

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia**

Barbara Figueiredo Resende

**ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO TECIDUAL E DE MARCADORES DA
INFLAMAÇÃO E DE DENTINOGENESE EM PROCEDIMENTO
ENDODÔNTICO REGENERATIVO COM OU SEM USO DE FIBRINA
RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL EM RATOS
IMUNOSSUPRIMIDOS**

**Belo Horizonte
2025**

Barbara Figueiredo Resende

**ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO TECIDUAL E DE MARCADORES DA
INFLAMAÇÃO E DE DENTINOGÊNESE EM PROCEDIMENTO
ENDODÔNTICO REGENERATIVO COM OU SEM USO DE FIBRINA
RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL EM RATOS
IMUNOSSUPRIMIDOS**

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. Dra. Francine Benetti Faria

Coorientadora: Prof^a. Dra. Tarcília Aparecida da Silva

Belo Horizonte
2025

Ficha Catalográfica

R433a Resende, Barbara Figueiredo.
2025 Análise da neoformação tecidual e de marcadores da
T inflamação e de dentinogênese em procedimento endodôntico
regenerativo com ou sem uso de fibrina rica em plaquetas
injetável em ratos imunossuprimidos / Barbara Figueiredo
Resende. -- 2025.

55 f. : il.

Orientadora: Francine Benetti Faria.
Coorientadora: Tarcília Aparecida da Silva.

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

1. Terapia de imunossupressão. 2. Endodontia
regenerativa. 3. Polpa dentária. I. Faria, Francine Benetti.
II. Silva, Tarcília Aparecida da. III. Universidade Federal
de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

Folha de Aprovação

10/11/2025, 23:44

SEI/UFMG - 4348202 - Folha de Aprovação



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DA NEOFORMAÇÃO TECIDUAL E DE MARCADORES DA INFLAMAÇÃO E DE DENTINOGÊNESE EM PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO COM OU SEM USO DE FIBRINA RICA EM PLAQUETAS INJETÁVEL EM RATOS IMUNOSSUPRIMIDOS

BARBARA FIGUEIREDO RESENDE

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 29 de julho de 2025, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Francine Benetti - Orientadora
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Soraia Macari
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Bruna de Athayde Casadei
São Leopoldo Mandic

Profa. Tarcília Aparecida da Silva
Faculdade de Odontologia da UFMG

Belo Horizonte, 29 de julho de 2025.



Documento assinado eletronicamente por Francine Benetti, Professora do Magistério Superior, em 29/07/2025, às 10:56, 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 Soraia Macari, Professora do Magistério Superior, em 29/07/2025, às 10:56, 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 Bruna de Athayde Casadei, Usuária Externa, em 29/07/2025, às 10:57, 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 Tarcília Aparecida da Silva, Professora do Magistério Superior, em 29/07/2025, às 10:58, 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 4348202 e o código CRC 6BE76EE2.

Referência: Processo nº 23072.219525/2025-95

SEI nº 4348202

Dedico este trabalho aos meus pais, ao meu marido, à minha orientadora e aos meus colegas do grupo de pesquisa, sem os quais o mestrado não teria sido possível. Agradeço por terem viabilizado de forma tão prestativa a realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Conquistar um objetivo é como escalar uma montanha: o caminho é árduo, muitas vezes solitário, repleto de desafios e dúvidas, mas a vista do topo justifica cada esforço. Esta dissertação não representa apenas a conclusão de um trabalho científico, mas também a materialização de uma trajetória de crescimento pessoal, intelectual e emocional.

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me sustentar nos momentos em que faltaram forças e por me conceder sabedoria para seguir adiante mesmo diante das incertezas. Sem a fé que carrego comigo, esta caminhada teria sido ainda mais difícil.

Aos meus pais, meu amor eterno e gratidão imensurável. Obrigada por acreditarem em mim mesmo nos dias em que nem eu mesma acreditava. Por cada palavra de incentivo, por todo o apoio incondicional. Vocês são minha base.

Ao meu marido, meu parceiro de vida, obrigada por estar ao meu lado com paciência, compreensão e amor em cada etapa desta jornada. Seu apoio incondicional, especialmente nos dias difíceis e seu incentivo constante foram essenciais para que eu não desistisse.

Aos meus colegas do Endo Research, que tornaram o percurso mais leve e colaborativo, minha sincera gratidão. Compartilhar esse processo com vocês foi enriquecedor e tornou o ambiente acadêmico mais humano. Agradeço especialmente ao Hebertt, amigo fiel e altruísta, que esteve disponível para oferecer ajuda em todas as etapas do mestrado, e à Lara, que com toda a sua competência e experiência, compartilhou conhecimento e viabilizou etapas da pesquisa que eu não teria conseguido fazer sozinha. Essa conquista só foi possível porque pude contar com vocês.

Aos meus amigos, que mesmo à distância ou em meio à correria da vida, me enviaram palavras de carinho, incentivo e compreensão. Obrigada por respeitarem meu tempo, entenderem meu silêncio e celebrarem comigo cada pequena vitória.

À Professora Francine Benetti, minha orientadora, minha profunda admiração e gratidão. Seu olhar atento, suas críticas construtivas, sua dedicação generosa ao meu trabalho e seu compromisso com a ciência foram fundamentais. Obrigada por acreditar no meu potencial e por guiar meus passos com firmeza e sensibilidade, especialmente quando eu não pude entregar o meu melhor desempenho.

Finalizo com a certeza de que o conhecimento não se limita ao que se escreve em páginas, mas se constrói nas experiências, nos erros, nos reencontros com nós mesmos. Esta dissertação é fruto de amadurecimento, de escolhas e de coragem. Que ela seja apenas uma das muitas pontes rumo ao saber.

“Aprender é a única coisa que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”

Leonardo da Vinci

RESUMO

O procedimento endodôntico regenerativo (REP) busca restabelecer propriedades formativas, imunológicas e defensivas do complexo dentino-pulpar em dentes permanentes imaturos com polpa necrosada. Ocorre por meio da indução de um coágulo sanguíneo no interior do canal radicular, que trará células-tronco da região periapical e fatores de crescimento para a formação de um novo tecido. Contudo, condições sistêmicas como a imunossupressão podem prejudicar este processo de regeneração tecidual. Este estudo analisou a neoformação tecidual, a formação de tecido mineralizado e a imunomarcagem para sialofosfoproteína dentinária (DSPP) e interleucina (IL)-1 β em ratos imunossuprimidos após REP, com ou sem o uso de fibrina rica em plaquetas injetável (iPRF). Vinte e quatro ratos foram divididos entre aqueles sem imunossupressão e imunossuprimidos (ciclofosfamida; 50 mg/Kg). Em seguida, os animais foram divididos em grupos (n=6): REP, REP imunossuprimido (IM-REP), REP com iPRF (REP-iPRF) e REP imunossuprimido com iPRF (IM-REP-iPRF). Após a indução de necrose pulpar, foi realizada antisepsia com hipoclorito de sódio 2,5% e ácido etilenodiaminotetracético 17%, seguida de medicação intracanal (MIC). Após 15 dias, a MIC foi removida e o sangramento intracanal induzido por sobreinstrumentação com lima tipo K #10; nos grupos REP-iPRF e IM-REP-iPRF, a iPRF foi inserida no canal radicular antes da indução de sangramento. Os molares foram selados. Aos 21 dias, os animais foram eutanasiados, e os espécimes obtidos para análises histológicas (hematoxilina-eosina) e imunohistoquímica. Testes estatísticos foram aplicados ($p < 0,05$). O grupo REP apresentou neoformação de tecido conjuntivo dentro dos canais radiculares até os terços médio e cervical; o grupo REP-iPRF, até o terço cervical; e IM-REP e IM-REP-iPRF apresentaram neoformação tecidual apenas até o terço apical do canal radicular, com diferença significativa entre REP e IM-REP ($p < 0,05$). Os espécimes de REP e REP-iPRF apresentaram neoformação de novo tecido mineralizado em comprimento e espessura do canal radicular; a maioria dos espécimes dos grupos IM-REP e IM-REP-iPRF apresentaram neoformação de tecido mineralizado apenas em comprimento ou espessura radicular, ou ausência desta; a diferença significativa foi observada entre os grupos REP-iPRF e IM-REP-iPRF ($p < 0,05$). A maioria dos espécimes dos grupos REP e REP-iPRF apresentou imunomarcagem moderada para DSPP; nos grupos IM-REP e IM-REP-iPRF, quase todos os espécimes também apresentaram imunomarcagem moderada, sem diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Todos os grupos apresentaram baixa imunomarcagem para IL-1 β ($p > 0,05$). Conclui-se que a imunossupressão afetou negativamente a neoformação tecidual dentro dos canais radiculares e a formação de tecido mineralizado em molares imaturos de ratos após REP, mas não influenciou a presença de DSPP ou IL-1 β ; ainda, a iPRF não influenciou os resultados encontrados.

Palavras-chave: imunossupressão; endodontia regenerativa; polpa dentária; procedimento endodôntico regenerativo.

ABSTRACT

Analysis of tissue neoformation and of inflammatory and dentinogenesis markers in regenerative endodontic procedure with or without injectable platelet-rich fibrin in immunosuppressed rats.

The regenerative endodontic procedure (REP) aims to restore the formative, immunological, and defensive properties of the dentin-pulp complex in immature permanent teeth with necrotic pulp. It works by inducing a blood clot within the root canal, which brings stem cells from the periapical region and growth factors to promote the formation of new tissue. However, systemic conditions such as immunosuppression can impair this tissue regeneration process. This study analyzed tissue neoformation, mineralized tissue formation, and immunolabeling for dentin sialophosphoprotein (DSPP) and interleukin (IL)-1 β in immunosuppressed rats after REP, with or without the use of injectable platelet-rich fibrin (iPRF). Twenty-four rats were divided into immunosuppressed and non-immunosuppressed groups (cyclophosphamide; 50 mg/kg). The animals were then allocated into four groups (n=6): REP, immunosuppressed REP (IM-REP), REP with iPRF (REP-iPRF), and immunosuppressed REP with iPRF (IM-REP-iPRF). After pulp necrosis induction, root canals were disinfected using 2.5% sodium hypochlorite and 17% EDTA, followed by intracanal medication (ICM). After 15 days, ICM was removed and intracanal bleeding was induced by overinstrumentation with a #10 K-file; in the REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups, iPRF was inserted into the root canal before bleeding induction. The molars were sealed, and after 21 days, the animals were euthanized and specimens collected for histological (hematoxylin-eosin) and immunohistochemical analyses. Statistical tests were applied ($p < 0.05$). The REP group showed connective tissue neoformation within the root canals extending to the middle and cervical thirds; the REP-iPRF group to the cervical third; and IM-REP and IM-REP-iPRF showed tissue neoformation only in the apical third, with a significant difference between REP and IM-REP ($p < 0.05$). Specimens from REP and REP-iPRF groups showed neoformation of mineralized tissue in both length and thickness of the root canal; most IM-REP and IM-REP-iPRF specimens showed mineralized tissue formation in either length or thickness, or none, with a significant difference between REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups ($p < 0.05$). Most specimens from REP and REP-iPRF showed moderate immunolabeling for DSPP; in IM-REP and IM-REP-iPRF, almost all specimens also showed moderate labeling, with no significant difference among the groups ($p > 0.05$). All groups showed low immunolabeling for IL-1 β ($p > 0.05$). It can be concluded that immunosuppression negatively affected tissue neoformation within the root canals and the formation of mineralized tissue in immature rat molars after REP, but did not influence the presence of DSPP or IL-1 β ; furthermore, the use of iPRF did not affect the outcomes observed.

