURDSSON, 2015).

A fibrina rica em plaquetas (PRF) é um concentrado plaquetário de uso autólogo que tem mostrado ser eficiente na regeneração tecidual em sítios cirúrgicos (TAKAMORI *et al.*, 2018). Atualmente, a PRF tem sido utilizada na endodontia regenerativa como *scaffold* uma vez que pode melhorar o resultado biológico desejado em REP (ULUSOY *et al.*, 2019). A vantagem atribuída à PRF é o fato de ser rica em plaquetas, que podem liberar fatores de crescimento importantes para que ocorra a regeneração tecidual, além de servir como um arcabouço para guiar a proliferação e crescimento celular (YOUSSEF *et al.*, 2022).

Já a PRF injetável (i-PRF) foi desenvolvida em 2014 a partir da diminuição na velocidade de centrifugação e da utilização de tubos de plástico sem aditivo (VARELA *et al.*, 2019). Estudos recentes mostram que a i-PRF pode atuar como um gel tridimensional dinâmico de fibrina incorporado com plaquetas, leucócitos, colágeno, osteocalcina e fatores de crescimento, para modular processos inflamatórios e promover a osteogênese (VARELA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018). Ainda, estudos mostram a capacidade da i-PRF em permitir melhor regeneração óssea quando comparado ao PRF, e na eliminação de infecção endodôntica (VARELA *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2020). Ainda, na endodontia, a i-PRF pode apresentar vantagens devido à sua fácil introdução no interior do canal radicular. No entanto, embora existam alguns estudos recentes, a i-PRF tem sido pouco estudado em REP, onde são encontrados mais estudos a respeito da PRF.

Enquanto alguns estudos tem apresentado melhores resultados clínicos ao se utilizar PRF na regeneração endodôntica (NARANG; MITTAL; MISHRA, 2015; RAY *et al.*, 2016; ULUSOY *et al.*, 2019), outros estudos não encontraram vantagem do uso desta técnica (RAGAB *et al.*, 2019; RIAZ; SHAH, 2021). Ainda, há falta de estudos *in vivo* avaliando os efeitos da PRF ou i-PRF em REP, para auxiliar a entender os benefícios do uso do agregado plaquetário. Assim, este estudo pode ajudar na avaliação do tratamento, além de possibilitar a translação dos resultados para futuras investigações clínicas. O presente estudo visa avaliar a influência da i-PRF no processo de reparo após REP em molares imaturos de ratos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a influência da fibrina rica em plaquetas injetável (i-PRF) no processo de reparo após procedimento endodôntico regenerativo (REP) em molares imaturos de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, através de análises histológica e imunohistoquímica, a influência da i-PRF nos seguintes parâmetros do processo de reparo após REP em ratos:

- A formação de tecido mineralizado nas paredes do canal radicular, a presença de tecido neoformado no interior dos canais radiculares, e a presença de células semelhantes a odontoblastos, pela técnica de hematoxilina-eosina (HE);
- Avaliação da maturação das fibras colágenas, pela técnica de *picrossírius red* (PSR);
- Avaliação da imunomarcação do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e osteocalcina (OCN), por meio de análises imuno-histoquímicas.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Animais

Foram utilizados 18 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar) pesando aproximadamente 80 g, com idade média de 4 semanas, provenientes do Biotério Central da UFMG. O cálculo amostral ($n = 6$) foi baseado em dados obtidos de estudo anterior (SCARPARO *et al.*, 2014). O cálculo foi realizado com dados da inflamação periapical dos grupos experimentais após REP em molares de ratos, utilizando o programa estatístico SigmaPlot (12.0; Systat Software Inc.). Considerando poder de amostra de 95% e erro alfa de 0,05, o tamanho da amostra foi de 5 molares por grupo. Mas de acordo com o potencial de mortalidade destes animais, foi acrescentado um animal a mais por grupo, resultando em $n = 6$ animais/grupo, assim como em estudos prévios (BRACKS *et al.*, 2019; REIS-PRADO *et al.*, 2023; SCARPARO *et al.*, 2014).

Os procedimentos experimentais respeitaram os princípios éticos na experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (ANEXO A). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com 4 animais por gaiola, em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com ração e água filtrada *ad libitum*. Foi feita a higienização periódica do ambiente, com troca e higienização dos comedouros e bebedouros.

3.2 Divisão dos grupos

A divisão dos grupos e os procedimentos realizados podem ser visualizados na Tabela 1. Os primeiros molares imaturos superiores dos lados esquerdo ou direito dos 18 ratos, tiveram as polpas dentárias do canal mesial expostas, removidas, receberam irrigação com hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5% seguido de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% e solução salina (REIS-PRADO *et al.*, 2023). Então, foram divididos, aleatoriamente nos grupos apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Distribuição dos grupos experimentais, de acordo com os tratamentos realizados

Grupos	Tratamentos			
	Pulpectomia	Protocolo de irrigação	REP	Eutanásia
SI (n = 6)	Remoção do tecido pulpar da raiz mesial	NaOCl 2,5% (5 min), EDTA 17% (5 min), soro fisiológico (5 min)	Indução de sangramento intracanal e selamento da cavidade	21 dias
i- PRF (n = 6)	Remoção do tecido pulpar da raiz mesial	NaOCl 2,5% (5 min), EDTA 17% (5 min), soro fisiológico (5 min)	Inserção de i-PRF e selamento da cavidade	21 dias
i-PRF-SI (n = 6)	Remoção do tecido pulpar da raiz mesial	NaOCl 2,5% (5 min), EDTA 17% (5 min), soro fisiológico (5 min)	Inserção de i-PRF, indução do SI e selamento da cavidade	21 dias

Notas: REP: procedimento endodôntico regenerativo; SI: sangramento intracanal; i-PRF: fibrina rica em plaquetas injetável; NaOCl: hipoclorito de sódio; EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético.

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

3.3 Coleta sanguínea e preparo da i-PRF

Três ratos Wistar machos, com 2 meses de idade (aproximadamente 300 g), foram utilizados para a coleta da plaquetas-PRF. Para tanto, os animais foram anestesiados com sobredose anestésica (cloridrato de cetamina 300 mg/Kg e cloridrato de xilazina 30 mg/Kg), e em decúbito dorsal, o tórax do animal foi limpo com PVPI e aberto com tesoura na base do esterno, até expor o coração. Com a seringa e agulha 24G, o sangue foi aspirado lentamente, até se obter o volume de 9 mL de sangue/animal. Neste momento, o animal era eutanasiado em guilhotina.

O sangue coletado foi imediatamente centrifugado a 1200 RPM durante 8 minutos, utilizando tubos de plástico estéreis e sem sílica. Em seguida, a i-PRF produzida foi coletada com uma seringa descartável e imediatamente inserida nos canais radiculares.

