

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

Kiani dos Santos de Paula

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE SOLUÇÃO DE BIOVIDRO NO
PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO**

Belo Horizonte
2023

Kiani dos Santos de Paula

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE SOLUÇÃO DE BIOVIDRO NO PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO

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

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

Belo Horizonte
2023

Ficha Catalográfica

P324a Paula, Kiani dos Santos de.
2023 Análise da influência de solução de biovidro no
T procedimento endodôntico regenerativo / Kiani dos Santos de
Paula. -- 2023.

57 f. : il.

Orientadora: Francine Benetti.

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

1. Teste de materiais. 2. Cobalto. 3. Proloterapia. 4.
Osteocalcina. 5. Antígeno nuclear de célula em proliferação.
I. Benetti, Francine. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DE SOLUÇÃO DE BIOVIDRO NO PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO

KIANI DOS SANTOS DE PAULA

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 18 de agosto de 2023, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Francine Benetti - Orientadora
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Juliana Vilela Bastos
Faculdade de Odontologia da UFMG

Prof. Carlos Roberto Emerenciano Bueno
Faculdade de Odontologia de Araçatuba - UNESP

Belo Horizonte, 18 de agosto de 2023.



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Roberto Emerenciano Bueno, Usuário Externo**, em 18/08/2023, às 11:41, 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 **Francine Benetti, Professora do Magistério Superior**, em 18/08/2023, às 11:41, 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 **Juliana Vilela Bastos, Chefe de departamento**, em 18/08/2023, às 11:41, 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 **2482430** e o código CRC **FC2517A6**.

Dedico este trabalho à minha mãe, que foi minha maior incentivadora e apoiadora na realização deste sonho. Também dedico à minha irmã, que celebrou essa conquista com entusiasmo como se fosse sua. E dedico especialmente a todos os professores da minha família, cuja inspiração me levou a escolher a carreira docente. Minha gratidão eterna

AGRADECIMENTOS

Como iniciar um agradecimento sem que pareça meramente um clichê? Como imprimir em poucas palavras a imensidão deste sonho? Como não se emocionar? Embora não possua as respostas para esses questionamentos, quero expressar todos meus sentimentos neste momento tão especial. Encontrar palavras que capturem completamente a materialização desse sonho e a intensidade de 24 meses de vivência é uma tarefa desafiadora, mas gostaria de começar agradecendo a Deus por me permitir realizar este feito.

À minha mãe, irmã e a toda a minha família (inclusive, Juh, obrigada por cocriar tudo isso comigo), expresso minha profunda gratidão. O apoio incondicional de vocês foi fundamental para enfrentar os desafios ao longo dessa jornada. Agradeço de coração por estarem ao meu lado e por compartilharem essa conquista comigo.

À minha orientadora, Prof^a. Francine Benetti, por sua orientação impecável, incansável e pelos valiosos ensinamentos que me proporcionou, além de todas as oportunidades de crescimento. Também estendo meu agradecimento a todos os professores da área de Endodontia, cujas contribuições foram essenciais para o meu desenvolvimento profissional.

Não posso deixar de mencionar meu grupo de pesquisa, pois sem o apoio e colaboração de todos, não teria sido possível chegar até aqui. Sempre afirmo que a pesquisa não se faz sozinha, e gostaria de destacar especialmente o Alexandre Henrique Reis Prado, que dedicou seu tempo e esforço para me ajudar em todas as etapas. Sua dedicação foi inestimável, e ganhei não apenas um parceiro para inúmeras publicações e pesquisas, mas também um amigo para toda a vida.

Aos meus professores da graduação, em especial à minha primeira inspiração e orientadora, Rúbia Caus, por ter me ensinado os primeiros passos na área da Endodontia e por continuar a me ensinar até hoje. Também gostaria de agradecer a Lorena Silveira Cardoso, por ser a minha centelha na Metodologia, em que sempre alimentou minha paixão pela escrita acadêmica, além de sempre me recordar que tudo isso é só o começo. Agradeço por ambas terem me proporcionado uma base sólida para a minha jornada.