Keywords: immunosuppression; regenerative endodontics; dental pulp; endodontic regenerative procedure.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais, de acordo com o tratamento realizado.....	18
Tabela 2 - Escores aplicados para cada parâmetro avaliado na análise histopatológica.....	22

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAE	<i>American Association of Endodontists</i>
µm	Micrômetro
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CT	Comprimento de trabalho
DSPP	Sialofosfoproteína Dentinária
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HE	Hematoxilina-eosina
IL-1β	Interleucina-1 beta
NaOCl	Hipoclorito de sódio
PBS CIMMO HP	Cimento reparador biocerâmico
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório
TGF-β	Fator de crescimento transformante-β (do inglês <i>Transforming growth factor-β</i>)

SUMÁRIO

1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
2	OBJETIVOS	17
	2.1 Objetivo geral	17
	2.2 Objetivos específicos	17
3	METODOLOGIA EXPANDIDA	18
	3.1 Estudo experimental em modelo animal	18
	3.1.1 Animais	18
	3.1.2 Drogas empregadas	18
	3.1.3 Divisão dos grupos experimentais	19
	3.1.4 Indução da Imunossupressão	20
	3.1.5 Coleta sanguínea e preparo da i-PRF	20
	3.1.6 Procedimento endodôntico regenerativo (REP)	20
	3.1.7 Eutanásia e processamento laboratorial	21
	3.2 Forma de análise dos resultados	22
	3.2.1 Avaliação histológica	22
	3.2.2 Técnica de imunohistoquímica	24
	3.3 Análise estatística	25
4	ARTIGO	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS	50
	ANEXOS	54

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Doenças autoimunes representam o resultado de um sistema imunológico reativo e em desequilíbrio que libera diferentes mediadores inflamatórios a fim de combater tecidos e células próprios do organismo (Ideo *et al.*, 2022). Artrite reumatoide, lúpus, esclerose, retocolite ulcerativa, doença de Crohn e diferentes tipos de câncer são exemplos de doenças conhecidas que requerem o uso de imunomoduladores para controle e diminuição da sua progressão (Cintra *et al.*, 2016; Cotti *et al.*, 2018). Medicamentos imunossupressores podem interferir na divisão celular, reduzir a expressão de moléculas com ações pró-inflamatórias ou bloquear diretamente a função destas moléculas. Por esse motivo são regularmente administradas em pacientes portadores de doenças autoimunes (Cotti *et al.*, 2018; Peddis *et al.*, 2019).

A imunossupressão é uma disfunção do sistema imune, que pode ser desencadeada através de uma diversidade de agentes biológicos (vírus, bactérias, fungos, parasitas), fatores químicos (contaminação da água e de alimentos por animais, antibióticos, metais pesados, desinfetantes) e fatores físicos (estresse, temperatura abaixo do ideal, concentrações excessivas de poeira e gases nocivos). Entretanto, a exposição prolongada a estes fatores adversos, pode levar à deterioração da saúde, à reduzidos ganhos de peso corporal, à menor eficácia da vacinação preventiva, maior susceptibilidade ao câncer, doenças infecciosas e parasitárias, e conseqüentemente, ao aumento da mortalidade que contribui de maneira direta para perdas econômicas (Hoerr, 2010; Cameron *et al.*, 2019; Devaud *et al.*, 2013; La Hoz *et al.*, 2013; SUNDAR *et al.*, 2013). Para neutralizar efetivamente os efeitos adversos, os pesquisadores estão à procura de substâncias que aumentem a resposta imune do corpo. Essas substâncias são conhecidas como imunostimulantes e podem acelerar, aumentar ou prolongar a resposta imune, dependendo do estado imunitário do hospedeiro, a via de administração e a dose aplicada (Blecha, 2001; Nelson *et al.*, 2003; Foster, 2004; Thacker, 2010; Whitley *et al.*, 2011).

Os imunossupressores são amplamente utilizados, estudados, e possuem exemplares em diferentes classes de medicamentos (Lin *et al.*, 2017). A ciclofosfamida (CPD) é um medicamento imunossupressor, utilizado no tratamento

de doenças neoplásicas (Lovelace *et al.*, 2011), que atua induzindo a apoptose celular e reduzindo a proliferação homeostática de células T reguladoras, e têm demonstrado melhorias significativas no tratamento de doenças autoimunes (Bressan *et al.*, 2010). No entanto, na odontologia, o efeito de medicações imunossupressoras que visam tratar alterações sistêmicas e bloquear a função das células inflamatórias ainda não está bem estabelecido (Peddis *et al.*, 2019). O conhecimento de condições patológicas orais associadas ao uso desses fármacos e os impactos do uso dos imunossupressores nas lesões perirradiculares inflamatórias de origem endodôntica ainda são incertos e precisam ser investigados.

A resposta imunológica do paciente está diretamente relacionada ao desenvolvimento, reparo, gravidade e controle das infecções bucais, e é ressaltada a relação entre processos bucais infecciosos e doenças envolvendo diversos órgãos e sistemas (Cintra *et al.*, 2018). Ainda, a situação pró-inflamatória e resposta imune também são afetadas quando associadas às doenças autoimunes, que podem influenciar negativamente o reparo/regeneração dos tecidos bucais (Guerrero-Gironés *et al.*, 2021).

O uso de drogas imunossupressoras em populações pediátricas tem aumentado significativamente nas últimas décadas, em razão da maior incidência de doenças autoimunes, transplantes de órgãos e condições inflamatórias crônicas. Estimativas recentes apontam que aproximadamente 3 a 5% das crianças em todo o mundo encontram-se em uso prolongado de imunossupressores (Diogenes *et al.*, 2017), com variações regionais de acordo com o acesso ao cuidado especializado e o perfil epidemiológico (Fundo das Nações Unidas para a Infância – UNICEF, Organização Mundial da Saúde – OMS, Instituto Nacional de Câncer – INCA). Na América do Norte, por exemplo, mais de 80% dos gastroenterologistas pediátricos relatam prescrever azatioprina ou 6-mercaptopurina para doenças inflamatórias intestinais, enquanto na nefrologia pediátrica, inibidores de calcineurina, como ciclosporina e tacrolimo, são amplamente utilizados para a síndrome nefrótica resistente a esteroides (Li *et al.*, 2017).

No contexto de transplante de órgãos, cerca de 2.000 crianças por ano, somente nos Estados Unidos, são submetidas a procedimentos que exigem terapia imunossupressora contínua e vitalícia (Dharnidharka *et al.*, 2022). Tendências semelhantes são relatadas em diferentes regiões do mundo, reforçando que a

imunossupressão na infância não é uma condição rara ou isolada, mas um desafio crescente de saúde global.

Embora essas terapias tenham melhorado substancialmente a sobrevida e a qualidade de vida, seus efeitos sobre a reparação tecidual, as respostas inflamatórias e a regeneração do complexo dentina-polpa permanecem pouco compreendidos. Na odontologia, em especial nos procedimentos endodônticos regenerativos (REP), o equilíbrio entre inflamação, dentinogênese e reparo tecidual é determinante para o sucesso clínico (Diogenes *et al.*, 2017; Gomes-Filho *et al.*, 2013). Entretanto, a imunossupressão pode alterar os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na cicatrização periapical e na deposição de matriz dentinária. Com relação à lesão periapical (LP) de origem endodôntica, ainda não é esclarecida a influência da imunossupressão e seu tratamento na progressão ou reparo destas. A periodontite apical é uma doença inflamatória crônica dos tecidos perirradiculares associada à infecção presente nos canais radiculares, resultando na formação da LP (Kim *et al.*, 2012). Mediadores pró-inflamatórios regulam o desenvolvimento desta, e mediadores anti-inflamatórios estão presentes no momento de reparo, após tratamento da infecção dos canais radiculares (Cotti *et al.*, 2021).

A doença inflamatória de origem endodôntica é influenciada pela resposta imune do hospedeiro, apesar de haver controvérsias em relação ao tratamento das doenças autoimunes com imunossupressores, e o desenvolvimento da LP (Piras *et al.*, 2017). Estudos mostram que pacientes que tomam imunossupressores podem apresentar processo de reparo acelerado das LP, sugerindo ativação da cascata pró-inflamatória associada à terapia imunomoduladora (Cotti *et al.*, 2021). Contudo, outros estudos mostram que pacientes com doenças autoimunes e uso de imunossupressores apresentam maior prevalência de LP, e com diâmetros maiores (Poyato-Borrego *et al.*, 2015, Piras *et al.*, 2017), ou maior prevalência de LP, mas com diâmetros menores (Ideo *et al.*, 2022). Foi sugerido que a modulação imunológica pelo uso dos imunossupressores pode reduzir o processo reabsortivo ósseo da LP (Peddis *et al.*, 2019, Rotstein 2021), porém, como estes pacientes estão predispostos à hiper-reatividade imunológica, podem mostrar maior prevalência destas ou agudização dos processos crônicos pré-existentes.

A influência da imunossupressão sobre o tecido pulpar também foi pouco investigada. Estudos mostram que calcificações pulpares são mais frequentes em

pacientes transplantados de rim ou com uso de imunossupressores (Graham *et al.*, 2006). Também foi observado que o uso crônico de glicocorticoides pode acelerar o processo de necrose pulpar (Cintra *et al.*, 2018).