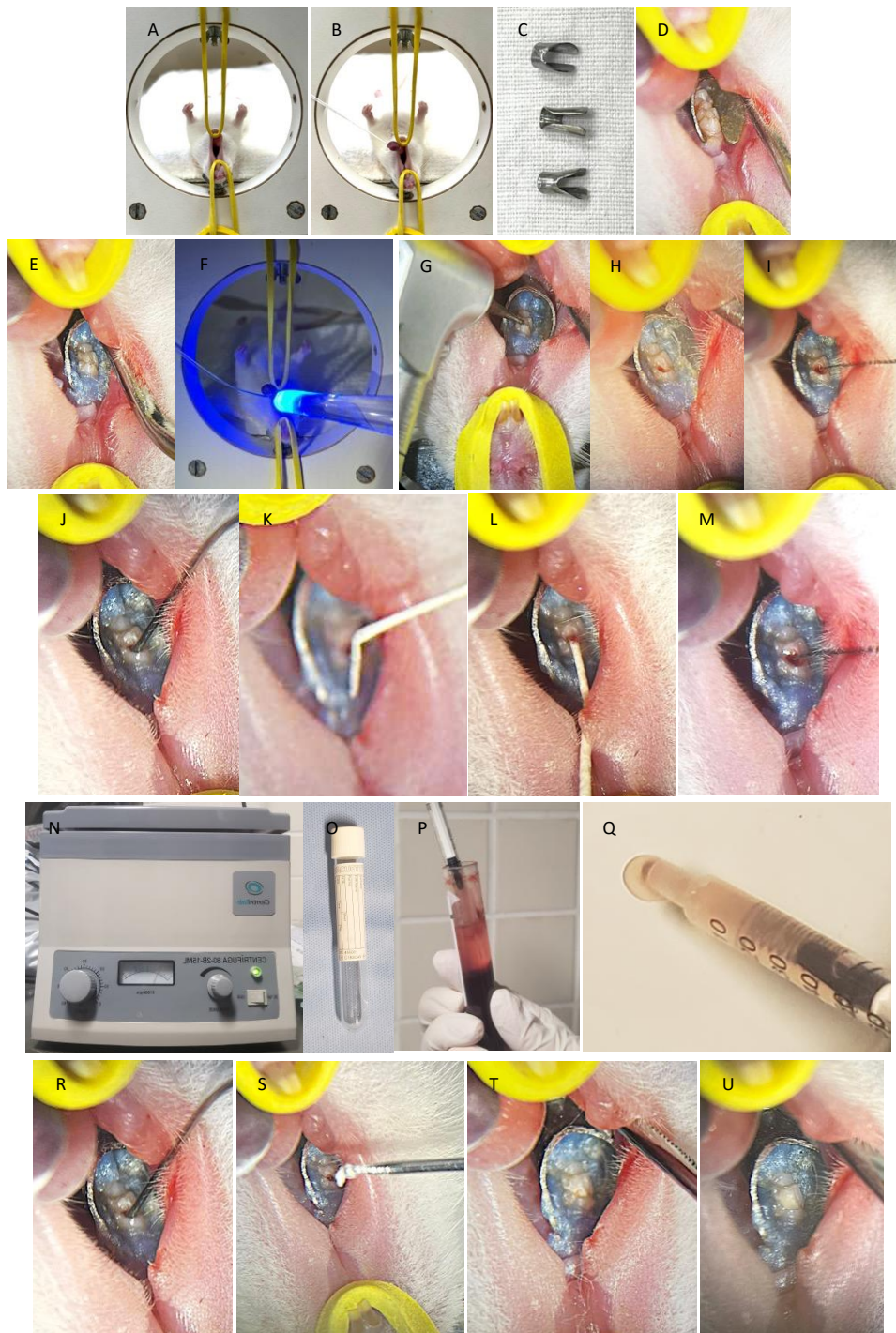
3.4 Procedimento Endodôntico Regenerativo (REP)

Para a anestesia dos animais, foi utilizado, via intraperitoneal, anestésico à base de cloridrato de Cetamina 10% (80 mg/kg; Dopalen, Vetbrands – Divisão de Saúde Animal, Jacareí, SP, Brasil) e sedativo à base de cloridrato de Xilazina 2% (10 mg/kg; Anasedan, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil). Todos os procedimentos experimentais foram realizados em bancada de laboratório com materiais esterilizados e auxílio de um microscópio operatório (Alliance, São Paulo, SP, Brasil), com aumento de 24× (BRACKS *et al.*, 2019). Após a anestesia dos animais, os primeiros molares superiores imaturos foram isolados com o auxílio de grampos especiais e barreira gengival (Top Dam, FGM, Joinville, SC, Brasil) (Figura 1). O campo operatório foi descontaminado com NaOCl 2,5%, para realização dos tratamentos de acordo com cada grupo. Os princípios clínicos de antisepsia do canal radicular foram baseados nos protocolos sugeridos pela AAE (2018) e Shimizu *et al.* (2013). Foi realizada a abertura coronária dos molares com brocas esféricas LN (diâmetro 0,06) estéreis (Dentsply Maillefer, Tulsa, OK, USA) em baixa rotação acopladas em um motor elétrico com velocidade controlada (Beltec, Araraquara, SP, Brasil), e sob irrigação constante com soro fisiológico. Após a exposição do canal mesial, foi realizada a pulpectomia com lima endodôntica tipo K #10 (Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland), no comprimento de trabalho (CT). O CT foi definido previamente por meio de exame radiográfico de lima introduzida no canal mesial de molares superiores imaturos de rato com mesma idade e peso em estudo piloto, identificando CT = 4 mm, como em estudo prévio (REIS-PRADO *et al.*, 2023).

Após remoção do tecido pulpar, os canais foram irrigados com solução de soro fisiológico para remoção de restos de remanescentes pulpare e secos com pontas de papel absorvente. Em seguida, os canais mesiais foram cuidadosamente irrigados com 0,01 mL/min de NaOCl 2,5%, por 5 min, 0,01 mL/min de EDTA 17%, por 5 min e 0,01 mL/min de soro fisiológico, por 5 min. Após o protocolo de antisepsia, os procedimentos operatórios foram realizados de acordo com o grupo experimental: no grupo SI uma lima endodôntica tipo K#10 foi pressionada 0,5 mm além do forame apical para induzir sangramento e estimular a formação de coágulo sanguíneo dentro do canal mesial (BRACKS *et al.*, 2019; REIS-PRADO *et al.*, 2023). Nos animais do grupo i-PRF, a i-PRF foi inserida com o auxílio de uma seringa descartável, enquanto nos animais do grupo i-PRF-SI, após introdução da i-PRF, tiveram o SI induzido, da

mesma forma como descrito no grupo SI, mas com a presença da i-PRF dentro do canal radicular. Posteriormente, uma bolinha de algodão estéril presa a uma pinça clínica auxiliou na remoção do excesso de sangue presente na coroa dentária. Os dentes foram selados com material reparador PBS CIMMO HP (CIMMO, Pouso Alegre, MG, Brasil), seguido de cimento de ionômero de vidro fotoativado (GC America Inc., Alsip, IL, EUA). Foi aplicada dipirona sódica (150 mg/Kg) nos animais, via subcutânea, para a analgesia pós-cirúrgica.

Figura 1- Imagens representativas da sequência do procedimento operatório.



Notas: (A,B) Posicionamento do rato na mesa cirúrgica; (C-F) isolamento dos molares superiores com posicionamento do grampo e barreira gengival; (G) posicionamento da broca e (H) exposição da câmara pulpar da raiz mesial do primeiro molar inferior; (I) pulpectomia com lima tipo K #10; (J) aplicação dos protocolos de irrigação; (K,L) secagem com pontas de papel absorvente; (M) indução do sangramento intracanal; (N-Q) sequência do preparo da i-PRF, com centrifuga e tubo utilizados, e coleta com seringa; (R) aplicação da i-PRF; (S-U) selamento com material reparador e cimento de ionômero de vidro.

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

3.5 Eutanásia e processamento laboratorial

Após 21 dias, os animais foram eutanasiados em guilhotina, após sedação. Então, foi removida toda a pele correspondente à face do animal e com dois cortes realizados com tesoura no ângulo da boca, realizou-se a separação da mandíbula e maxila. Empregando uma lâmina intercambiável nº 15 (Lamedid Comercial e Serviços LTDA, Barueri, SP, Brasil), montada em cabo de bisturi, foi realizada uma incisão em profundidade ao nível do plano sagital mediano, separando a maxila direita da esquerda. Empregando-se novamente uma tesoura, foi realizado outro corte de modo a tangenciar a borda da maxila, removendo os tecidos em excesso, possibilitando a obtenção das hemimaxilas com os primeiros molares superiores, objeto do estudo. As peças foram imediatamente colocadas em frascos individuais devidamente identificados, contendo solução de formaldeído a 4%, tamponada com pH neutro, durante as primeiras 24 horas e depois foram lavadas em água corrente por um período de 12 horas, para a remoção de toda solução de fixação. Após, as peças foram desmineralizadas em solução de EDTA neutro, a 10%, por aproximadamente 3 meses. Posteriormente, foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal, de vestibular para lingual. Após inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 4 µm de espessura, realizados em micrótomo (Leica - RM 2045, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). Para fins de padronização, o corte foi selecionado quando a raiz mesial possa ser visualizada em seu sentido longitudinal pleno.

As carcaças dos animais foram armazenadas em sacos plásticos brancos e acondicionadas em freezer até o descarte definido pelo Plano de Gerenciamento de Resíduos da UFMG, que consiste em incineração e aterro sanitário.

3.6 Forma de análise dos resultados

3.6.1 Análises histológicas

Para cada espécime, 2 lâminas com 3 cortes teciduais cada foram preparadas e coradas com hematoxilina-eosina (H&E) ou *picrossírius red* (PSR). Ainda, outras 2 lâminas foram obtidas por marcador para análise imuno-histoquímica. As seções histológicas foram analisadas com um microscópio óptico (100× e 400×, AxioLab A1 Plus - Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha), e com o software de imagem AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha), por um observador calibrado e cego quanto aos grupos experimentais.