Aos meus amigos de longa data (Henrique, Magno, Tiago, Débora C., Débora G., Bruna, Jéssica, Rodolfo, Mathaus, Nathalia, Alexandre, Carol, Sarah, Amanda),

minha gratidão é imensa. Vocês acreditaram em mim e estiveram presentes mesmo nas raras visitas, sendo a fonte de minha energia e inspiração. A presença e os ouvidos incansáveis foram essenciais nos momentos em que pensei que não conseguiria lidar com a jornada dupla e até tripla. Aos que me acolheram durante minhas inúmeras idas a Vitória, não há palavras para expressar o quanto sou grata. Sem cada um de vocês, essa conquista não seria possível. Amo vocês profundamente.

À todas as pessoas que, de uma maneira ou de outra, fizeram parte dessa jornada, expresso minha gratidão. Cada encontro, cada conversa e cada momento compartilhado contribuíram para moldar a pessoa que sou hoje, incluindo todos aqueles que cruzaram meu caminho durante minha breve, mas marcante estadia em Belo Horizonte, inclusive meus colegas da turma de Endodontia do mestrado.

Portanto, cada um de vocês desempenhou um papel fundamental e contribuiu para tornar essa jornada ainda mais significativa, e finalizo este momento de gratidão citando uma frase que carrego comigo em cada final de ciclo: “Só não esqueça de levar para voar, quem ajudou a criar asas”. Vocês foram essenciais nesse processo e me presentearam com asas incríveis.

“Se enxerguei mais longe, foi porque me apoiei em braços de gigantes.”

Isaac Newton

RESUMO

Este estudo avaliou os efeitos de uma solução experimental de vidro bioativo F18 dopado com cobalto (F18Co) no reparo tecidual após procedimento endodôntico regenerativo (REP, do inglês *regenerative endodontic procedure*) em molares de ratos. A solução de F18Co foi preparada misturando o pó de F18Co com água destilada na proporção de 1:5. Os primeiros molares superiores direito ou esquerdo de 12 ratos Wistar foram utilizados, nos quais as polpas foram expostas, removidas e os canais irrigados com hipoclorito de sódio (NaOCl) 2,5%, seguido de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) 17% (5 min cada). Em seguida, os molares foram divididos em dois grupos (n = 6): REP-SS e REP-F18Co, nos quais receberam irrigação final (5 min) com solução salina (SS) ou solução de F18Co, respectivamente. Em seguida, foi induzido sangramento intracanal e o dente foi selado. Molares não tratados foram usados como controles (n = 3). Após 21 dias, os ratos foram eutanasiados e as peças processadas para análise da formação de tecido mineralizado e tecido mole dentro do canal radicular, pela técnica de hematoxilina-eosina. A presença e maturação do colágeno foram avaliadas por coloração de tricrômio de Masson e picrossírius red. Análises da imunomarcagem do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e osteocalcina (OCN) foram realizadas. Os dados foram submetidos ao teste de Mann-Whitney U ($p < 0,05$). Houve formação semelhante de tecido mineralizado em espessura e comprimento nos grupos REP-SS e REP-F18Co ($p > 0,05$). Em relação à presença de tecido neoformado no interior dos canais radiculares, a maioria dos espécimes de REP-F18Co apresentou formação de tecido até o terço cervical do canal radicular, enquanto do grupo REP-SS, até o terço médio ($p < 0,05$), e houve maior maturação colágena em REP-F18Co ($p < 0,05$). O número de células positivas para PCNA encontradas no terço apical do canal radicular foi significativamente maior em REP-F18Co, assim como a imunomarcagem de OCN, que foi severa na maior parte dos espécimes do grupo REP-F18Co, e leve em REP-SS. Conclui-se que a irrigação final com solução de biovidro F18Co em REP não influenciou a formação de tecido mineralizado, mas induziu a formação de tecido conjuntivo no interior dos canais radiculares, com maior maturação colágena, aumento no número de células positivas para PCNA e na imunomarcagem de OCN.