Ainda, pacientes pediátricos sob o uso de drogas imunossupressoras requerem tratamento odontológico adicional, pois podem ter o risco de infecção dentária subsequente (Donker *et al.*, 2002). No entanto, pacientes jovens com dentes imaturos têm a rizogênese interrompida com a necrose pulpar, e o tratamento endodôntico convencional é desafiador, visto que possíveis fraturas radiculares e/ou extravasamento do material obturador podem ocorrer, devido às finas paredes radiculares e ausência de constrição apical (Ding *et al.*, 2009). Assim, os procedimentos endodônticos regenerativos são essenciais.

REP emprega os princípios da engenharia tecidual, projetados para substituir estruturas danificadas do complexo dentino-pulpar (Diogenes; Simon; Law, 2017; Gomes-Filho *et al.*, 2013a). Este tratamento permite a restauração dos tecidos pulpares e periapicais, através da migração de células-tronco mesenquimais indiferenciadas da região da papila apical para o interior do canal radicular (Albuquerque *et al.*, 2014; Garcia-Godoy; Murray, 2012), promovendo a continuidade do desenvolvimento radicular (Law, 2013; Shah *et al.*, 2008) e o restabelecimento da imunocompetência e nocicepção tecidual (Law, 2013).

O coágulo sanguíneo intracanal induzido funciona como uma matriz (*scaffold*) ou rede vascular para apoiar essas células (Galler *et al.*, 2016). Além disso, fatores de crescimento e outras proteínas liberados da matriz dentinária ou presentes no coágulo, como os fatores de crescimento transformante (TGF)- β , endotelial vascular (VEGF), a proteína morfogênica óssea (BMP) e a sialofosfoproteína da dentina (DSPP), se ligam a receptores celulares, induzindo a angiogênese, a proliferação e/ou diferenciação celular (Murray; Garcia-Godoy; Hargreaves, 2007).

A fibrina rica em plaquetas (PRF), um biomaterial autólogo derivado do sangue, demonstrou um potencial significativo no contexto dos REP, pois atua como um arcabouço biologicamente ativo que não apenas fornece suporte estrutural, mas também favorece a cicatrização por meio da liberação sustentada de fatores de crescimento e da facilitação da migração e proliferação celular (Terayama *et al.*, 2020; Youssef *et al.*, 2022). A PRF injetável (iPRF), introduzida em 2014 por meio de modificações nos protocolos de centrifugação e do uso de tubos sem aditivos, apresenta-se como uma matriz de fibrina dinâmica, enriquecida com plaquetas,

leucócitos, colágeno, osteocalcina e diversos fatores de crescimento (Scaparo et al., 2014; Wang et al., 2018). A iPRF demonstrou desempenho superior à PRF convencional na promoção da regeneração óssea e no controle de infecções endodônticas (Scaparo et al., 2014; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2020), além de oferecer vantagens práticas em termos de aplicação no sistema de canais radiculares. Apesar de suas propriedades promissoras, a iPRF ainda é relativamente pouco explorada em REP em comparação ao corpo mais amplo de pesquisas disponíveis sobre a PRF convencional.

Apesar da capacidade de cicatrização do organismo, condições sistêmicas podem comprometer esse processo. Milhões de indivíduos sofrem com a cicatrização prejudicada de feridas, geralmente associada a uma resposta de reparo ineficaz caracterizada por inflamação crônica, angiogênese alterada e recrutamento celular deficiente (Alexander et al., 2020). Essas disfunções estão frequentemente relacionadas a doenças pré-existentes ou a estados clínicos alterados, como a imunossupressão (Andreasen et al., 2015).

Dessa forma, este estudo avaliou a influência do uso de imunossupressores no processo de reparo após REP, por meio da Ciclofosfamida, uma vez que este medicamento pode afetar a resposta imune do paciente e, conseqüentemente, os resultados do REP com ou sem o uso de iPRF. A hipótese nula foi de que a imunossupressão não exerce influência nesse processo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Analisar a influência da imunossupressão no processo de reparo após procedimento endodôntico regenerativo (REP) com ou sem fibrina rica em plaquetas injetável (iPRF) em molares imaturos de ratos.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar, através de análises histológica e imunohistoquímica, a influência da imunossupressão nos seguintes parâmetros do processo de reparo após REP:

- a) Formação tecidual no interior dos canais radiculares;
- b) Neoformação de tecido mineralizado nas paredes dos canais radiculares;
- c) Avaliar a presença de marcadores da dentinogênese e da inflamação, por meio da imunomarcação de DSSP e IL-1 β , respectivamente.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1 Estudo experimental em modelo animal

3.1.1 Animais

Foram utilizados 24 ratos machos (*Rattus albinus*, *Wistar*), pesando aproximadamente 80 g, com idade média de 4 semanas e provenientes do Biotério Central da UFMG (Belo Horizonte, MG, Brasil). O cálculo amostral foi baseado em estudo anterior (Scarparo *et al.*, 2014). O cálculo foi realizado com base nos dados de inflamação periapical dos grupos experimentais após REP em molares de ratos, utilizando o software Statistical Package for SigmaPlot (versão 12.0; Systat Software Inc.) e o cálculo de tamanho amostral para teste t. Considerando um poder de 95% e um nível de erro do tipo alfa de 0,05, o tamanho amostral foi de cinco molares por grupo experimental. No entanto, considerando o potencial de mortalidade dos animais, foi adicionado um animal a mais em cada grupo, resultando em seis ratos por grupo.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura entre 22°C e 24°C e com ciclo de luz controlado (12 horas claro e 12 horas escuro) e em gaiolas coletivas (quatro ratos por gaiola). Cada comedouro e bebedouro foi cheio com ração e água filtrada *ad libitum*, respectivamente. Higienizações periódicas das gaiolas foram realizadas, com troca e limpeza dos comedouros e bebedouros.

Os procedimentos experimentais respeitaram os princípios éticos adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e o projeto de pesquisa foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG – protocolo CEUA n° 262/2024 (ANEXO A).

3.1.2 Drogas empregadas

Para anestesia, os animais receberam via injeção intramuscular, um anestésico à base de cloridrato de Cetamina 10% (80 mg/Kg; Dopalen, Vetbrands – Divisão de Saúde Animal, Jacareí, SP, Brasil) e um sedativo à base de cloridrato de Xilazina 2% (15 mg/Kg; Anasedan, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil).

3.1.3 Divisão dos grupos experimentais

Tabela 1 - Distribuição dos grupos experimentais, de acordo com o tratamento realizado

Grupos	Imunossupressão	REP
REP (Procedimento endodôntico regenerativo)	-----	Indução do sangramento intracanal e selamento da cavidade
REP-iPRF (REP com fibrina rica em plaquetas injetável)	-----	Inserção da iPRF, seguida de indução do sangramento intracanal e selamento da cavidade
IM-REP (Procedimento endodôntico regenerativo com imunossupressão)	X	Indução do sangramento intracanal e selamento da cavidade
IM-REP-iPRF (REP imunossuprimidos com fibrina rica em plaquetas injetável)	X	Inserção da iPRF, seguida de indução do sangramento intracanal e selamento da cavidade

Elaborada por Barbara Figueiredo Resende, 2025

Os ratos foram separados, aleatoriamente, em 4 grupos, com 6 animais cada, de acordo com os procedimentos realizados, e podem ser visualizados na Tabela 1. As intervenções foram realizadas nos primeiros molares imaturos superiores dos lados esquerdo ou direito de cada animal, após distribuição prévia dos tratamentos.

3.1.4 Indução da Imunossupressão

Os animais foram inicialmente divididos aleatoriamente em grupos imunossuprimidos (IM) e não imunossuprimidos. A imunossupressão foi induzida três dias antes do início do protocolo de REP, com ciclofosfamida (CPD), conforme descrito em protocolos anteriores (JUNG *et al.*, 2019; HUYAN *et al.*, 2011): os animais receberam uma dose de 50 mg/kg de CPD por via intraperitoneal (DONKER *et al.*, 2022), ou solução salina no grupo não imunossuprimido.

3.1.5 Coleta sanguínea e preparo da i-PRF

Seis ratos Wistar machos, com 2 meses de idade (aproximadamente 300 g), sendo que 3 destes receberam a indução da imunossupressão, foram utilizados para a coleta de sangue e preparo da iPRF. 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 iPRF produzida foi coletada com uma seringa descartável e imediatamente inserida nos canais radiculares.

3.1.6 Procedimento endodôntico regenerativo (REP)

Os animais foram anestesiados com cetamina a 10% (80 mg/Kg) e xilazina a 2% (15 mg/Kg). Foram utilizados os primeiros molares superiores imaturos, esquerdo ou direito, dos animais, e todos os procedimentos foram realizados com materiais esterilizados e sob microscópio operatório (40×; Alliance, São Paulo, SP, Brasil) (Reis-Prado *et al.*, 2023). O acesso endodôntico foi cuidadosamente realizado com uma broca esférica estéril de

pescoço longo (LN) com diâmetro de 0,06 mm, utilizada nos canais radiculares mesiais dos primeiros molares superiores (Dentsply Maillefer, Tulsa, OK, EUA), em baixa rotação, acoplada a um motor elétrico (Beltec, Araraquara, SP, Brasil) e sob irrigação constante com solução salina. Os dentes foram deixados abertos por três semanas para indução de necrose.

Após 3 semanas, os dentes foram isolados com grampo dentário especial e selados com barreira gengival (Top dam, FGM, Joinville, SC, Brasil). Em seguida, o canal foi desinfetado com hipoclorito de sódio (NaOCl) a 2,5%, seguido da remoção da polpa necrótica com limas tipo K #10, com comprimento de trabalho de 4 mm (REIS-PRADO et al., 2022). Em seguida, o canal mesial foi cuidadosamente irrigado com NaOCl 2,5%, sendo 0,01 mL/min por 5 minutos, seguido por irrigação com EDTA a 17%, também por 5 minutos (0,01 mL/min). Posteriormente, os canais foram irrigados com solução salina e secos com cones de papel absorvente estéreis. Em seguida, os canais foram medicados com medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio (UltraCal; Ultradent, São Paulo, SP, Brasil), e as cavidades seladas com cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável.