As secções coradas em H&E foram utilizadas para análise da formação de tecido no interior dos canais radiculares, formação de tecido mineralizado nas paredes dos canais radiculares, e presença de células semelhantes a odontoblastos (REIS-PRADO *et al.*, 2023; PALMA *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2014). Estes parâmetros avaliados estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2- Avaliação histológica para cada parâmetro nos grupos experimentais após 21 dias de REP

Escores para cada parâmetro

Formação de tecido mineralizado nas paredes dos canais radiculares

0 = ausente

1 = aumento apenas em comprimento ou apenas em espessura

2 = aumento em comprimento e espessura

Presença de tecido mole neoformado no interior do canal radicular

0 = ausente

1 = presente no terço apical

2 = presente até o terço médio

3 = presente até o terço cervical

Células semelhantes a odontoblastos

0 = ausente

1 = presente no terço apical

2 = presente até o terço médio

3 = presente até o terço cervical

Fonte: elaborado pela autora, 2023.

3.6.2 Análise das fibras colágenas

Os níveis de maturação das fibras colágenas foram analisados em lâminas histológicas coradas com PSR sob microscopia de luz polarizada. O programa AxioVision Rel 4.8.2 foi utilizado (400×, AxioLab A1 Plus - Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha), permitindo a seleção de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno no tecido pulpar. Após a seleção da cor, o programa calculou automaticamente a área marcada de cada tipo de fibra colágena. As fibras amarelas-

esverdeadas são consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras amarelas-avermelhadas são consideradas maduras e grossas (CINTRA *et al.*, 2017). Os dados foram avaliados por um único operador, calibrado e cego.

3.6.3 Análise imunohistoquímica

As avaliações imunohistoquímicas foram realizadas utilizando a técnica de imunoperoxidase indireta (BENETTI *et al.*, 2019a; 2019b) para PCNA e OCN. Os cortes histológicos foram desparafinizados em xilol e hidratados em série decrescente de etanol (100°- 100°- 100°- 90°- 70° GL). A recuperação antigênica foi realizada através da imersão das lâminas histológicas em tampão Diva Decloaker® (Biocare Medical, CA, USA), em câmara pressurizada Decloaking Chamber® (Biocare Medical, CA, USA), a 95°C, por 10 minutos. Após lavagens em tampão fosfato salino (PBS, do inglês *phosphate buffered saline* 0,1M, pH 7,4, as lâminas histológicas foram imersas em 3% de peróxido de hidrogênio, por 1 hora, para o bloqueio da peroxidase endógena. Em prosseguimento, após lavagens em PBS, os cortes histológicos foram tratados com 3% de soro albumina bovino por 12 horas, para bloqueio dos sítios inespecíficos.

Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram submetidas à incubação com os anticorpos primários: anti-PCNA e anti-OCN (do rato gerado em coelho, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes se empregou o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotilado, durante 2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX se procedeu a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracolorados com *Fastgreen* (para as lâminas de PCNA), ou Hematoxilina de Harris (para as lâminas de OCN). Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconheceu os grupos experimentais que estiverem sendo analisados. Para PCNA, a imunomarcção foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no núcleo celular. Em cada espécime, foi analisado todo o terço apical do tecido neoformado no interior dos canais radiculares, em aumento de 400x. Uma análise quantitativa foi efetuada, onde as células foram contadas e os resultados foram expressos em quantidade de células imunomarcadas por mm^2 (BENETTI *et al.*, 2017; 2019a; 2019b). Para OCN, a imunomarcção foi definida como a coloração acastanhada presente no citoplasma das células e na matriz extracelular. Como ambas imunomarcções nas células e na matriz extracelular são importantes para este marcador, uma análise semi-quantitativa foi realizada através de escores (BENETTI *et al.*, 2017, 2019a). Os escores utilizados foram (BENETTI *et al.*, 2019a; 2019b): 0 – ausência de imunomarcção (ausência de marcação na matriz extracelular e completa ausência de células imunorreativas); 1 – leve padrão de imunomarcção (marcação fraca na matriz extracelular e aproximadamente um quarto das células imunorreativas); 2 – moderado padrão de imunomarcção (moderada marcação da matriz extracelular e aproximadamente metade das células imunorreativas); 3 – forte padrão de imunomarcção (marcação forte da matriz extracelular e aproximadamente três quartos das células imunorreativas); 4 – extremamente forte padrão de imunomarcção (marcação extremamente forte da matriz extracelular e praticamente todas as células imunorreativas).

3.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste estatístico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4 ARTIGO

O artigo "Influence of injectable platelet rich fibrin on regenerative endodontic procedure in rat's immature molars" foi submetido ao periódico *Journal of Endodontics* (Qualis A1, Fator de Impacto = 4.2).

Influence of injectable platelet rich fibrin on regenerative endodontic procedure in rat's immature molars

Abstract

Introduction: This study evaluated the influence of injectable platelet-rich fibrin (i-PRF) on repair after regenerative endodontic procedure (REP) in immature molars of rats. **Methods:** Upper molars of 18 rats were divided into groups (n = 6): IB – the pulp tissue of the mesial canal was removed, irrigation with sodium hypochlorite and ethylenediaminetetraacetic acid was performed, and intracanal bleeding (IB) was induced; i-PRF – after the irrigation protocol, i-PRF was inserted inside the root canal; i-PRF-IB – the treatment was carried out as in the i-PRF group, followed by IB induction. The teeth were sealed. After 21 days, the animals were euthanized, and the samples were prepared for histological and immunohistochemical analysis for osteocalcin (OCN) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). Statistical test was applied ($P < 0.05$). **Results:** There was formation of mineralized tissue in root length or thickness in all groups. The formation of connective tissue in the canals occurred up to the medium third in IB group, and up to the cervical third in i-PRF and i-PRF-IB ($P < 0.05$). There were odontoblast-like cells in the apical third of the i-PRF specimens, and apical and middle thirds in i-PRF-IB group; these cells were not found in the IB group ($P < 0.05$). The i-PRF and i-PRF-IB group had significant higher number of PCNA-positive cells ($P < 0.05$), and higher OCN immunolabeling, mainly i-PRF-IB compared to IB group ($P < 0.05$). **Conclusion:** I-PRF induced connective tissue formation inside root canals, presence of odontoblast-like and PCNA-positive cells, and OCN immunolabeling, mainly when associated with IB.

Keywords: Osteocalcin; PCNA; platelet rich fibrin; regenerative endodontic.

Introduction

The indication of endodontic treatment in necrotic immature teeth is the regenerative endodontic procedure (REP), because the roots are thin and susceptible to fractures (1,2). In addition, conventional endodontic treatment presents challenges in filling the root canal system in these teeth, due to the non-formation of the apical foramen, resulting in a divergent root shape and wide apex (3). REP allows the development of a new tissue within the root canals, based on tissue engineering, besides the end of root development with an increase in dentin in length and thickness, which reduces the chances of fracture of these teeth (3-5).

Platelet-rich fibrin (PRF) is a platelet concentrate for autologous use that has been shown to be efficient in tissue regeneration in surgical applications (6). It has been used in REP as it is rich in platelets, which can release important growth factors for tissue regeneration, in addition to serving as scaffold to guide cell proliferation and growth (7). Injectable PRF (i-PRF) was developed in 2014, and recent studies show that it can act as a dynamic three-dimensional fibrin gel incorporated with platelets, leukocytes, collagen, osteocalcin and growth factors, to modulate inflammatory processes and promote osteogenesis (8-10). It may allow better bone regeneration than PRF, and elimination of endodontic infection (8-10). In endodontics, the choice for i-PRF may still be mainly due to its easy introduction inside the root canal.

However, although there are some recent studies, i-PRF has been understudied in REP, and while some studies have shown better clinical results when using PRF in endodontic regeneration (11,12), other studies found no advantage in its use (13,14). Still, there is a lack of *in vivo* studies evaluating the effects of i-PRF in the REP, to help understand the benefits of this procedure. Thus, this study evaluated the influence of i-PRF on the repair process after REP in immature rat molars.

Materials and methods

Eighteen 4-week-old male Wistar albino rats (80 g) were used. The sample size was calculated using data of periapical inflammation of the two experimental groups after REP in rat molar of a previous study (15). The calculation was performed using *t*-test sample size. Considering 95% power and alpha-type error level of 0.05, the sample size was of five molars/experimental group. Considering the potential of animal mortality, one more animal was added in each group, resulting in six rats per group, similar to previous studies (15,16). Another three animals weighing approximately 300g (Wistar albino rats; 2 months-old) were used for

blood collection for PRF obtention. The animals were housed in a temperature-controlled environment (22–24°C) with a 12-h light–dark cycle and water and feed *ad libitum*. The study was approved by the local Animal Research Ethics Committee (CEUA 238/2022) and conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health.

Preparation of injectable platelet-rich fibrin (i-PRF)

The three rats were used for collected blood (9-mL) by direct puncture into the heart. The blood was immediately centrifuged at 1200 rpm for 8 minutes, using plastic tube without additives. Then, the upper yellow fluid liquid (i-PRF) produced was collected with a disposable syringe, which was used for insertion into the root canals.