Palavras-chave: biocompatibilidade; cobalto; terapia regenerativa; osteocalcina; PCNA.

ABSTRACT

This study evaluated the influence of an experimental solution of cobalt-doped F18 bioactive glass (F18Co) on tissue repair following regenerative endodontic procedure (REP) in rat molars. The F18Co solution was prepared at a ratio of 1:5 F18Co powder to distilled water. The right or left upper first molars of 12 Wistar rats were used, where the pulps were exposed, removed, and irrigated with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), followed by 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (5 min each). Subsequently, the molars were divided into two groups ($n = 6$): REP-SS and REP-F18Co, where they received a final irrigation (5 min) with saline solution (SS) or F18Co solution, respectively. Then, intracanal bleeding was induced, and the tooth was sealed. Untreated molars were used as controls ($n = 3$). At 21 days, the rats were euthanized, and the specimens were processed for analysis of mineralized tissue and soft tissue formation inside the root canal using haematoxylin-eosin. The presence and maturation of collagen was evaluated by Masson's trichrome and picrosirius red staining. Immunolabeling analyses of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and osteocalcin (OCN) were performed. The data were submitted to the Mann-Whitney U-test ($P < 0.05$). There was similar formation of mineralized tissue in thickness and length in REP-SS and REP-F18Co groups ($P > 0.05$). Regarding the presence of newly formed soft tissue, most specimens of the REP-F18Co had tissue formation up to the cervical third of the canal, while the REP-SS specimens showed formation up to the middle third ($P < 0.05$), and there was higher maturation collagen in REP-F18Co ($P < 0.05$). The number of PCNA-positive cells found in the apical third of the root canal was significantly higher in the F18Co group, as well as the OCN immunolabeling, which was severe in most specimens of REP-F18Co, and low in most specimens of REP-SS. In conclusion, the final irrigation with F18Co bioactive glass solution in REP did not influence mineralized tissue formation but induced soft tissue formation inside the root canals, with higher collagen maturation, and an increase in PCNA-positive cells and OCN immunolabeling.

Keywords: biocompatibility; cobalt; regenerative endodontic procedure; PCNA; osteocalcin.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos grupos experimentais, de acordo com os tratamentos realizados.....20

Tabela 2. Avaliação histológica para cada parâmetro nos grupos experimentais após 21 dias de REP.....24

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAE *American Association of Endodontists*

CEUA Comissão de Ética no Uso de Animais

EDTA Ácido etilenodiaminotetracético

F18 Biovidro F18

F18Co Biovidro F18 dopado com cobalto

H&E Hematoxilina e eosina

OCN osteocalcina

PBS Solução salina tampão fosfato, do inglês *phosphate buffered saline*

PCNA antígeno nuclear de proliferação celular, do inglês *proliferating cell nuclear antigen*

pH Potencial hidrogeniônico

PSR Picrosírius red

REP procedimento endodôntico regenerativo, do inglês *regenerative endodontic procedure*

SBCAL Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SS solução salina

TM Tricômio de Masson

SUMÁRIO

1.	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	12
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	Objetivo geral.....	16
2.2.	Objetivo específico.....	16
3.	METODOLOGIA EXPANDIDA	17
3.1.	Síntese das partículas vítreas.....	17
3.2.	Preparo da solução irrigadora de F18-Co.....	17
3.3.	Drogas empregadas.....	17
3.4.	Animais.....	17
3.5.	Divisão dos grupos.....	18
3.6.	Procedimentos operatórios.....	19
3.7.	Eutanásia e processamento laboratorial.....	22
3.8.	Formas de análise dos resultados.....	22
3.8.1.	Análises histológicas	22
3.8.2.	Análise das fibras colágenas.....	24
3.8.3.	Técnica da Imunohistoquímica.....	24
3.9.	Análise estatística.....	25
4	ARTIGO	27
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
	REFERÊNCIAS.....	52
	ANEXO A - Parecer da Comissão de Ética no Uso de	56
	Animais.....	