Após 15 dias, foi realizado o REP. Para tanto, após a reabertura, o canal foi cuidadosamente irrigado com EDTA a 17% por 5 minutos (0,01 mL/min). Posteriormente, os canais foram secos com cones de papel absorvente estéreis. Em seguida, o protocolo de REP foi realizado de acordo com os grupos experimentais (DE PAULA et al., 2024; REIS-PRADO et al., 2023): nos grupos REP e REP imunossuprimido (IM-REP), o sangramento intracanal (SI) foi induzido introduzindo-se uma lima tipo K #10 a 0,5 mm além do forame apical, utilizando movimentos de vai-e-vem em sentido anti-horário, até que o canal radicular estivesse preenchido com sangue dos tecidos periapicais; nos grupos REP-iPRF e IM-REP-iPRF, a iPRF foi inserida seguida da indução do SI. Em seguida, os molares foram selados com o material reparador PBS CIMMO HP (CIMMO, Pouso Alegre, MG, Brasil), e cimento de ionômero de vidro fotopolimerizável modificado por resina.

3.1.7 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 45 dias. 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.

3.2 Forma de análise dos resultados

3.2.1 Avaliação histológica

Para a análise histológica, três cortes seriados de cada raiz foram selecionados e examinados em microscópio óptico (DM 4000 B, Leica®, Germany), por um observador calibrado e cego quanto aos grupos experimentais.

As secções coradas em H&E foram usadas para a análise histopatológica, onde os tecidos intracanal e periapical de cada grupo foram analisados em escores de acordo com parâmetros envolvendo a formação de tecido mineralizado nas paredes dos canais radiculares e presença de tecido neoformado no interior dos canais radiculares (DOS REIS-PRADO et al., 2023). Estes parâmetros avaliados foram descritos na Tabela 2.

Tabela 2 - Escores aplicados para cada parâmetro avaliado na análise histopatológica

Parâmetros avaliados na análise histopatológica

Formação de tecido mineralizado nas paredes dos canais radiculares

0 = Ausente

1 = Presente, com aumento do comprimento ou espessura radicular

2 = Presente, com aumento da espessura e do comprimento radicular

Presença de tecido neoformado no interior dos canais radiculares

0 = Ausente

1 = Presente, no terço apical

2 = Presente, estendendo para o terço médio

3 = Presente, estendendo para o terço cervical

3.2.2 Técnica de imunohistoquímica

As avaliações imuno-histoquímicas foram realizadas por meio de uma técnica de imunoperoxidase indireta (DE PAULA *et al.*, 2024) para interleucina (IL)-1 β e sialofosfoproteína dentinária (DSPP). Os cortes histológicos foram desparafinizados e hidratados. A recuperação do antígeno foi realizada imergindo as lâminas histológicas em solução tampão citrato (pH 6,0, Antigen Retrieval Buffer, Spring Bioscience Corporation, Pleasanton, CA, EUA) em uma câmara pressurizada (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) a 95° C (10 min). As lâminas foram enxaguadas com solução salina tamponada com fosfato ao final de cada estágio da reação imuno-histoquímica. Os cortes histológicos foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (1h20 min) e em albumina de soro bovino a 1% (12-h) para bloquear a atividade da peroxidase endógena e locais inespecíficos, respectivamente. As lâminas histológicas foram divididas e incubadas com um dos seguintes anticorpos primários: anti-IL-1 β e anti-DSPP (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), que foram diluídos (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako Laboratories, Carpinteria, CA, EUA) e colocados em câmara úmida (24 h). Em seguida, os cortes histológicos foram incubados com um anticorpo secundário biotilado e com conjugado estreptavidina-peroxidase de rábano (1h30 min cada) (kit Universal Dako Labeled Streptavidin-Biotin kit, Dako Laboratories, CA, EUA). A reação foi então desenvolvida usando o tetracloridrato de cromogênio 3,3'-diaminobenzidina (kit DAB Chromogen, Dako Laboratories) e contracorada com hematoxilina de Harris. Os controles negativos foram submetidos aos procedimentos, mas sem os anticorpos primários.

A imunomarcção foi avaliada no tecido interno do canal radicular (aumento de 400 \times). A imunomarcção foi definida como a presença de uma coloração acastanhada no citoplasma das células e na matriz extracelular. Como a imunomarcção tanto das células quanto da matriz extracelular é de grande importância para este estudo, foi realizada uma análise semiquantitativa, que fornece informações sobre o número de células imunomarcadas e a intensidade da imunomarcção da matriz extracelular.

Os escores foram atribuídos da seguinte forma (BENETTI et al., 2019; DE PAULA et al., 2024): 1 = ausência de imunomarcção (ausência de marcação na matriz extracelular e ausência completa de células imunorreativas); 2 = baixo padrão de imunomarcção (marcação fraca da matriz extracelular e aproximadamente um quarto das células imunorreativas); 3 = padrão moderado de imunomarcção (marcação moderada da matriz extracelular e aproximadamente metade das células imunorreativas); 4 = forte padrão de imunomarcção (forte marcação da matriz extracelular e aproximadamente três quartos das células imunorreativas); 5 = padrão muito forte de imunomarcção (marcação extremamente forte da matriz extracelular e aproximadamente todas as células imunorreativas).

3.3 Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ou teste estatístico de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

4 ARTIGO

O artigo "***Analysis of tissue neoformation and of inflammatory and dentinogenesis markers in regenerative endodontic procedure with or without injectable platelet-rich fibrin in immunosuppressed rats***" foi submetido ao periódico *The Journal of Immunology* (Fator de Impacto = 3.4).

Analysis of tissue neoformation and of inflammatory and dentinogenesis markers in regenerative endodontic procedure with or without injectable platelet-rich fibrin in immunosuppressed rats

Abstract

This study analyzed the tissue neoformation, dentin sialophosphoprotein (DSPP) and interleukin (IL)-1 β immunolabeling, in immunosuppressed rats after regenerative endodontic procedure (REP) with or without injectable platelet-rich fibrin (iPRF). Twenty-four rats were divided between without immunosuppression and immunosuppressed (Cyclophosphamide), and after, into groups: REP, immunosuppressed REP (IM-REP), REP-iPRF and IM-REP-iPRF. After induction of pulp necrosis, antisepsis in root canal was performed, followed by intracanal medication. After 15 days, intracanal bleeding was induced; in REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups, iPRF was inserted inside the root canal before intracanal bleeding. After 21 days, the animals were euthanized and the specimens were obtained for analyses, followed by statistical tests ($P < 0.05$). The REP group showed neoformation of connective tissue in root canals up to middle and cervical thirds, REP-iPRF up to cervical third, and IM-REP and IM-REP-iPRF up to apical third of root canal, with difference between REP and IM-REP groups ($P < 0.05$). The specimens of the REP and REP-iPRF showed new mineralized tissue in length and thickness of the root canal, while IM-REP and IM-REP-iPRF, only in root length or thickness, or absence thereof; the significant difference was observed between REP-iPRF and IM-REP-iPRF ($P < 0.05$). These most specimens in the REP and REP-iPRF had moderate DSPP immunolabeling; in IM-REP and IM-REP-iPRF, almost all specimens had moderate immunolabeling ($P > 0.05$). All groups had low IL-1 β immunolabeling ($P > 0.05$). It is concluded that immunosuppression negatively affected tissue neoformation in rat molars after REP, but not influenced the presence of DSPP or IL-1 β ; in addition, iPRF not influenced the results.

Keywords Regenerative endodontic procedure platelet rich fibrin; DSPP; immunosuppression; interleukin.

Introduction

Immunosuppressive medications can interfere with cell division, reduce the expression of molecules with pro-inflammatory actions or directly block the function of these molecules. For this reason, they are regularly administered to patients with autoimmune diseases (Cotti et al. 2018, Peddis et al. 2019). The effect of these medications that aim to cause systemic changes and block the function of inflammatory cells is not yet well established in oral health.

Studies in animal models have shown that the use of immunosuppressive drugs that aim to block the function of target inflammatory cells has determined its function in the pathogenesis of periapical lesions (Cotti et al., 2018, Yamaski et al, 1994). Cyclophosphamide (CPD) is an immunosuppressive drug used in the treatment of neoplastic diseases (Zhang et al., 2020), which acts by inducing cell apoptosis and reducing the homeostatic proliferation of regulatory T cells and has demonstrated significant improvements in the treatment of autoimmune diseases (Cameron et al., 2019). However, in dentistry, there is little data on the impact of this drug on pulp and periapical tissues.

The regenerative endodontic procedure (REP) employs the principles of tissue engineering, designed to replace damaged structures of the dentin-pulp complex (Diogenes et al., 2017; Kharchi et al., 2020). This treatment allows the restoration intracanal and periapical tissues, through the migration of undifferentiated mesenchymal stem cells from the apical papilla region to the interior of the root canal (Albuquerque et al., 2014; Chang et al., 2022; Galler et al., 2011), promoting the continuity of root development (Law, 2013; Torabinejad et al., 2017) and the reestablishment of immunocompetence and tissue nociception (Law, 2013). The induced intracanal blood clot functions as a matrix (scaffold) or vascular network to support these cells (DeLuca et al., 2021). In addition, growth factors and other proteins released from the dentin matrix or present in the clot (Jung et al., 2019), such as transforming growth factor (TGF)- β , vascular endothelial growth factor (VEGF), bone morphogenic protein (BMP) and dentin sialophosphoprotein (DSPP), bind to cellular receptors, inducing angiogenesis, cell proliferation and/or differentiation (Murray et al., 2007).

Platelet-rich fibrin (PRF), an autologous biomaterial derived from blood, has demonstrated significant potential in the context of REPs, since it serves as a

biologically active scaffold that not only provides structural support but also enhances healing through the sustained release of growth factors and by facilitating cell migration and proliferation (Terayama et al., 2020; Youssef et al., 2022). Injectable PRF (i-PRF), introduced in 2014 through modifications in centrifugation protocols and the use of additive-free tubes, presents as a dynamic fibrin matrix enriched with platelets, leukocytes, collagen, osteocalcin, and various growth factors (Scarparo et al., 2014; Wang et al., 2018). The iPRF has been shown to outperform conventional PRF in promoting bone regeneration and controlling endodontic infections (Scarparo et al., 2014; Wang et al., 2018; Zhang et al., 2020), while also offering practical advantages in terms of application within the root canal system. Despite its promising properties, i-PRF remains relatively underexplored in REPs when compared to the broader body of research available on conventional PRF.

Despite the body's healing capacity, systemic conditions may impair this process. Millions of individuals suffer from impaired wound healing, typically linked to an inefficient repair response marked by chronic inflammation, altered angiogenesis, and defective cell recruitment (Alexander et al., 2020). Such dysfunctions are often related to preexisting diseases or altered clinical states, including immunosuppression (Andreasen et al., 2015).