Regenerative endodontic procedure (REP)

The animals were anesthetized with ketamine 10% (80 mg/kg) and xylazine 2% (15 mg/kg). The upper left or right first immature molars of the animals were used, and operative procedures were performed using an operating microscope (24× magnification; Alliance, São Paulo, SP, Brazil). The teeth were isolated with special dental clamp and sealed with gingival barrier (Top dam, FGM, Joinville, SC, Brazil). Then, endodontic access in mesial root canal was carefully performed with a sterile long neck (LN) round bur with diameter of 0.06 mm (Dentisply Maillefer, Tulsa, OK, USA) and under constant irrigation with saline solution (17). After exposing the pulp, the pulpectomy on the mesial root canal was performed using size 10 K-files in one working length of 4 mm (17). Then, mesial canal was carefully and gently irrigated with 0.1 mL/min of 2.5% NaOCl during 5 min, followed by 17% EDTA, also for 5 min (0.1 mL/min). Subsequently, the canals were irrigated with saline solution and dried with sterile absorbent paper points. Then, the REP protocol was performed according to the experimental groups: IB group - intracanal bleeding (IB) was induced by introducing a 10 K-file at 0.5 mm beyond the apical foramen, using a counterclockwise push-and-pull motion until the root canal was filled with blood from the periapical tissues (16,17); i-PRF group – i-PRF was inserted with the aid of a disposable syringe without IB induction; i-PRF-IB group: i-PRF was inserted followed of IB induction. Then, the molars were sealed with PBS CIMMO HP (CIMMO, Pouso Alegre, MG, Brazil) repair material followed for resin-modified glass ionomer cement light-cured.

Sample preparation and histological analysis

At the 21 days after REP, the rats were euthanized with an overdose of anesthetic. The right and left jaws were separated, fixed in a solution of 4% buffered formaldehyde (24-h) and decalcified in 10% EDTA solution (45 days). Then, the specimens were processed and embedded in paraffin. Serial histological sections (4 μ m) were cut in the mesiosagittal plane and were selected from the point where the mesial root of the first molar was seen in all its longitudinal extension. After, the histological sections were stained with hematoxylin-eosin (H&E), picrosirius red (PSR), and for immunohistochemical analysis (17-19).

The analyses were performed under light microscopy (400 \times magnification; DM4000 B; Leica Microsystems) by a single calibrated and blinded operator to the groups. The tissues were analyzed and scored according to the histological parameters involving presence of mineralized tissue formed on the walls of the root canal (17,20,21), newly intracanal connective tissue (17), and odontoblast-like cells. These rated parameters were described in Table 1. The collagen fiber maturation was analyzed in the sections stained by PSR under polarized light microscopy. The images were obtained of the apical third of the root canal (400 \times magnification; QWin V3, Leica Microsystems), allowing the selection of corresponding colors for each type of collagen fiber. After color selection, the program automatically calculated the marked area of each collagen fiber type inside the pulp chamber. Greenish-yellow fibers were classified as immature-thin, whilst yellowish-red fibers were considered mature-thick (22).

Immunohistochemical analyses

The immunohistochemical assessments was performed using an indirect immunoperoxidase technique (18,19) for proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and osteocalcin (OCN). Histological sections were deparaffinized and hydrated. Antigen retrieval was performed by immersing the histological slides in buffer citrate solution (pH 6.0, Antigen Retrieval Buffer, Spring Bioscience Corporation, Pleasanton, CA, USA) in a pressurized chamber (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Concord, CA, USA) at 95°C (10 min). The slides were rinsed with phosphate-buffered saline at the end of each stage of the immunohistochemical reaction. The histological sections were immersed in 3% hydrogen peroxide solution (1h20 min) and in 1% bovine serum albumin (12-h) to block the endogenous peroxidase activity and nonspecific sites, respectively. The histological slides were divided and incubated with one of the following primary antibodies: anti-PCNA and anti-OCN (rabbit primary antibodies, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which were diluted (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako Laboratories, Carpinteria, CA, USA) and placed in a moist chamber (24-h). Then, the histological sections were incubated with a

biotinylated secondary antibody and with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (1h30 min each) (Universal Dako Labelled Streptavidin-Biotin kit, Dako Laboratories, CA, USA). The reaction was then developed using the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Chromogen kit, Dako Laboratories) and counterstained with fast green (sections for PCNA immunolabeling) or Harris hematoxylin (sections for OCN immunolabeling). The negative controls were submitted to the procedures but without the primary antibodies.

Immunolabeling was evaluated in the tissue inside root canal (400× magnification). For PCNA analysis, cells that had a brown nucleus were counted and were analyzed as the number of cells per mm² (18,19). The immunolabeling of OCN was defined as the presence of a brownish color in the cytoplasm of the cells and extracellular matrix. Because immunolabeling of both the cells and the extracellular matrix is of great importance for study, a semi-quantitative analysis was performed, which provides information on the numbers of immunolabelled cells and immunolabeling intensity of the extracellular matrix. The scores were assigned as showed in Table 3 of Results section (19).

Statistical analysis

The data were analyzed using the Kruskal-Wallis followed by Dunn test ($P < 0.05$).

Results

Histologic findings

Representative images and data of the histological analysis and data can be seen in Figure 1 and Table 1. Regarding mineralized tissue formed on the root canal wall, at 21 days of REP, the most specimens of all experimental groups had increase in length or thickness on the root canal wall, without significant difference between the groups ($P > 0.05$). The difference was observed regarding parameter of newly formed soft tissue on the root canal, with tissue formation up to the cervical third of the canal in all specimens of i-PRF and i-PRF-IB groups,

while the most specimens of IB group had tissue formation up to the middle third ($P < 0.05$). Odontoblast-like cells were observed mainly in apical and medium thirds of root canal in i-PRF group, and medium third in i-PRF-IB group, but were absent in IB group; the significant difference was observed between i-PRF-IB and IB groups ($P < 0.01$). The groups exhibited more maturation collagen in the apical third of root canal, mainly in i-PRF-IB group when compared to the IB group ($P < 0.05$) (Table 2).

Table 1 Histologic evaluation for each parameter in experimental groups after 21 days of REP

Scores for each parameter	Experimental groups (n = 6)			P-value
	IB	i-PRF	i-PRF-IB	
Mineralized tissue formed on the root canal wall				
0 = absent	0/6	0/6	0/6	
1 = increase only in length or only in thickness	4/6	4/6	4/6	= 0.770
2 = increase in length and thickness	2/6	2/6	2/6	
Median	1 ^a	1 ^a	1 ^a	
Presence of newly connective tissue on the root canal				
0 = absent	0/6	0/6	0/6	
1 = within the apical third	1/6	0/6	0/6	= 0.002*
2 = extending to the medium third	4/6	0/6	0/6	
3 = extending to the cervical third	1/6	6/6	6/6	
Median	2 ^a	3 ^b	3 ^b	
Odontoblast-like cells				
0 = absent	6/6	3/6	1/6	
1 = present in the apical third	0/6	3/6	3/6	= 0.014*
2 = present in the medium third	0/6	0/6	2/6	
3 = present in the cervical third	0/6	0/6	0/6	
Median**	0 ^a	0,5 ^{ab}	1 ^b	

The symbol * indicates presence of significant difference between the groups ($P < 0.05$). The data were analyzed using the Kruskal-Wallis followed by Dunn test.

**Same letters in the row indicate no statistically significant difference among the groups.

IB: intracanal bleeding; PRF: Platelet rich fibrin.

Table 2 Percentages of immature and mature collagen fibres according to the experimental groups (n = 6) after 15 days of REP

Groups	% collagen fibres \pm SD [median (IQR: Q1; Q3)]		
	Immature	Mature	
IB	17.1 \pm 10.8 [19.7 (3.9; 27.7)] ^a	82.9 \pm 10.8 [80.4 (72.3; 96.2)] ^a	*The data were
i-PRF	3.3 \pm 1.6 [3.4 (1.8; 4.7)] ^{ab}	96.7 \pm 1.6 [96.6 (95.3; 98.2)] ^{ab}	
i-PRF-IB	2.8 \pm 1.6 [3.0 (0.9; 4.5)] ^b	97.2 \pm 1.6 [97.0 (95.5; 99.1)] ^b	
<i>P</i> -value*	0.029	0.029	

analysed using the Kruskal-Wallis followed by Dunn test ($P < 0.05$). Same letters in the column indicate no statistically significant difference among the groups.

IQR, interquartile range; Q1, lower quartile (25%); Q3, upper quartile (75%); REP: regenerative endodontic procedure; IB: intracanal bleeding; PRF: Platelet rich fibrin.