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A polpa dentária é constituída de tecido conjuntivo frouxo, sendo composta, principalmente, pelas seguintes células: odontoblastos, fibroblastos, células-tronco mesenquimais indiferenciadas, macrófagos, e outras células imunocompetentes (LAMBRICHTS *et al.*, 2017; XIE *et al.*, 2021). Em condições normais, a polpa é um tecido livre de contaminação, que tem função defensiva, nutritiva e formativa. Entretanto, a presença de cárie e trauma dentário pode induzir a ocorrência de um processo inflamatório, que se não tratado, pode resultar em uma necrose tecidual. Nestes casos, dependendo da condição pulpar e do grau de desenvolvimento radicular, o tratamento endodôntico convencional é desafiador, pela possibilidade de extravasamento do material obturador devido ao formato divergente do canal radicular e ausência de constrição apical (ANDREASEN; KAHLER, 2015; KIM *et al.*, 2018). Ainda, estes dentes apresentam maior risco à fratura radicular, pela presença de paredes dentinárias finas e frágeis (KIM *et al.*, 2018; ROMBOUTS *et al.*, 2017). Um dos tratamentos propostos é a apexificação utilizando plug apical com materiais reparadores biocerâmicos, mas esse tratamento não permite o desenvolvimento contínuo da raiz (DING *et al.*, 2009; ANDREASEN; KAHLER, 2015; LOPES *et al.*, 2021). Portanto, o procedimento endodôntico regenerativo (REP, do inglês *regenerative endodontic procedure*) tem sido uma abordagem promissora para dentes imaturos necróticos com desenvolvimento radicular incompleto, a fim de permitir o desenvolvimento contínuo da raiz e a neoformação de tecidos (KHARCHI; TAGIYEVA-MILNE; KANAGASINGAM, 2020; LOPES *et al.*, 2021).

De acordo com Murray *et al.* (2007), REP pode ser definido como um conjunto de procedimentos baseados biologicamente para substituir estruturas danificadas, incluindo o complexo dentino-pulpar. REP se baseia nos princípios da engenharia tecidual, a partir de células-tronco, *scaffold* biomimético, e liberação de fatores de crescimento a partir de uma dentina condicionada (KIM *et al.*, 2018).

Em relação ao protocolo de irrigação utilizado em REP, as diretrizes clínicas atuais AAE (2018); Galler *et al.* (2016); Kim *et al.* (2018) recomendam o uso de hipoclorito de sódio (NaOCl) até 3%, devido ao seu elevado potencial antimicrobiano e ação solvente de tecido, seguido de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) a 17%,

para favorecer a liberação de fatores de crescimento da dentina condicionada (REIS-PRADO *et al.*, 2022; 2023). Em estudos *in vivo* recentes do nosso grupo de pesquisa, a irrigação com EDTA 17% após NaOCl 2,5% levou a uma maior neoformação tecidual e liberação dos fatores de crescimento transformador (TGF)- β 1 e endotelial vascular (VEGF) na terapia regenerativa (REIS-PRADO *et al.*, 2023). No entanto, os efeitos deste protocolo de irrigação na proliferação e diferenciação de células-tronco mesenquimais permanecem controversos conforme afirmam Aksel *et al.* (2020); Deniz Sungur *et al.* (2019), pois tanto o NaOCl quanto o EDTA têm sido demonstrados como influenciadores das propriedades e comportamento das células-tronco em diferentes estudos (AKSEL *et al.*, 2020; DENIZ-SUNGUR *et al.*, 2019; LI *et al.*, 2022). Foi mostrado que concentrações mais baixas de NaOCl promoveram a sobrevivência celular e a diferenciação em células odontoblásticas, enquanto concentrações mais altas foram citotóxicas (MARTIN *et al.*, 2014). Portanto, o uso de EDTA é importante para minimizar a citotoxicidade do NaOCl e aumentar a liberação de moléculas bioativas da dentina, mas pode ter algum impacto negativo na viabilidade, segundo Aksel *et al.* (2020) e na migração celular (DENIZ-SUNGUR *et al.*, 2019). Assim, destaca-se a necessidade do estudo de soluções que mostrem resultados favoráveis para regeneração tecidual no interior dos canais radiculares (DIOGENES *et al.*, 2014).