Therefore, this study evaluated the influence of the use of immunosuppressants on oral diseases, since these medications can affect the patient's immune response and consequently the results of REP with or without iPRF. The null hypothesis was that immunosuppression has no influence on this process.

Material and Methods

Animals

Twenty-four male Wistar rats (*Rattus albinus*), approximately 80 g (4 weeks old), were used. The sample size was based on data of previous study (Scarparo et al., 2014). The calculation was performed with data of periapical inflammation of the experimental groups after REP in rat molar, using Statistical Package for SigmaPlot (version 12.0; Systat Software Inc.) software program and t-test sample size. Considering 95% power and alpha-type error level of 0.05, the sample size was of five molars per experimental group, but according to the potential of animal mortality,

one more animal was added in each group, resulting in six rats per group, similar to previous studies (Scarparo et al., 2014; Reis-Prado et al., 2023; de Paula et al., 2024). The animals were housed in a temperature-controlled environment (22°C–24°C) with a 12-h light-dark cycle and *ad libitum* access to water and food. The study was approved by the local Animal Research Ethics Committee (CEUA 262/2024) and conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).

Induction of immunosuppression

Animals were initially randomly divided into immunosuppressed (IM) and non – immunosuppressed groups. Immunosuppression was induced three days before the start of the REP protocol, with cyclophosphamide (CPD), as described in previous protocols (Manente et al., 2017; Huyan et al., 2011): the animals received a dose of 50 mg/kg of CPD intraperitoneally (de Laia et al., 2020), or saline solution in non-immunosuppressed group.

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

An additional 6 animals were used for intracardiac blood collection (1 donor for every 3 treated animals). Half of them were immunosuppressed, and the other half were not. Blood was placed into additive-free tubes and centrifuged at 1200 rpm for 8 minutes (CENTRIFUGA 4000 RPM 220v - LGI SCIENTIFIC - LGI-DLC802B – Laborglas – São Paulo/SP).

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 all procedures were performed with sterilized materials and under an operating microscope (40×; Alliance, São Paulo, SP, Brazil) (Reis-Prado et al., 2023). Endodontic access was carefully performed with a sterile long neck (LN) round bur with a diameter of 0.06 mm used in the mesial root canals of upper first molars (Dentisply Maillefer, Tulsa, OK, USA), in low speed, coupled to an electric motor (Beltec, Araraquara, SP, Brazil) and under constant irrigation with saline solution. Teeth were left open for three weeks to induce necrosis.

After 3 weeks, teeth were isolated with special dental clamp and sealed with gingival barrier (Top dam, FGM, Joinville, SC, Brazil). Then, the canal was disinfected with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), followed by necrotic pulp removal with size 10 K-files in one working length of 4 mm (Reis-Prado et al., 2022). Then, mesial canal was carefully and gently irrigated with 0.01 mL/min of 2.5% NaOCl during 5 min, followed by 17% EDTA, also for 5 min (0.01 mL/min). Subsequently, the canals were irrigated with saline solution and dried with sterile absorbent paper points. Then, the canals were medicated with calcium hydroxide intracanal medication (UltraCal; Ultradent, São Paula, SP, Brazil), and cavities sealed with light-cured glass ionomer cement.

After 15 days, REP was performed. After exposing, the canal was carefully irrigated with 17% EDTA for 5 min (0.01 mL/min). Subsequently, the canals were dried with sterile absorbent paper points. Then, the REP protocol was performed according to the experimental groups (de Paula et al., 2024; Reis-Prado et al., 2023): REP and immunosuppressed REP (IM-REP) groups – 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; REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups – iPRF 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.

Euthanasia and laboratory processing

After 21 days, animals were euthanized with an overdose of anesthetic solution. 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 µm) 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), and for immunohistochemical analysis (Benetti et al., 2017; 2019; Reis-Prado et al., 2023).

The analyses were performed under light microscopy (400× 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 and newly intracanal connective tissue (de Paula et al., 2024; Reis-Prado et al., 2023). These rated parameters were described in Table 1.

Immunohistochemical analyses

The immunohistochemical assessments was performed using an indirect immunoperoxidase technique (de Paula et al., 2024) for interleukin (IL)-1 β and dentin sialophosphoprotein (DSPP). 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-IL-1 β and anti-DSPP (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 Harris hematoxylin. The negative controls were submitted to the procedures but without the primary antibodies.

Immunolabeling was evaluated in the tissue inside root canal (400 \times magnification). The immunolabeling 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 this 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 follows (Benetti et al., 2019; de Paula et al., 2024): 1 = immunolabeling missing (absence of labeling in extracellular matrix and

complete absence of immunoreactive cells); 2 = low pattern of immunolabeling (weak labeling of the extracellular matrix and approximately one quarter of the immunoreactive cells); 3 = moderate pattern of immunolabeling (moderate labeling of the extracellular matrix and approximately one half of the immunoreactive cells); 4 = strong pattern of immunolabeling (strong labeling of the extracellular matrix and approximately three quarters of the immunoreactive cells); 5 = very strong pattern of immunolabeling (extremely strong labeling of the extracellular matrix and approximately all immunoreactive cells).

Statistical analysis

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

Results

Presence of newly connective tissue on the root canal

Representative images and data of the histological analysis and data can be seen in Figure 1 and Table 1.

The specimens of the REP group showed neoformation of connective tissue inside the root canals up to the middle and cervical thirds, while most of the specimens of the REP-iPRF group showed connective tissue formation up to the cervical third. However, there was no significant difference between them ($P > 0.05$). However, most specimens of the IM-REP and IM-REP-iPRF groups showed neoformation of connective tissue inside the root canals up to the apical third; there was also no significant difference between the IM-REP and IM-REP-iPRF groups ($P > 0.05$). However, a significant difference was observed between the REP and IM-REP groups ($P < 0.05$). There was also a significant difference when comparing the REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups ($P < 0.05$).

Mineralized tissue formed on the root canal wall

Regarding the mineralized tissue formed on the root canal wall, the specimens of the REP group showed growth of new mineralized tissue in length or thickness of the root canal, or in both length and thickness. Most of the specimens in the REP-iPRF group showed growth in both root canal length and root thickness. However,

there was no significant difference between those two groups ($P > 0.05$). Most specimens from the IM-REP and IM-REP-iPRF groups showed cementum neoformation only in root length or thickness, or absence thereof, respectively, also with no difference between the groups ($P > 0.05$). In addition, no significant difference was observed between the REP and IM-REP groups ($P > 0.05$), but this was observed between REP-iPRF and IM-REP-iPRF ($P < 0.05$).

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
	REP	REP-iPRF	IM-REP	IM-REP-iPRF	
Presence of newly connective tissue on the root canal					
0 = absent	0/6	0/6	0/6	1/6	REP×REP-iPRF = 0.699
1 = within the apical third	0/6	0/6	4/6	3/6	REP×IM-REP = 0.015*
2 = extending to the medium third	3/6	2/6	2/6	2/6	IM-REP×IM-REP-iPRF = 0.818
3 = extending to the cervical third	3/6	4/6	0/6	0/6	REP-iPRF×IM-REP-iPRF = 0.009*
Median	2,5 ^{ab}	3 ^a	1 ^{ab}	1 ^b	
P-value					= 0.007 [≠]
Mineralized tissue formed on the root canal wall					
0 = absent	0/6	0/6	2/6	3/6	REP×REP-iPRF = 0.394
1 = increase only in length or only in thickness	3/6	1/6	4/6	2/6	REP×IM-REP = 0.065
2 = increase in length and thickness	3/6	5/6	0/6	1/6	IM-REP×IM-REP-iPRF = 0.937
Median	1,5	2	1	0	REP-iPRF×IM-REP-iPRF = 0.026*
P-value					= 0.011 [≠]

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

The symbol * indicates presence of significant difference between the REP and IM-REP or REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups; and between REP and REP-iPRF or IM-REP and IM-REP-iPRF ($P < 0.05$). The data were analyzed using the Mann-Whitney test.

iPRF: injectable platelet rich fibrin; IM-REP: immunosuppressed regenerative endodontic procedure; REP: regenerative endodontic procedure.

IL-1 β and DSPP immunolabeling

Representative images of the IL-1 β and DSPP can be seen in Figure 1, whereas the analysis for each marker is displayed in Table 2.

Regarding DSPP immunolabeling, most specimens in the REP group had a moderate pattern of immunolabeling, as did specimens in the REP-iPRF group. There was no significant difference between them ($P > 0.05$). Regarding the IM-REP group, almost all specimens presented a moderate pattern of immunolabeling, as did the specimens in the IM-REP-iPRF group. In this case, there was also no significant difference between them ($P > 0.05$).

Regarding IL-1 β immunolabeling, most specimens in the REP group had a low pattern of immunolabeling, as did specimens in the REP-iPRF group. There was no significant difference between them ($P > 0.05$). As for the IM-REP group, almost all specimens also had a low pattern of immunolabeling, while the specimens of the IM-REP-iPRF group had immunolabeling as well as a low pattern of immunolabeling. In this case, there was also no significant difference between them ($P > 0.05$).

Table 2 Immunolabeling of DSPP and IL-1 β in experimental groups after 21 days of REP
Experimental groups (n = 6)

Scores for each parameter	Experimental groups (n = 6)				P-value*
	REP	REP-iPRF	IM-REP	IM-REP-iPRF	
DSPP					
1 = immunolabeling missing	0/6	0/6	0/6	0/6	REP \times REP-iPRF = 0.394
2 = low pattern of immunolabeling	2/6	0/6	0/6	0/6	REP \times IM-REP = 0.132
3 = moderate pattern of immunolabeling	4/6	6/6	4/6	4/6	IM-REP \times IM-REP-iPRF = 1.000
4 = strong pattern of immunolabeling	0/6	0/6	2/6	2/6	REP-iPRF \times IM-REP-iPRF = 0.394
5 = very strong pattern of immunolabeling	0/6	0/6	0/6	0/6	
Median	3	3	3	3	
P-value[‡]		= 0.069			
IL-1β					
1 = immunolabeling missing	2/6	2/6	1/6	2/6	REP \times REP-iPRF = 1.000
2 = low pattern of immunolabeling	4/6	4/6	4/6	3/6	REP \times IM-REP = 0.485
3 = moderate pattern of immunolabeling	0/6	0/6	1/6	1/6	IM-REP \times IM-REP-iPRF = 0.699
4 = strong pattern of immunolabeling	0/6	0/6	0/6	0/6	REP-iPRF \times IM-REP-iPRF = 0.818
5 = very strong pattern of immunolabeling	0/6	0/6	0/6	0/6	
Median	2	2	2	2	
P-value[‡]		= 0.761			

The symbol [‡] indicates that the data were analyzed using the Kruskal-Wallis followed by Dunn test ($P < 0.05$).