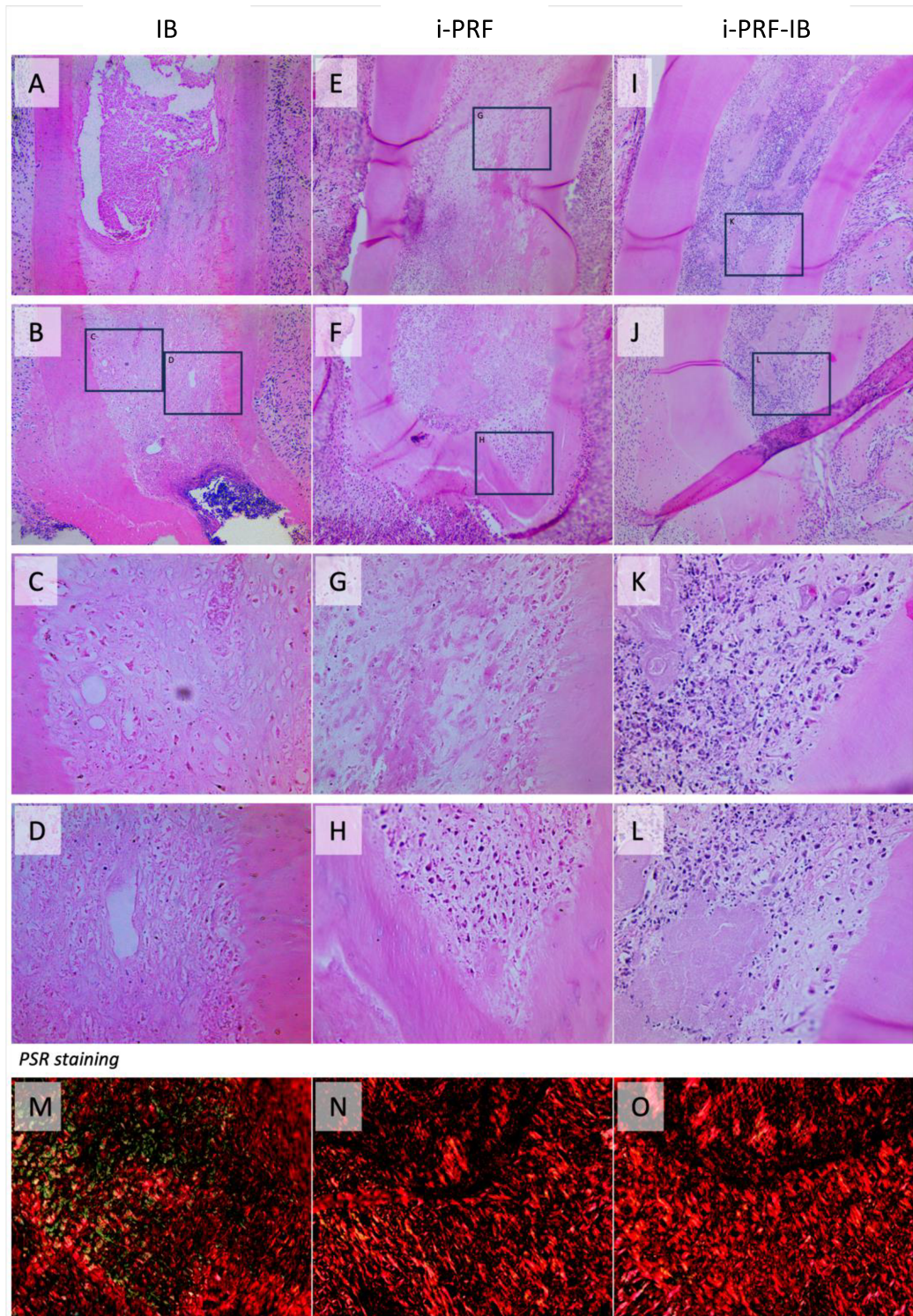


Figure 1. Representative images of histological analysis. Images of (A-D) IB group, showing newformed tissue up middle third of root canal, and of (E-H) i-PRF and (I-L) i-PRF-IB groups with newformed tissue up cervical third of root canal. In the collagen maturation analysis, image of (M) IB group shows more mature fibers of collagen, but mainly in (N) i-PRF and (O) i-PRF-IB groups. [Hematoxylin-eosin staining, 100x, 400x; Picosirius red staining, 400x]

PCNA and OCN immunolabeling

Representative images of the PCNA and OCN can be seen in Figure 2, whereas the analysis for each marker is displayed in Figure 2 and Table 3, respectively. The i-PRF and i-PRF-IB groups had significantly higher number of PCNA-positive cells/mm² in the apical and middle thirds of the newformed tissue inside the root canals, compared to the IB group ($P < 0.05$). No PCNA-positive cells were found in the cervical thirds.

Immunolabelling of OCN was observed in the extracellular matrix and cytoplasm of cells present in the newformed tissue inside the root canals of all groups. IB group had low and moderate immunolabeling of OCN, i-PRF had mainly moderate to strong pattern of immunolabeling, and i-PRF-IB had moderate to very strong pattern of immunolabeling; the significant difference was observed between IB and i-PRF-IB groups ($P < 0.05$).

Table 3 Osteocalcin (OCN) immunolabeling evaluation in experimental groups after 21 days of REP

Scores for OCN immunolabeling	Experimental groups (n = 6)			P-value
	IB	i-PRF	i-PRF-IB	
0 = immunolabeling missing (absence of labeling in extracellular matrix and complete absence of immunoreactive cells)	0/6	0/6	0/6	
1 = low pattern of immunolabeling (weak labeling of the extracellular matrix and approximately one quarter of the immunoreactive cells)	3/6	1/6	0/6	
2 = moderate pattern of immunolabeling (moderate labeling of the extracellular matrix and approximately one half of the immunoreactive cells)	3/6	2/6	2/6	0.032*
3 = strong pattern of immunolabeling (strong labeling of the extracellular matrix and approximately three quarters of the immunoreactive cells)	0/6	2/6	2/6	
4 = very strong pattern of immunolabeling (extremely strong labeling of the extracellular matrix and approximately all immunoreactive cells)	0/6	1/6	2/6	
Median**	1,5 ^a	2,5 ^{ab}	3 ^b	

*The data were analyzed using the Kruskal-Wallis followed Dunn test ($P < 0.05$).

**Same letters in the row indicate no statistically significant difference among the groups.

IB: intracanal bleeding; PRF: Platelet rich fibrin.