Em 1969, Hench e colaboradores desenvolveram os vidros bioativos (ou biovidros), materiais que possuem interatividade com o tecido mineralizado, estimulam a diferenciação celular e a angiogênese (HENCH; ANDERSSON, 1991; HENCH, 2006; GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2020). De acordo com estudos *in vitro* e *in vivo*, os biovidros tem apresentado alta atividade osteoindutiva e osteocondutora (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2020).

Em relação a composição, os biovidros apresentam dióxido de silício, aproximadamente 45%, que demonstrou estimular a osteogênese (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2020). Além disso, as reações na superfície do biovidro induzem a liberação de concentrações de íons solúveis, em uma reação denominada de lixiviação (que faz parte do seu mecanismo de ação), como por exemplo, cálcio e fósforo, que mostraram respostas intracelulares e extracelulares favoráveis, promovendo a formação óssea (XYNOS *et al.*, 2001; GORUSTOVICH; ROETHER; BOCCACCINI, 2010).

Posteriormente, os pesquisadores Souza; Zanoto, (2015) do Laboratório de Materiais Vítreos (LaMaV, UFSCar, São Carlos, Brasil) desenvolveram uma

composição de biovidro altamente reativa, denominado F18, que combina maleabilidade com alta bioatividade, aumentando seu potencial de aplicabilidade clínica (GABBAI-ARMELIN *et al.*, 2015). Anteriormente, o F18 apresentou resultados satisfatórios quando utilizado como forma de pasta em comparação à pasta de hidróxido de cálcio, apresentando biocompatibilidade e maior potencial para biomineralização (LOPES *et al.*, 2020). Ainda, F18 promoveu a remineralização de túbulos dentinários expostos durante o tratamento da hipersensibilidade dentinária (REIS *et al.*, 2021). Por conseguinte, F18 utilizados tanto na forma de pó, como em fibras, também demonstrou poder antimicrobiano contra cepas gram-positivas e gram-negativas clinicamente relevantes, como a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa* (SOUSA *et al.*, 2017a), e estimulou fibroblastos a secretarem fatores de crescimento angiogênicos (LAIA *et al.*, 2020).

Os biovidros possuem maleabilidade para incorporar íons em sua composição. Assim, quando se deseja exacerbar alguma propriedade do biovidro, tem-se a opção de dopá-lo com algum íon desejado. A incorporação de íons cobalto (Co) na composição de biovidros melhorou o potencial angiogênico *in vitro* destes, e proporcionou aumento da expressão de VEGF (AZEVEDO *et al.*, 2015; DZIADEK *et al.*, 2018; LAIA *et al.*, 2020). Assim, neste estudo, propomos avaliar o biovidro F18 dopado com cobalto, aproveitando a maleabilidade da incorporação de íons neste material.

No contexto de formação tecidual, o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA, do inglês *proliferating cell nuclear antigen*) é um marcador de proliferação celular detectável durante a síntese de DNA ou divisão celular, o que pode ajudar a identificar tecido recém-formado ou em formação (BENETTI *et al.*, 2017; CAPPELLO *et al.*, 2006; SUZUKI *et al.*, 2005). Em relação à formação de tecido mineralizado, a osteocalcina (OCN) está envolvida na formação de dentina e osso, pois é uma proteína da linhagem dos osteoblastos observada também nos odontoblastos envolvidos na formação de dentina terciária (BENETTI *et al.*, 2019a; HIRATA *et al.*, 2005). Em REP, o objetivo é promover a formação de tecido recém-formado mineralizado nas paredes radiculares, e a OCN pode ajudar nesta avaliação.