The symbol * indicates that the data were analyzed using the Mann-Whitney test. The presence of significant difference was evaluated between the REP and IM-REP or REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups; and between REP and REP-iPRF or IM-REP and IM-REP-iPRF ($P < 0.05$).

DSPP: dentin sialophosphoprotein; IL-1 β : interleukin-1 β ; iPRF: injectable platelet rich fibrin; IM-REP: immunosuppressed regenerative endodontic procedure; REP: regenerative endodontic procedure.

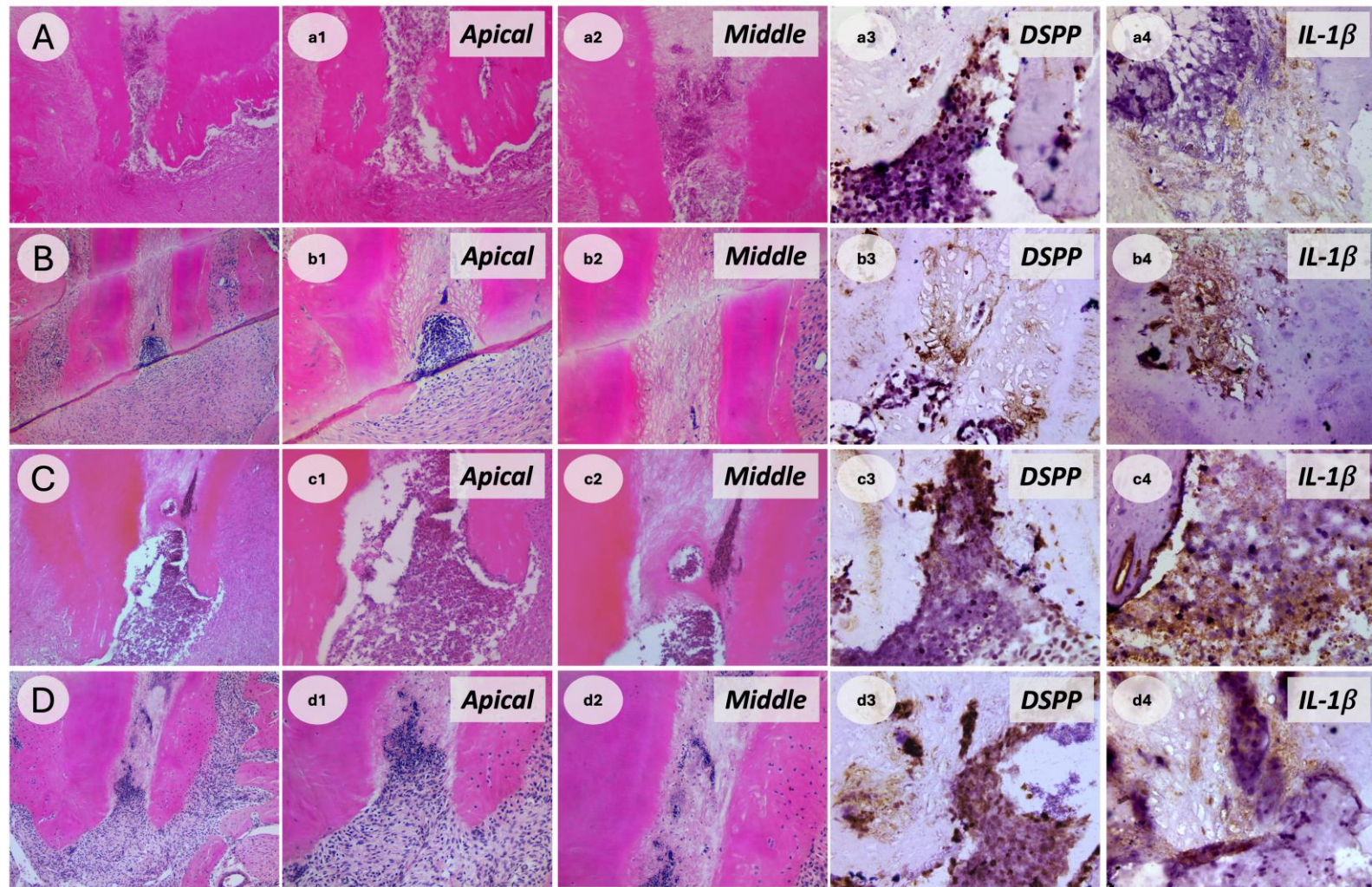


Figure 1. Representative images of histological (A-D; a1,a2-d1,d2), DSPP (a3-d3) and IL-1 β (a4-d4) analysis. REP group (A, a1, a2): neoformation of connective tissue inside the root canals up to middle and cervical third and new mineralized tissue in length and thickness of the root canal; REP-iPRF group (B, b1, b2): neoformation of connective tissue inside the root canals up to cervical third and new mineralized tissue in length and thickness of the root canal; IM-REP (C, c1, c2) and IM-REP-iPRF (D, d1, d2) groups: neoformation of connective tissue up to apical third of root canal. REP (a3), REP-iPRF (b3), IM-REP (c3) and IM-REP-iPRF (d3)

groups: moderate DSPP immunolabeling. REP (a4), REP-iPRF (b4), IM-REP (c4) and IM-REP-iPRF (d4) groups: low IL-1 β immunolabeling. [250 \times , 400 \times , H&E staining; 400 \times , DSPP and IL-1 β immunolabeling]

Discussion

This study used an *in vivo* model of Wistar rats to evaluate tissue neoformation, and inflammation and dentin formation markers in immunosuppressed rats that had its molars subjected to regenerative endodontic procedure (REP) with or without injectable platelet-rich fibrin (iPRF). It was found that there was no significant difference between REP and REP-iPRF groups or between IM-REP and IM-REP-iPRF groups regarding neoformation of connective tissue inside the root canals, but there was significant difference present between REP and IM-REP groups and also between REP-iPRF and IM-REP-iPRF groups. Also, regarding mineralized tissue formed on the root canal walls, specimens of all groups showed some kind of growth of new mineralized tissue in length or thickness of the root canals, without significant difference in between any of the groups compared in this study. It was also found that regarding both DSPP and Il-1 β immunolabeling, most specimens in all groups had either low or moderate pattern of immunolabeling.

Wistar rat molars were used because they provide an acceptable and previously standardized model (Reis-Prado et al., 2023). These animals exhibit biological responses, repair processes, and histological characteristics similar to those of humans (Sasaki & Kawamata-Kido, 1995; Dammaschke et al., 2010; Cintra et al., 2016). Additionally, the use of rats allows reproducibility and the opportunity to study different variables, establishing standards (Cintra et al., 2016; Reis-Prado et al., 2023).

Immunosuppression is a dysfunction of the immune system that can be triggered by a variety of agents. However, prolonged exposure to these adverse factors can lead to deterioration of health, reduced body weight gain, reduced effectiveness of preventive vaccination, increased susceptibility to cancer, infectious and parasitic diseases (La hoz et al., 2013; Sundar et al., 2013) and, consequently, to increased mortality that directly contributes to economic losses.

There has been considerable progress in the last two decades in the identification of compounds capable of producing inhibition of the immune response regardless of which antigen initiates it (Ricardo et al., 2019). Cytotoxic agents are part of a group of chemical substances with the pharmacological property of destroying cells capable of self-replication, including immunocompetent lymphocytes. Many of these drugs also have immunosuppressive activity and, therefore, their use

was expanded to the treatment of autoimmune diseases and in the inhibition of transplant rejection reactions (Cardoso, 2022).

Cyclophosphamide (CPD) is commonly used in chemotherapy for cancer patients (Murray et al., 2007; Suzuki et al., 2005). It causes a decrease in the cellularity and weight of lymphoid organs (Ballal et al., 2022), acting on cells with a high mitotic index and demonstrating inhibitory properties on both humoral and cellular immune responses. It also works as an immune system suppressor drug for studies involving organ transplantation; and is used in the treatment of systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis, in addition to being administered in other benign diseases (Suzuki et al., 2005). This substance is an alkylating agent that has potent immunosuppressive properties and antineoplastic activity. Its use by researchers occurs due to its ability to trigger reliable and repeatable results within a short period of time. CPD weakens both the cellular immune response and the humoral immune response. Its effect is dose-dependent, but even a single administration can temporarily impair the immune system (Abo-Heikal et al., 2023).

Inflammatory disease of endodontic origin is influenced by the host's immune response, although there is controversy regarding the treatment of autoimmune diseases with immunosuppressants. Studies show that patients taking immunosuppressants may present an accelerated repair process of periapical lesion, suggesting activation of the pro-inflammatory cascade associated with immunomodulatory therapy (Cotti et al. 2015, 2018). Furthermore, paediatric patients using immunosuppressive drugs require additional dental treatment, as they may be at risk of subsequent dental infection (Ding et al. 2009). However, young patients with immature teeth have their root formation interrupted by pulp necrosis, and conventional endodontic treatment is challenging, since possible root fractures and/or leakage of the filling material may occur due to the thin root walls and lack of apical constriction (Ding et al., 2009).

Given the need to better understand the immune system, experimental immunosuppression models have been established for many years, serving as an important tool for research related to the development of techniques for measuring the immune response, the evaluation of new substances aimed at combating immunosuppression, in addition to enabling experimental studies of organ transplants and also of pathological conditions enhanced by the suppression of the immune system, such as cancer (Galler et al., 2011). Therefore, studying

immunosuppressants using experimental animal with a focus on the mechanisms of action and clinical outcomes is essential to establish guidelines for monitoring and protecting tooth tissues.

Conventional endodontic treatment in necrotic immature teeth may require REP due to the non-formation of the apical foramen, resulting in a divergent root shape and wide apex because the roots are thin and susceptible to fractures (Law et al., 2013). 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 (Albuquerque et al., 2014; Dos Reis-Prado et al., 2022), as shown in this study.

PRF is a platelet concentrate for autologous use that has been shown to be efficient in tissue regeneration in surgical applications (Terayama et al., 2020). 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 (Youssef et al., 2022). 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 (Varela et al., 2019; Wang et al., 2018). It may allow better bone regeneration than PRF, and elimination of endodontic infection (Wang et al., 2018). In endodontics, the choice for i-PRF may still be mainly due to its easy introduction inside the root canal.