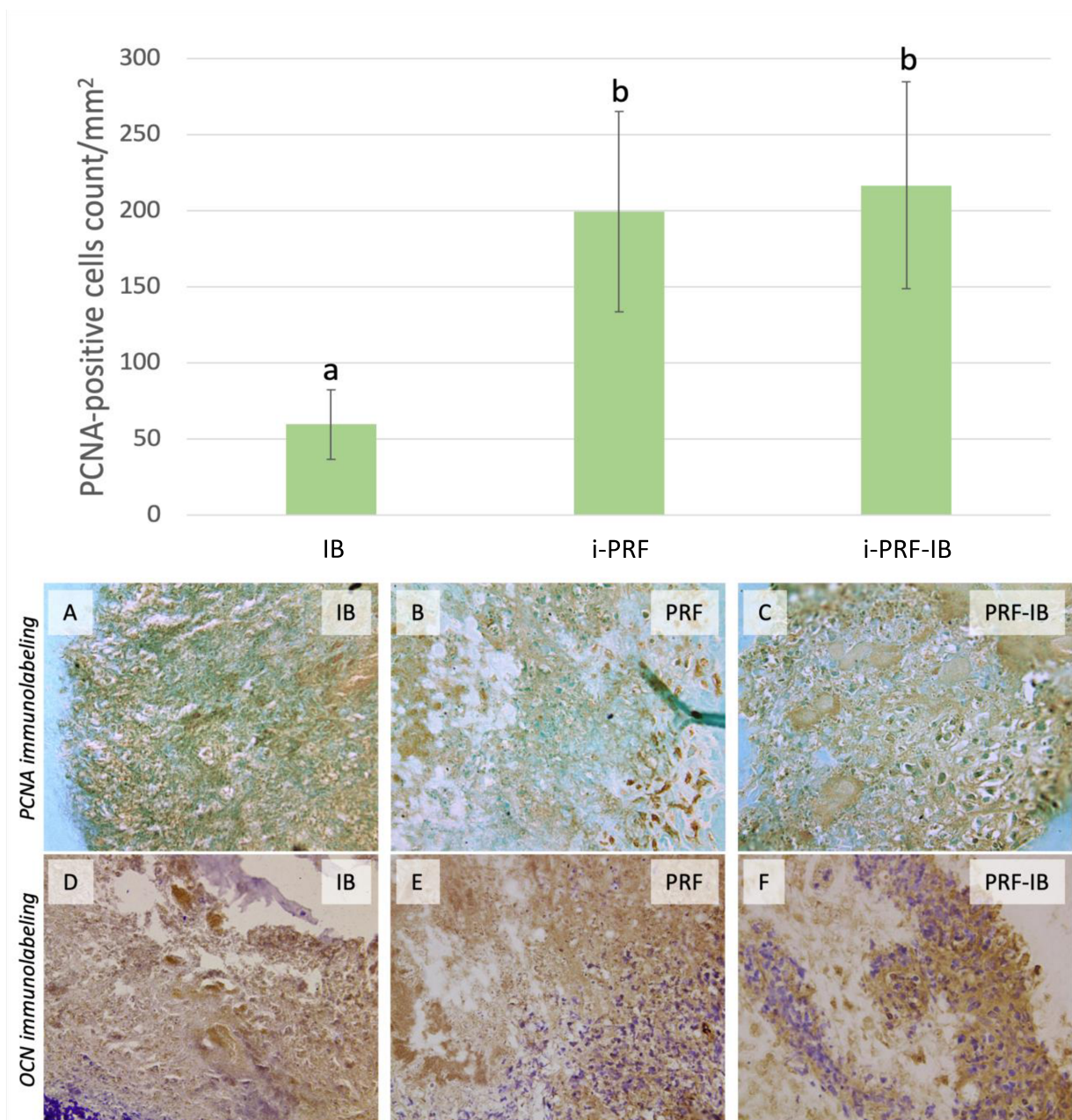


Figure 2. Representative images of PCNA and OCN analysis. Graphical showing the results of PCNA-positive cells count/mm². Different letters indicate significant difference between groups ($P < 0,05$). Images of (A-C) PCNA analysis, with increased number of immunolabeled cells in (B,C) i-PRF and i-PRF-IB groups, and of (D-F) OCN analysis, with higher immunolabeling in (E,F) i-PRF and i-PRF-IB groups. [Immunohistochemical analysis of PCNA and OCN, 400x]

Discussion

This study evaluated the influence of i-PRF on the tissue repair after REP in rat immature molars. It was observed that i-PRF induced the formation of connective tissue within the root canals, the presence of odontoblast-like cells, and collagen maturation, although it did not influence the formation of mineralized tissue. I-PRF also increased the number of PCNA-positive cells in tissue on the root canal, as well as the presence of OCN, mainly when it was associated with the induction of the IB.

In a recent study, the rat molars were used to analyze the influence of ethylenediaminetetraacetic acid on the repair process after REP (17), and is an acceptable and standardized model because rats has similar repair process to humans, as well as the molars had similar histological and anatomical characteristics (23,24). Human teeth were not used due to the difficulty of obtaining an adequate sample to histological analysis, and due to ethical principles (25).

In this study, i-PRF induced the tissue formation inside the root canal, but not influenced the mineralized tissue formation in the root canal walls. To our knowledge, few studies have evaluated i-PRF in REP results, which makes it difficult to discuss the results found. A recent clinical study evaluated the i-PRF in the regeneration of traumatized necrotic immature maxillary teeth and observed significant decrease in apical canal diameter when compared to use of platelet-rich plasma (26). However, there was no IB-only control group without the use of platelet aggregates. There is also a published randomized clinical trial protocol that will evaluate the efficacy of i-PRF and blood clots as scaffolds in REP (27), which may soon yield important clinical results regarding the use of i-PRF in REP.

To date, studies have primarily evaluated PRF in REP rather than i-PRF. A clinical study evaluated necrotic immature permanent teeth after REP and showed that PRF was not able to induce higher formation of mineralized tissue in root length or thickness in the teeth (28), which corroborates the results found in this study. However, a review exposed that apical closure occurs more frequently when PRF is used during REP (29) and other clinical study demonstrated that PRF can induce higher formation of mineralized tissue in necrotic immature permanent teeth (30). The different results may be due to different analysis times or even the protocol used in REP or for preparing the PRF. It is observed, for example, that not all studies identify the time and speed at which the blood was centrifuged to prepare the PRF (30). There is a lack of a standard protocol for REP with platelet aggregates, which may limit the use of PRF or i-PRF in endodontics, as different protocols may result in different results. It is

noteworthy that to produce the i- PRF in this study, 9 mL of blood were centrifuged at 1200 rpm for 8 min.

I-PRF induced the tissue formation of connective tissue inside the root canals in this study, in addition to the presence of odontoblast-like cells. A recent study showed the importance of PRF for odontoblast differentiation, which was not observed in the group without PRF (20). The odontoblast-like cells were not observed in IB group, as well as in previous study that performed REP in molar rats (17), which shows that the PRF is an important factor for the difference found. These data are interesting, since normally odontoblast-like cells are not observed in the newly formed tissue in REP. These cells were thus considered when they presented a columnar format, at the dentin-tissue interface. However, more adequate analyzes are needed to confirm the formation of these cells, as immunohistochemical markers.

The present results found significant presence of PCNA-positive cells when using the i-PRF, which is consistent with the histological results obtained. These cells were found mainly in the apical and middle thirds of the root canal. It is possible that in longer periods, cells close to the cervical third are positive for PCNA. However, the number of PCNA-positive cells was significantly lower in the IB group, which may show the importance of growth factors of i-PRF for cell proliferation. On the other hand, the collagen fibres were mature in the apical third of the root canal in all groups, indicating the formation of a consistent tissue within the canal.

PRF promoted osteogenic differentiation in previous study (20), which agrees with the present study, which shows significant immunolabeling of OCN when i-PRF was used. OCN can be also related to a more fibrous tissue, and not just to the induction of mineralization. This corroborates with the PSR results of this study, that show more maturation in groups with i-PRF. Other recent laboratorial study showed that different preparations of PRF, including i-PRF, can increase the osteogenic potential of osteoblasts-like cells (31). The presence of a mineralization marker may indicate the induction of mineralized tissue formation, which is important in REP, where an increase in thickness and length of the root canal walls is required. However, in the histological analysis, there was no difference between the groups, regardless of the use of PRF. It may be that the OCN precedes the mineralization process, which could be significantly observed at a later period. Also, the histological results of this study regarding the formation of mineralized tissue may explain why, in some clinical studies, no advantages are observed in the use of PRF in REP, since one of the factors evaluated is the radiographic results (13,14).

In conclusion, despite the limitations of this study, such as the experimental animal model and the absence of endodontic infection, this study shows that i-PRF may be important to improve tissue neof ormation within the root canals in REP.

Acknowledgement

This research was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (n. 001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (n. 310683/2022-0).

The authors deny any conflicts of interest.

References

- [1] Law AS. Considerations for regeneration procedures. *J Endod.* 2013;39:44-56.
- [2] Ribeiro JS, Münchow EA, Ferreira Bordini EA, de Oliveira da Rosa WL, Bottino MC. Antimicrobial Therapeutics in Regenerative Endodontics: A Scoping Review. *J Endod.* 2020;46:115-127.
- [3] Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics.* 2013;28:2-23.
- [4] Albuquerque MT, Valera MC, Nakashima M, Nör JE, Bottino MC. Tissue-engineering-based strategies for regenerative endodontics. *J Dent Res* 2014;93:1222-1231.
- [5] Dos Reis-Prado AH, Abreu LG, Fagundes RR, Oliveira SC, Bottino MC, Ribeiro-Sobrinho AP, Benetti F. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review. *Int Endod J.* 2022 Jun;55(6):579-612.
- [6] Takamori ER, Teixeira MVT, Menezes K, Carias RBV, Borojevic R. Fibrina rica em plaquetas: preparo, definição da qualidade, uso clínico. *Vigil Sanit Debate.* 2018;6:118–124.
- [7] Youssef A, Ali M, ElBolak A, Hassan R. Regenerative endodontic procedures for the treatment of necrotic mature teeth: A preliminary randomized clinical trial. *Int Endod J.* 2022 Apr;55(4):334-346.
- [8] Wang X, Zhang Y, Choukroun J, Ghanaati S, Miron RJ. Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. *Platelets.* 2018;29(1):48–55.
- [9] Varela HA, Souza JCM, Nascimento RM, Araújo RF, Jr, Vasconcelos RC, Cavalcante RS, Guedes PM, Araújo AA. Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. *Clin Oral Investig.* 2019;23(3):1309–1318.