Sumariamente, o pó de biovidro possui propriedades capazes de sugerir seu uso em Endodontia, podendo compor medicação intracanal ou soluções irrigadoras. Assim, neste trabalho propusemos avaliar os efeitos de solução experimental

preparada a partir do biovidro F18 dopado com cobalto (F18Co) no procedimento endodôntico regenerativo, buscando por uma solução irrigadora que induza a formação tecidual.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar a influência do uso de solução irrigadora preparada a partir do pó do biovidro F18 dopado com íons cobalto (F18Co), como irrigação final no procedimento endodôntico regenerativo (REP).

2.2. Objetivos específicos

Analisar a influência da irrigação final com solução de F18Co na:

- presença de tecido neoformado no interior dos canais radiculares, e neoformação de tecido mineralizado, após REP, através da coloração hematoxilina-eosina (H&E);
- maturação colágena no tecido neoformado no interior do canal radicular, por meio da coloração de Tricrômio de Masson (TM) e de Pricosírius Red (PSR);
- proliferação celular no tecido neoformado no interior do canal radicular, através da imunomarcação de PCNA, e na indução à mineralização, através da imunomarcação de OCN.

3 METODOLOGIA EXPANDIDA

3.1. Síntese das partículas vítreas

A fusão do biovidro F18 conforme descrita por Souza; Peitl; Zanotto (2015) foi realizada em forno elétrico a 1200 °C/4 h, utilizando cadinho de platina. Dentre os reagentes utilizados para a síntese do material, estão carbonato de sódio, de potássio, e de cálcio, pentóxido de fósforo, óxido de magnésio e de zinco, e dióxido de silício, como descrito anteriormente (SOUZA *et al.*, 2015). Os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Inc, St Louis, MO) e Santa Rosa LTDA (GO, Brasil). Anteriormente à fusão, os reagentes foram homogeneizados em girador de jarros (12 h). O vidro foi vertido em água para obter frita, que foi seca em estufa (100 °C, 24 h), e submetida à moagem em moinho planetário (500 rpm) por tempos variáveis (5-30 min), para a moagem inicial. Então, o F18 foi dopado com Cobalto (óxido de cobalto 10% (SOUZA *et al.*, 2017a; 2017b), para a obtenção das partículas de F18Co. A frita foi novamente confeccionada, e as etapas de moagem foram repetidas, até o peneiramento para obtenção de partículas menores que 25 µm.

3.2. Preparo da solução irrigadora de F18-Co

A solução irrigadora experimental à base de F18Co foi preparada a partir da mistura do pó do biomaterial com água destilada, ambos pesados e preparados na proporção de 1:5 de pó para água. A água e o pó foram misturados 24 h antes dos procedimentos operatórios, e a solução suspensa foi utilizada.

3.3. Drogas empregadas:

Para a anestesia dos animais, foi utilizado, via intraperitoneal, anestésico à base de cloridrato de Cetamina 10% (80 mg/kg; Dopalen, Vetbrands – Divisão de Saúde Animal, Jacareí, SP, Brasil) e sedativo à base de cloridrato de Xilazina 2% (15 mg/kg; Anasedan, Agribands do Brasil Ltda., Paulínia, SP, Brasil).