It was observed that the specimens of the REP group showed neoformation of connective tissue inside the root canals up to the middle and cervical thirds, while most of the specimens of the REP-iPRF group showed connective tissue formation up to the cervical third. Regarding the mineralized tissue formed on the root canal wall, the specimens of the REP group showed growth of new mineralized tissue in length or thickness of the root canal, or in both length and thickness. Most of the specimens in the REP-iPRF group showed growth in both root canal length and root thickness. To our knowledge, few studies have evaluated iPRF in REP results, which makes it difficult to discuss the results found. A recent clinical study evaluated the iPRF 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 (Abo-Heikal et al., 2023).

To date, studies have primarily evaluated PRF in REP rather than iPRF. 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, which does not corroborate the results found in this study (Sundar et al., 2013). However, a review exposed that apical closure occurs more frequently when PRF is used during REP and other clinical study demonstrated that PRF can induce higher formation of mineralized tissue in necrotic immature permanent teeth (Abo-Heikal et al., 2023). 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 (Nagendrababu et al., 2021). There is a lack of a standard protocol for REP with platelet aggregates, which may limit the use of PRF or iPRF in endodontics, as different protocols may result in different results.

DSPP is a protein abundant in dentin that plays a crucial role in tooth mineralization. It is encoded by the DSPP gene and, after production, is cleaved into two smaller proteins: dentin sialoprotein (DSP) and dentin phosphoprotein (DPP). In addition, IL-1 β is a pro-inflammatory cytokine that plays a crucial role in the immune and inflammatory response, being released by cells such as macrophages and monocytes in response to stimuli such as bacterial infections. It is synthesized as an inactive precursor, which is subsequently processed and found extracellularly as a mature biologically active polypeptide. Also, IL-1 β has been detected in necrotic and inflamed dental pulp.

In this study, most specimens in the REP group had a moderate pattern of immunolabeling with DSPP, as did specimens in the REP-iPRF group. Regarding the IM-REP group, almost all specimens presented a moderate pattern of immunolabeling, as did the specimens in the IM-REP-iPRF group.

Regarding IL-1 β immunolabeling, most specimens in the REP group had a low pattern of immunolabeling, as did specimens in the REP-iPRF group. As for the IM-REP group, almost all specimens also had a low pattern of immunolabeling, while the specimens of the IM-REP-iPRF group had immunolabeling as well as a low pattern of immunolabeling.

In conclusion, despite the limitations of this study, such as the experimental animal model and the absence of endodontic infection, this study shows that iPRF

may be important to improve tissue neoformation within the root canals in REP, especially considering immunosuppression.

Conclusion

It is concluded that immunosuppression negatively affected tissue neoformation within the root canals and the formation of mineralized tissue in immature rat molars after REP, but did not influence the presence of DSPP or IL-1 β , regardless of the use of iPRF.

Acknowledgement

This research was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (n. 001; 88887.908152/2023-00), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq (n. 310683/2022-0) and Fundação de Amparo à Saúde do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG (n. APQ-04630-23).

The authors deny any conflicts of interest.

References

Abo-Heikal MM, El-Shafei JM, Shouman SA, Roshdy NN. (2024) 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.* 40(1), 61-75.

Albuquerque, et al. (2014) Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. *Journal of Dental Research*, 93, 12, 1222–1231.

Alexander, A., Torabinejad, M., Vahdati, S.A., Nosrat, A., Verma, P., Grandhi, A. et al. (2020) Regenerative endodontic treatment in immature noninfected ferret teeth using blood clot SynOss putty as scaffolds. *Journal of Endodontics*, 46, 209–215.

American Association of Endodontics (2018) AAE Clinical Consideration for a Regenerative Procedure. *Revised*, 4, 18-23.

Andreasen, F.M., Kahler, B. (2015) Pulpal response after acute dental injury in the permanent dentition: clinical implications-a review. *Journal of Endodontics* ,41, 299-308.

Ballal, N.V., Narkedamalli, R., Ruparel, N.B., Shenoy, P.A., Bhat, V.R., Belle, V.S. (2022) Effect of maleic acid root conditioning on release of transforming growth factor beta 1 from infected root canal dentin. *Journal of Endodontics*, 48, 620-624.

Benetti F, Gomes-Filho JE, Ferreira LL, Ervolino E, Briso ALF, Sivieri-Araújo G, Dezan-Júnior E, Cintra LTA. (2017) 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*, 81, 103-109.

Benetti, F., Briso, ALF., Carminatti, M., de Araújo Lopes, J.M., Barbosa, J.G., Ervolino, E., Gomes-Filho, J.E., Cintra, L.T.A. (2019a) The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. *International Endodontic Journal*, 52, 665-675.

Cameron, R., Claudia, E., Ping, W., Erin, S. Ruparel, N.B. (2019) Effect of a residual biofilm on release of transforming growth factor B1 from dentin. *Journal of Endodontics*, 45, 1119–1125.

Cardoso, O.S., Meier, M.M., Carvalho, E.M., Ferreira, P.V.C., Gavini, G., Zago, P.M.W. et al. (2022) Synthesis and characterization of experimental endodontic sealers containing bioactive glasses particles of NbG or 45S5. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 125, 1-10.

Cintra, L.T., Benetti, F., Ferreira, L.L., Rahal, V., Ervolino, E., Jacinto, R.C., Gomes Filho, J.E., Briso, A.L.F. (2016) Evaluation of an experimental rat model for comparative studies of bleaching agentes. *Journal of Applied Oral Science*, 24, 95-104.

Cotti E, Careddu R, Schirru E, *et al.* A case of SAPHO syndrome with endodontic implications and treatment with biologic drugs. *J Endod*, 2015, 41,1565-1570.

Cotti E, Mezzena S, Schirru E, *et al.* Healing of apical periodontitis in patients with inflammatory bowel diseases and under anti-tumor necrosis factor alpha therapy. *J Endod*, 2018, 44, 1777-1782.

Dammaschke, T. (2010) Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Laboratory Animals*, 44, 1-6.

De Laia, A.G.S., Barrioni, B.R., Valverde, TM., de Goes, AM., de Sá, MA., Pereira, M. (2020) Therapeutic cobalt ion incorporated in poly(vinyl alcohol)/bioactive glass scaffolds for tissue engineering. *Journal of Materials Science*, 55, 8710–8727.

de Paula KDS, Dos Reis-Prado AH, de Jesus WP, Goto J, de Arantes LC, Verçosa M, Cintra LTA, Ervolino E, Szawka RE, Crovace MC, de Mesquita RA, Benetti F. (2024) Final irrigation with bioglass solution in regenerative endodontic procedure induces tissue formation inside the root canals, collagen maturation, proliferation cell and presence of osteocalcin. *International Endodontic Journal*, 57, 586-600.

Ding, R.Y., Cheung, G.S., Chen, J., Yin, X.Z., Wang, Q.Q., Zhang, C.F. (2009) Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *Journal of Endodontics*, 35, 745-749.

Diogenes, A., Hargreaves, K.M. (2017) Microbial Modulation of Stem Cells and Future Directions in Regenerative Endodontics. *Journal of Endodontics*, 43, S95-S101.

Galler, K.M., D'Souza, R.N., Federlin, M., Cavender, A.C., Hartgerink, J.D., Hecker, S. et al. (2011) Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, 37, 1536–1541.

Huyan, X et al. Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. (2011) *International immunopharmacology*, 11, 1293-7.

Kharchi, A.S., Tagiyeva-Milne, N., Kanagasingam, S. (2020) Regenerative Endodontic Procedures, Disinfectants and Outcomes: A Systematic Review. *Primary Dental Journal*, 9, 65-84.

La Hoz R.M., Baddley J.W. (2013) Infectious complications of immune modulatory agents. *Curr Infect Dis Rep*, 15: 465-471.

Law, A. S. Considerations for regeneration procedures. *Journal of Endodontics*, v. 39, n. 3, p. 44-56, 2013.

Manente, F. A. et al. (2018) Experimental sporotrichosis in a cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice model. *Medical Mycology*, 56, 711-722.

Murray, P. E. et al. (2007) Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*, v. 33, n. 4, p. 377-390.

Nagendrababu, V., Kishen, A., Murray, P.E., Nekoofar, M.H., de Figueiredo, J.A.P., Priya, E., Jayaraman, J., Pulikkotil, S.J., Camilleri, J., Silva, R.M., Dummer, P.M.H. (2021) PRIASE 2021 guidelines for reporting animal studies in Endodontology: a consensus-based development. *International Endodontic Journal*, 54, 848-857.

Peddis, D. *et al.* (2019) Interaction of biologic therapy with apical periodontitis and periodontitis: a systematic review. *Australian Dental Journal*, 64, 122-134, 2019.

Reis-Prado, A.H., Abreu, L.G., Fagundes, R.R., Oliveira, S.C., Bottino, M.C., Ribeiro-Sobrinho, A.P., Benetti, F. (2022) Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review. *International Endodontic Journal*, 55, 579-612.

Reis-Prado, A.H., Oliveira, S.C., Goto, J., Silva, G.A.B., Cintra, L.T.A., de Mesquita, R.A., et al. (2023) Influence of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on the regenerative endodontic procedure in an immature rat molar model. *International Endodontic Journal*, 56, 69–79.

Ricardo, L.H., do Prado, R.F., Carvalho, Y.R., da Silva, Peralta, F., Pallos, D. (2019) Cyclosporine A - Induced gingival overgrowth and proliferating cell nuclear antigen expression in experimental periodontitis. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 9, 86-90.

Sasaki, T., Kawamata-Kido, H. (1995) Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Archives of Oral Biology*, 40, 209-219.

Scarpato, R.K., Dondoni, L., Böttcher, D.E., Grecca, F.S., Figueiredo, J.A., Kantarci, A., Van Dyke, T.E., Batista, E.L. Jr. (2014) Intracanal delivery of Resolvin E1 controls inflammation in necrotic immature rat teeth. *Journal of Endodontics*, 40, 678-682.

Sundar K.M., Sires M. (2013) Sepsis induced immunosuppression: Implications for secondary infections and complications. *Indian J Crit Care Med* 17: 162-169.

Suzuki, T., Kumamoto, H., Kunimori, K., Ooya, K. (2005) Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors in lining epithelium of radicular cysts. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, 34, 46-52.