- [10] Zhang J, Yin C, Zhao Q, Zhao Z, Wang J, Miron RJ, Zhang Y. Anti-inflammation effects of injectable platelet-rich fibrin via macrophages and dendritic cells. *J Biomed Mater Res A*. 2020;108(1):61–68.
- [11] Ulusoy AT, Turedi I, Cimen M, Cehreli ZC. Evaluation of Blood Clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. *J Endod*. 2019;45:560-566.
- [12] Narang I, Mittal N, Mishra N. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: A clinical study. *Contemp Clin Dent*. 2015;6:63-68.
- [13] Ragab RA, Lattif AEAE, Dokky NAEWE. Comparative Study between Revitalization of Necrotic Immature Permanent Anterior Teeth with and without Platelet Rich Fibrin: A Randomized Controlled Trial. *J Clin Pediatr Dent*. 2019;43(2):78-85.
- [14] Riaz A, Shah FA. Regenerating the Pulp-Dentine Complex Using Autologous Platelet Concentrates: A Critical Appraisal of the Current Histological Evidence. *Tissue Eng Regen Med*. 2021 Feb;18(1):37-48.
- [15] Scarparo RK, Dondoni L, Böttcher DE, Grecca FS, Rockenbach MI, Batista EL Jr. Response to intracanal medication in immature teeth with pulp necrosis: an experimental model in rat molars. *J Endod*. 2011;37:1069-1073.
- [16] Bracks IV, Espaladori MC, Barros P, de Brito LCN, Vieira LQ, Ribeiro Sobrinho AP. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerative endodontic therapy. *Int Endod J*. 2019;52:1457-1465.
- [17] Reis-Prado AH, Oliveira S, Goto J, *et al*. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on the regenerative endodontic procedure in an immature rat molar model. *Int Endod J*. 2023;56:69-79.
- [18] Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, Ervolino E, Briso ALF, Sivieri-Araújo G, Dezan-Júnior E, Cintra LTA. Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo: Effects of the dental bleaching in pulp. *Arch Oral Biol*. 2017 Sep;81:103-109.
- [19] Benetti F, Briso ALF, Carminatti M, *et al*. The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. *Int Endod J*. 2019;52:665-675.
- [20] Zhang J, Wu J, Lin X, Liu X. Platelet-rich Fibrin Promotes the Proliferation and Osteo-/odontoblastic Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2023;18:560-567.

- [21] Palma PJ, Ramos JC, Martins JB, Diogenes A, Figueiredo MH, Ferreira P, Viegas C, Santos JM. Histologic Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures with the Use of Chitosan Scaffolds in Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. *J Endod.* 2017 Aug;43(8):1279-1287.
- [22] Terayama AM, Benetti F, de Araújo Lopes JM, Barbosa JG, Silva IJP, Sivieri-Araújo G, Briso ALF, Cintra LTA. Influence of low-level laser therapy on inflammation, collagen fiber maturation, and tertiary dentin deposition in the pulp of bleached teeth. *Clin Oral Investig.* 2020 Nov;24(11):3911-3921.
- [23] Sasaki T, Kawamata-Kido H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol.* 1995;40:209-219.
- [24] Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim.* 2010;44:1-6.
- [25] Cintra LT, Benetti F, Ferreira LL, *et al.* Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agents. *J Appl Oral Sci.* 2016;24:95-104.
- [26] Abo-Heikal MM, El-Shafei JM, Shouman SA, Roshdy NN. Evaluation of the efficacy of injectable platelet-rich fibrin versus platelet-rich plasma in the regeneration of traumatized necrotic immature maxillary anterior teeth: A randomized clinical trial. *Dent Traumatol.* 2023 Aug 23; *in press.*
- [27] Liang Y, Ma R, Chen L, Dai X, Zuo S, Jiang W, Hu N, Deng Z, Zhao W. Efficacy of i-PRF in regenerative endodontics therapy for mature permanent teeth with pulp necrosis: study protocol for a multicentre randomised controlled trial. *Trials.* 2021 Jul 6;22(1):436.
- [28] Shivashankar VY, Johns DA, Maroli RK, *et al.* Comparison of the Effect of PRP, PRF and Induced Bleeding in the Revascularization of Teeth with Necrotic Pulp and Open Apex: A Triple Blind Randomized Clinical Trial. *J Clin Diagn Res.* 2017;11:34-39.
- [29] Murray PE. Platelet-Rich Plasma and Platelet-Rich Fibrin Can Induce Apical Closure More Frequently Than Blood-Clot Revascularization for the Regeneration of Immature Permanent Teeth: A Meta-Analysis of Clinical Efficacy. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;6:139.
- [30] Narang I, Mittal N, Mishra N. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: A clinical study. *Contemp Clin Dent.* 2015 Jan-Mar;6(1):63-8.
- [31]** Kosmidis K, Ehsan K, Pitzurra L, Loos B, Jansen I. An in vitro study into three different PRF preparations for osteogenesis potential. *J Periodontal Res.* 2023 Jun;58(3):483-4.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos é justificado pelo uso de princípios da engenharia tecidual, como a migração e diferenciação de células-tronco, a liberação de fatores de crescimento que auxiliem nessa migração e diferenciação celular, além do uso de um scaffold que funciona como uma matriz tridimensional de suporte para organização tecidual.

A fibrina rica em plaquetas injetável é um concentrado plaquetário de uso autólogo, ainda pouco utilizado na endodontia. Ela atua como um gel tridimensional dinâmico de fibrina, que incorporado com plaquetas, leucócitos, colágeno, osteocalcina e fatores de crescimento, consegue modular processos inflamatórios e promover a osteogênese. Por ser fluida, ela apresenta vantagens devido a sua fácil introdução no interior do canal radicular. O uso da i-PRF em procedimentos endodônticos regenerativos pode ser uma alternativa para melhorar a neoformação tecidual no interior dos canais radiculares.

Os resultados do estudo *in vivo* presente neste trabalho nos permitem concluir que: a) a i-PRF induziu a formação de tecido conjuntivo dentro dos canais radiculares, além de possibilitar a presença de células semelhantes à odontoblastos, embora não tenha sido capaz de induzir formação de tecido mineralizado em espessura e/ou comprimento da raiz; b) a i-PRF induziu, a maturação das fibras colágenas; c) a i-PRF aumentou o número de células positivas para PCNA e OCN, principalmente quando associada a indução de sangramento intracanal.

REFERÊNCIAS

- AKSEL, H. *et al.* Dentin Conditioning Protocol for Regenerative Endodontic Procedures. **Journal of Endodontics**, v. 46, p. 1099-104, 2020.
- ALBUQUERQUE, M. T. P. *et al.* Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 12, p. 1222–1231, 2014.
- AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTICS. AAE Clinical Consideration for a Regenerative Procedure. **Revised**. v.4, n.1, p.18, 2018.
- ANDREASEN, F. M.; KAHLER, B. Pulpal Response after Acute Dental Injury in the Permanent Dentition: Clinical Implications – A Review. **Journal of Endodontic**, v. 41, n. 3, p. 299-308, Mar. 2015.
- ANDREASEN, J.O.; FARIK, B.; MUNKSGAARD, E.C. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. **Dental Traumatology**, v. 18, n.3, p. 134-137, 2002.
- AZEVEDO, M.M. *et al.* Hypoxia inducible factor-stabilizing bioactive glasses for directing mesenchymal stem cell behavior. **Tissue Engineering Part A**, v.21, n.1-2, p. 382–389, 2015.
- BENETTI, F. *et al.* Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo: Effects of the dental bleaching in pulp. **Archives of Oral Biology**, v.81, p. 103-109, 2017.
- BENETTI, F. *et al.* Biocompatibility, Biomineralization, and Maturation of Collagen by RTR®, Bioglass and DM Bone® Materials. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, n. 5, p. 477-484, Sep/Oct. 2020.
- BENETTI, F. *et al.* Concentration-dependent effect of bleaching agents on the immunolabeling of interleukin-6, interleukin-17, and CD5-positive cells in the dental pulp. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 7, p. 789-799, Jul. 2018.
- BENETTI, F. *et al.* The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. **International Endodontic Journal**, v.52, n. 5, p. 665-675, may. 2019a.
- BENETTI, F. *et al.* In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. **International Endodontic Journal**, v.52, n.12, p. 1723-1737, 2019b.
- BRACKS, I. V. *et al.* Effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerative endodontic therapy. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 10, p. 1457-1465, Oct. 2019.

CAPPELLO, F. *et al.* Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease, **Cancer**, v. 107, n. 10, p. 2417-2424, 2006.

CHAE, Y.; YANG, M.; KIM, J. Release of TGF- β 1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. **International Endodontic Journal**. 2018 v.51, n.12, p.1389-1397, dec, 2018.

CINTRA, L.T.A. *et al.* The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. **International Endodontic Journal**, v.50, n.8, p.790-798, 2017.