3.4. Animais

Foram utilizados 12 ratos machos (*Rattus albinus*, Wistar) pesando aproximadamente 80 g, com idade média de 4 semanas, provenientes do Biotério Central da UFMG. O cálculo amostral ($n = 6$) foi baseado em dados obtidos de estudo anterior (SCARPARO *et al.*, 2014). O cálculo foi realizado com dados da inflamação periapical dos grupos experimentais após REP em molares de ratos, utilizando o programa estatístico SigmaPlot (12.0; Systat Software Inc.). Considerando poder de amostra de 95% e erro alfa de 0,05, o tamanho da amostra foi de 5 molares por grupo. Mas de acordo com o potencial de mortalidade destes animais, foi acrescentado um animal a mais por grupo, resultando em $n = 6$ animais/grupo, assim como em estudos prévios (BRACKS *et al.*, 2019; REIS-PRADO *et al.*, 2023; SCARPARO *et al.*, 2014).

Os procedimentos experimentais respeitaram os princípios éticos na experimentação animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL), e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFMG (94/2021 - ANEXO A). Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas, com 4 animais por gaiola, em ambiente com temperatura entre 22 e 24°C, com ciclo de luz controlada (12 horas claro e 12 horas escuro) e com ração e água filtrada *ad libitum*. Foi feita a higienização periódica do ambiente, com troca e higienização dos comedouros e bebedouros.

3.5. Divisão dos grupos

A divisão dos grupos e os procedimentos realizados podem ser visualizados na Tabela 1. Os primeiros molares imaturos superiores dos lados esquerdo ou direito dos 12 ratos, tiveram as polpas dentárias expostas, removidas, receberam irrigação com NaOCl 2,5% seguido de EDTA 17% (REIS-PRADO *et al.*, 2023). Então, foram divididos, aleatoriamente em grupos: REP-SS e REP-F18Co, onde receberam irrigação final com solução salina (SS) ou com solução do biovidro F18Co, respectivamente. Molares superiores que não receberam intervenção destes animais, foram aleatoriamente selecionados como controle ($n = 3$; REIS-PRADO *et al.*, 2023).

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

Grupos	Tratamentos			
	Pulpectomia	Protocolo de irrigação	REP	Eutanásia
REP-SS (n = 6)	Remoção do tecido pulpar da raiz mesial	NaOCl 2,5% (5 min), EDTA 17% (5 min), soro fisiológico (5 min)	Indução de sangramento intracanal e selamento da cavidade	21 dias
REP-F18Co (n = 6)	Remoção do tecido pulpar da raiz mesial	NaOCl 2,5% (5 min), EDTA 17% (5 min), F18Co (5 min)	Indução de sangramento intracanal e selamento da cavidade	21 dias
Controle (n = 3)	-----	-----	-----	21 dias

REP: procedimento endodôntico regenerativo; SS: solução salina; NaOCl: hipoclorito de sódio; EDTA: ácido etilenodiaminotetraacético; F18Co: biovidro F18 dopado com cobalto.
Fonte: elaborado pela autora, 2023.