Terayama, A.M., Benetti, F., de Araújo Lopes, J.M., Barbosa, J.G., Silva, I.J.P., Sivieri-Araújo, G. et al. (2020) Influence of low-level laser therapy on

inflammation, collagen fiber maturation, and tertiary dentin deposition in the pulp of bleached teeth. *Clinical Oral Investigations*, 24, 3911–3921.

Torabinejad, M., Nosrat, A., Verma, P., Udochukwu, O. (2017) Regenerative endodontic treatment or mineral trioxide aggregate apical plug in teeth with necrotic pulps and open apices: a systematic review and meta-analysis. *Journal of Endodontics*, 43, 1806–1820.

Wang, X. *et al.* (2018) 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.

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

Zhang, D.D., Chen, X., Bao, Z.F., Chen, M., Ding, Z.J., Zhong, M. (2014) Histologic comparison between platelet-rich plasma and blood clot in regenerative endodontic treatment: an animal study. *Journal of Endodontics*, 40, 1388–1393.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos está atrelado aos princípios da engenharia tecidual, como a migração e diferenciação de células-tronco mesenquimais; o uso de um *scaffold* que atue como uma matriz de suporte para a organização tecidual; fatores de crescimento que auxiliem na migração, proliferação e diferenciação celular; e um ambiente estéril livre de focos de infecção.

Conclui-se que a imunossupressão afetou negativamente a neoformação tecidual no interior dos canais radiculares e a formação de tecido mineralizado em molares imaturos de ratos após REP, mas não influenciou a presença de DSPP ou IL-1 β . Além disso, o iPRF não apresentou benefícios em seu uso.

REFÊRENCIAS

ALBUQUERQUE, M. T. P. *et al.* Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. **Journal of Dental Research**, v. 93, n. 12, p. 1222–1231, dez. 2014.

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, 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. 2018a.

BENETTI, F. *et al.* In Vivo Study of the Action of a Topical Anti-Inflammatory Drug In Rat Teeth Submitted To Dental Bleaching. **Brazilian Dental Journal**, v. 29, n. 6, p. 555-561, 2018b.

BLECHA F. Immunomodulators for prevention and treatment of infectious diseases in food-producing animals. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* 17: 621-633, 2001.

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, out. 2019.

CAMERON, R. *et al.* Effect of a Residual Biofilm on Release of Transforming Growth Factor β 1 from Dentin. **Journal of Endodontics**, v. 45, n. 9, p. 1119-1125, set. 2019.

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. 790-8, 2017.

COTTI, E. *et al.* Healing of Apical Periodontitis in Patients with Inflammatory Bowel Diseases and under Anti-tumor Necrosis Factor Alpha Therapy. **Journal of Endodontics**, v. 44, dez. 2018

COTTI, E. *et al.* Proresolving mediators in endodontics: a systematic review. **Journal of Endodontics**, v. 47, p. 711-720, 2021.

DE PAULA K. D. S. *et al.* Final irrigation with bioglass solution in regenerative endodontic procedure induces tissue formation inside the root canals, collagen maturation, proliferation cell and presence of osteocalcin. **International Endodontic Journal**, v. 57, p. 586-600, 2024.

DEVAUD C., JOHN LB, WESTWOOD JA, et al. Immune modulation of the tumor microenvironment for enhancing cancer immunotherapy. **Oncoimmunology** 25961, 201

DHARNIDHARKA V. *et al.* P1107: clinical outcomes of solid organ transplant patients with ebv+ ptld who fail rituximab plus chemotherapy: a multinational, retrospective chart review study. **Hemasphere**. V. 23 n.6, p. 997-998, 2022

DING, R. Y. *et al.* Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. **Journal of Endodontics**, v. 35, n. 5, p. 745-749, 2009.

DIOGENES, A. *et al.* Regenerative Endodontic Procedures: Clinical Outcomes. **Dental Clinics North of America**, v. 61, n. 1, p. 111-125, 2017.

DONKER, A.E *et al.* Value of panoramic radiographs in paediatric pre-bone marrow transplantation oral evaluation. **International Journal of Oral Maxillofacial Surgery**, v. 31, p. 170–172, 2022.

DOS REIS-PRADO, A. H. *et al.* Comparison between immediate and delayed post space preparations: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 25, n. 2, p. 417-440, fev. 2023.

FOSTER A.P. Immunomodulation and immunodeficiency. *Vet Dermatol* 15: 115-126, 2004.

GALLER, K. M. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. **International Endodontic Journal**, v. 49, n. 10, p. 926–936, 2016.

GARCIA, M.; SERTÓRIO, S.P.; ALVES, G. J.; CHATE S. C ; CARNEIRO, R.; LALLO, M.

A. Uso da ciclofosfamida em modelos de imunodepressão experimental em ovinos. *Pesq. Vet. Bras.* 24:115-119, 2004.

GARCIA-GODOY, F.; MURRAY, P. E. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. **Dental Traumatology**, v. 28, n. 1, p. 33-41, 2012.

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, dez. 2013.

GONÇALVES, L. F. *et al.* Effect of EDTA on TGF- β 1 released from the dentin matrix and its influence on dental pulp stem cell migration. **Brazilian Oral Research**, v. 30, n. 1, p. e131, dez. 2016.

GRAHAM, L. *et al.* The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, v. 27, n. 14, p. 2865-73, 2006.

GUERRERO-GIRONÉS, J. *et al.* Association between Pulpal-Periapical Pathology and Autoimmune Diseases: A Systematic Review. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 21, p. 4886, 2021.

HOERR F.J.: Clinical aspects of immunosuppression in poultry. *Avian Dis* 54: 2-15, 2010.

CHANG, J. C. *et al.* Hydroxychloroquine and immunosuppressant adherence patterns and associated factors in children with systemic lupus erythematosus. **Seminars in Arthritis and Rheumatology**, v. 56, p. 152042, 2022.

HUYAN, X. H. *et al.* Immunosuppressive effect of cyclophosphamide on white blood cells and lymphocyte subpopulations from peripheral blood of Balb/c mice. **International immunopharmacology** v. 11, n. 9, p. 1293-7, 2011.

IDEO I. *et al.* Prevalence of Apical Periodontitis in Patients with Autoimmune Diseases under Immunomodulators: A Retrospective Cohort Study. **Journal of Endodontics**, v. 48, p. 722-729, 2022.

JUNG, C. *et al.* Pulp-dentin regeneration: current approaches and challenges. **Journal of Tissue Engineering**, v. 10, p. 1-13, jan. 2019.

JUNQUEIRA, L. C.; MONTES, G. S.; SANCHEZ, E. M. The influence of tissue section thickness on the study of collagen by the Picrosirius-polarization method. **Histochemistry**, v. 74, n. 1, p. 153-156, 1982.

KIM, J. M. *et al.* DJ-1 promotes angiogenesis and osteogenesis by activating FGF receptor-1 signaling. **Nature Communications**, v. 3, n. 1, p. 1-11, jan. 2012.

LA HOZ R.M., BADDLEY J.W. Infectious complications of immune modulatory agents. *Curr Infect Dis Rep* 15: 465-471, 2013.

LAW, A. S. Considerations for regeneration procedures. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 3, p. 44-56, 2013.

LI, S. *et al.* Efficacy and safety of immunosuppressive medications for steroid-resistant nephrotic syndrome in children: a systematic review and meta-analysis. **Oncotarget**, v. 8, n. 42, p. 73050–73062, 2017.

LIN, L. M.; KAHLER, B. A review of regenerative endodontics: current protocols and future directions. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, v. 51, p. 41-51, nov. 2017.

LONDERO, CDE L. *et al.* Histologic Analysis of the Influence of a Gelatin-based Scaffold in the Repair of Immature Dog Teeth Subjected to Regenerative Endodontic Treatment. **Journal of Endodontics**, v. 41, n. 10, p. 1619-25, out. 2015.

LOVELACE, T. W. *et al.* Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. **Journal of Endodontics**, v.37, n. 2, p. 133-138, 2011.

MURRAY, P. E. *et al.* Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 4, p. 377-390, 2007.

NELSON R.P. JR., BALLOW M. Immunomodulation and immunotherapy: drugs, cytokines, cytokine receptors, and antibodies. *J Allergy Clin Immunol* 111 (2 Suppl): 720-743, 2003.

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, 2017.

PEDDIS, D. *et al.* Interaction of biologic therapy with apical periodontitis and periodontitis: a systematic review. **Australian Dental Journal**, v. 64, p. 122-134, 2019.

PIRAS, V. *et al.* Prevalence of apical periodontitis in patients with inflammatory bowel diseases: a retrospective clinical study. **Journal of Endodontics**, v. 43, p. 389-394, 2017.

POYATO-BORREGO, M. *et al.* High prevalence of apical periodontitis in patients with inflammatory bowel disease: an age- and gender- matched case-control study. **Inflamm Bowel Dis**, v. 26, p. 273-279, 2020.

ROTSTEIN I. *et al.* Prevalence of periapical abscesses in patients with rheumatoid arthritis. A cross-sectional study. **American Journal of Dentistry**, v. 34, p. 211-214, 2021.

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. 678-82, maio 2014.

SHAH, N. *et al.* Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: A pilot clinical study. **Journal of Endodontics**, v. 34, n. 8, p. 919-25, 2008.

SPINNER J.A. *et al.* Immunosuppressant drugs and their effects on children undergoing solid organ transplant. **Pediatric in Review**, v. 43, n. 2, p. 71-86, 2022.

SUNDAR K.M., SIREM M. Sepsis induced immunosuppression: Implications for secondary infections and complications. **Indian J Crit Care Med** v. 17: 162-169, 2013.

TERAYAMA, A. M. *et al.* Influence of low-level laser therapy on inflammation, collagen fiber maturation, and tertiary dentin deposition in the pulp of bleached teeth. **Clinical Oral Investigations**, v. 24, n. 11, p. 3911-3921, nov. 2020.

THACKER E.L. Immunomodulators, immunostimulants, and immunotherapies in small animal veterinary medicine. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 40: 473-483, 2010.

WHITLEY N.T., DAY M.J. Immunomodulatory drugs and their application to the

management of canine immune-mediated disease. *J Small Anim Pract* 52: 70-85, 2011.

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. 1388-93, set. 2014.

ANEXOS

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 do uso de imunossupressor no processo de reparo após procedimento endodôntico regenerativo em molares imaturos de ratos", protocolo do CEUA: 262/2024 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 22/11/2024.

Vigência da Autorização	22/11/2024 a 21/11/2029
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Wistar
Nº de animais	6