DAMLE, S. G. *et al.* Clinical and radiographic assessment of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide as apexification agents in traumatized young permanent anterior teeth: A comparative study. **Dental Research Journal**, v. 13, n. 3, p. 284- 291, 2016.

DE ARAÚJO LOPES, J.M *et al.* Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. **International Endodontic Journal**, v.53, n.11, p.1494-1505, 2020.

DE LAIA, A.G.S. *et al.* Therapeutic cobalt ion incorporated in poly (vinyl alcohol) /bioactive glass scaffolds for tissue engineering. **Materials Science Journal**, v.55, n.20, p. 8710–8727, 2020.

DEMIRCI, G. K. *et al.* Treatment of immature teeth with nonvital pulps in adults: a prospective comparative clinical study comparing MTA with Ca(OH) 2. **International Endodontic Journal**, v. 53, n. 1, p. 5-18, 2020.

DENIZ SUNGUR, D. *et al.* Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 6, p. 838-846, Jun 2019.

DING, R.Y *et al.* Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. **Journal of Endodontics**, v.35, n.5, p. 745-9, May 2009.

DIOGENES, A. *et al.* An update on clinical regenerative endodontics. **Endodontics Topics**, v. 28, n. 1, p. 2-23, 2013.

DIOGENES, A.R. *et al.* Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM. Translational science in disinfection for regenerative endodontics. **Journal of Endodontics**, v.40, n.4, p. 52-7, apr., 2014.

DOS REIS-PRADO, A. H. *et al.* Influence of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on the regenerative endodontic procedure in an immature rat molar model. **International Endodontic Journal**, v. 56, n. 1, p. 69–79, 2023.

- DOS REIS-PRADO, A. H. *et al.* Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 6, p. 579–612, 2022.
- DZIADEK, M. *et al.* A simple way of modulating in vitro angiogenic response using cu and co-doped bioactive glasses. **Materials Letters**, v.215, p. 87–90, 2018.
- GABBAI-ARMELIN, P.R. *et al.* Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.26, p-177-180, 2015.
- GALLER, K. M. *et al.* European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. **International Endodontic Journal**, v. 4, n. 8, p. 717-723, Aug. 2016.
- GOMES-FILHO, J. E. *et al.* Histologic Characterization of Engineered Tissues in the Canal Space of Closed-apex Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 12, p. 1549-1556, Dec. 2013.
- HENCH, L.L. The story of Bioglass. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.17, n. 11, p. 967-978, 2006.
- HENCHE, L.L.; ANDERSSON. Bioactive glasses, Chapter 3, 1969. (An Introduction to Bioceramics Downloaded from www.worldscientific.com).
- HIRATA, M. *et al.* Expression of osteocalcin and Jun D in the early period during reactionary dentin formation after tooth preparation in rat molars. **Cell and Tissue Research**, v. 319, n.3, p. 455-465, 2005.
- KIM, S. G. *et al.* Regenerative endodontics: a comprehensive review. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 12, p. 1367–1388, 2018.
- LAMBRICHTS, I. *et al.* Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. **Journal of Endodontics**, v.43, n.9, p.12-16, 2017.
- LAW, A. S. Considerations for regeneration procedures. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 44-56, 2013.
- LI, Y. *et al.* Effects of sodium hypochlorite and ethylenediaminetetraacetic acid on proliferation, osteogenic/odontogenic differentiation, and mechanosensitive gene expression of human dental pulp stem cells. **Tissue & Cell**, v. 79, p. 101955, 2022.
- MARTIN, D. *et al.* Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 1, p. 51–55, 2014.
- MURRAY, P.E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K.M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 4, p. 377–390, 2007.

- Narang, I.; Mittal, N.; Mishra, N. A comparative evaluation of the blood clot, platelet-rich plasma, and platelet-rich fibrin in regeneration of necrotic immature permanent teeth: A clinical study. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 6, n.1, p.63-68, 2015.
- PALMA, P.J. *et al.* Histologic Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures with the Use of Chitosan Scaffolds in Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1279-1287, Aug. 2017.
- RAGAB, R. A. *et al.* Comparative Study between Revitalization of Necrotic Immature Permanent Anterior Teeth with and without Platelet Rich Fibrin: A Randomized Controlled Trial. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, v. 43, n. 2, p. 78 – 85, 2019.
- RAY, H. L. *et al.* Long-term follow up of revascularization using platelet-rich fibrina. **Dental Traumatology**, v. 32, n. 1, p. 80-84, 2016.
- REIS, B. O. *et al.* Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses. **Journal of Dentistry**, v. 111, p. 103719, 2021.
- RIAZ, A.; SHAH, F. A. Regenerating the Pulp-Dentine Complex Using Autologous Platelet Concentrates: A Critical Appraisal of the Current Histological Evidence. **Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 37 – 48, 2021.
- RIBEIRO, J. S. *et al.* Antimicrobial Therapeutics in Regenerative Endodontics: A Scoping Review. **Journal of Endodontics**, v. 49, n. 9, p. 115-127, 2020.
- SCARPARO, R. K. *et al.* Intracanal delivery of Resolvin E1 controls inflammation in necrotic immature rat teeth. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 5, p. 678-682, May 2014.
- SHETTY, S. *et al.* Coronal pulpotomy technique analysis as an alternative to pulpectomy for preserving the tooth vitality in context to tissue regeneration: a correlated clinical study across 4 permanent molars. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, v. 07, n. 07, p. 5255–5262, 2020.
- SHIMIZU, E. *et al.* Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 8, p. 1078–1083, Aug. 2013.
- SOUZA, M.T *et al.* Broad-Spectrum Bactericidal Activity of a New Bioactive Grafting Material (F18) Against Clinically Important Bacterial Strains, **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 50, n.6, p.730-733, 2017.
- SOUZA, M.T; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D. Vitreos Composition, Bioactive Vitreous Fibres and Fabrics and Articles. 2015. WO 201 502 151 9 A1. Patent.
- TAKAMORI, E. R. *et al.* Fibrina rica em plaquetas: preparo, definição da qualidade, uso clínico. **Vigilância Sanitária em Debate**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 118-124, 2018.

TREVINO, E.G *et al.* Hargreaves KM, Diogenes A. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. **Journal of Endodontics**, v.37, n. 8, p. 1109-15, Aug. 2011.

TROPE, M.; DEBELIAN, G.; SIGURDSSON, A. Traumatismo Dentário. In: LOPES, H.; SIQUEIRA, J. **Endodontia: biologia e técnica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015. Cap. 23. p. 717-720.

ULUSOY, A. T. *et al.* Evaluation of blood clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 5, p. 560 – 566, 2019.

VARELA, H.A. *et al.* Injectable platelet rich fibrin: cell content, morphological, and protein characterization. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n.3, p. 1309-1318, 2019.

WANG, X. *et al.* Effects of an injectable platelet-rich fibrin on osteoblast behavior and bone tissue formation in comparison to platelet-rich plasma. **Platelets**, v. 29, n.1, p. 48-55, 2018.

XIE, Z. *et al.* Functional Dental Pulp Regeneration: Basic Research and Clinical Translation. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n.16, p.1-27, 2021.

YOUSSEF, A. *et al.* Regenerative endodontic procedures for the treatment of necrotic mature teeth: A preliminary randomized clinical trial. **International Endodontic Journal**, 2022, in press.

ZHANG, D. D. *et al.* Histologic comparison between platelet-rich plasma and blood clot in regenerative endodontic treatment: an animal study. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 9, p. 1388-1393, Set. 2014.

ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "INFLUÊNCIA DA FIBRINA RICA EM PLAQUETAS NA REVASCULARIZAÇÃO PULPAR EM MOLARES DE RATOS ", protocolo do CEUA: 238/2022 sob a responsabilidade de Francine Benetti que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, em reunião de 24/10/2022.

Vigência da Autorização	24/10/2022 a 23/10/2027
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Cebio
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Cebio
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Cebio
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	300g / 2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Cebio
Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar

Nº de animais	3
Idade	2(meses)
Sexo	masculino
Origem	Cebio
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	24
Idade	4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Cebio

Considerações posteriores:

24/10/2022	Aprovado na reunião on-line do dia 24/10/2022. Validade: 24/10/2022 à 23/10/2027.
------------	--

Belo Horizonte, 31/07/2023.

Atenciosamente,

Sistema Solicite CEUA UFMG
https://aplicativos.ufmg.br/solicite_ceua/

Universidade Federal de Minas Gerais
Avenida Antônio Carlos, 6627 – Campus Pampulha
Unidade Administrativa II – 2º Andar, Sala 2005
31270-901 – Belo Horizonte, MG – Brasil
Telefone: (31) 3409-4516
www.ufmg.br/bioetica/ceua - cetea@prpq.ufmg.br