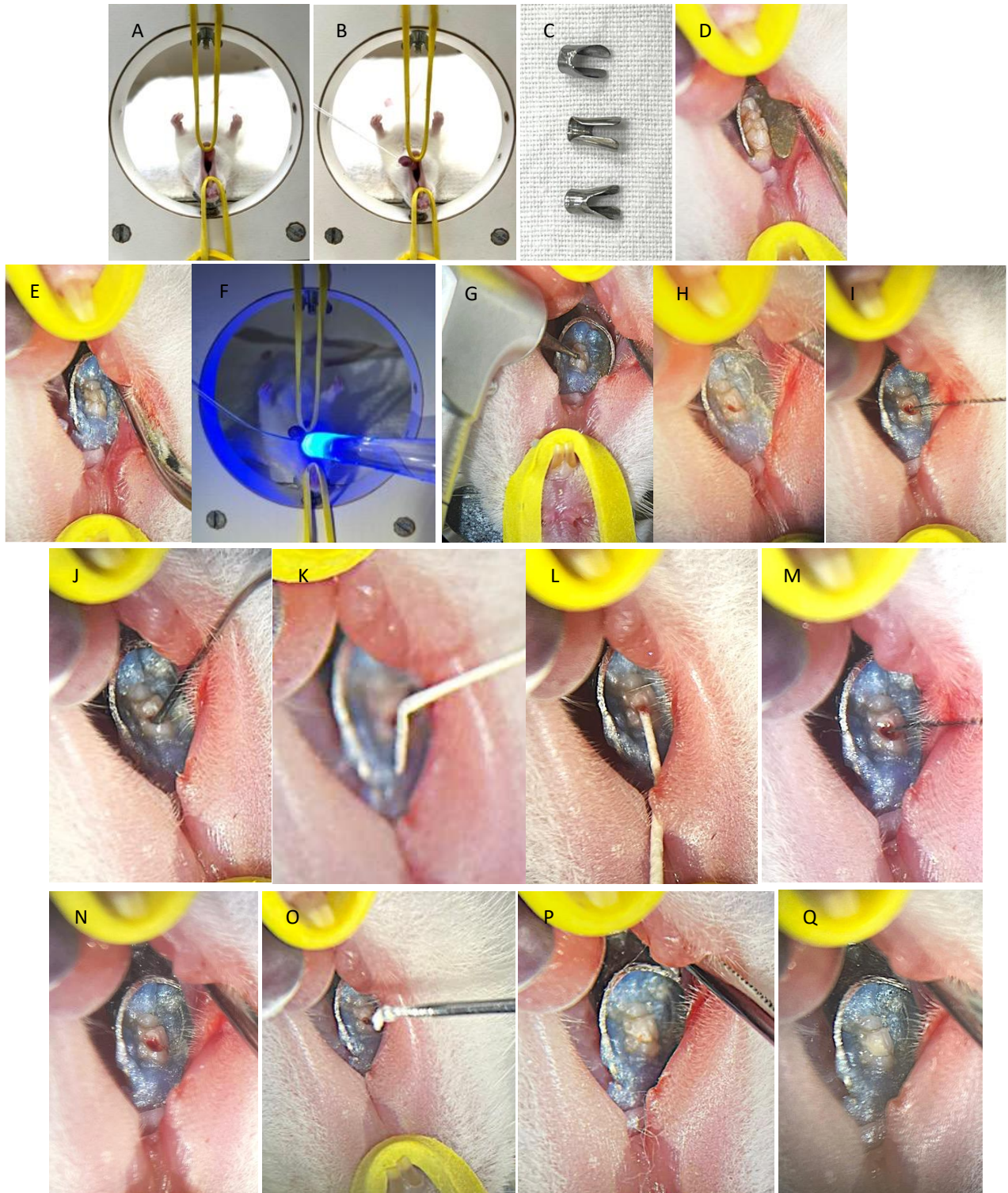
3.6. Procedimentos operatórios

Todos os procedimentos experimentais foram realizados em bancada de laboratório (Figura 1) com materiais esterilizados e auxílio de um microscópio operatório (Alliance, São Paulo, SP, Brasil), com aumento de 24× (BRACKS *et al.*, 2019). Após a anestesia dos animais, os primeiros molares superiores imaturos foram isolados com o auxílio de grampos especiais e barreira gengival (Top Dam, FGM, Joinville, SC, Brasil) (Figura 1). O campo operatório foi descontaminado com NaOCl 2,5%, para realização dos tratamentos de acordo com cada grupo. Os princípios clínicos de antissepsia do canal radicular foram baseados nos protocolos sugeridos pela AAE (2018) e Shimizu *et al.* (2013). Foi realizada a abertura coronária dos molares com brocas esféricas LN (diâmetro 0,06) estéreis (Dentisply Maillefer, Tulsa, OK, USA) em baixa rotação acopladas em um motor elétrico com velocidade

controlada (Beltec, Araraquara, SP, Brasil), e sob irrigação constante com soro fisiológico. Após a exposição do canal mesial, foi realizada a pulpectomia com lima endodôntica tipo K #10 (Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland), no comprimento de trabalho (CT). O CT foi definido previamente por meio de exame radiográfico de lima introduzida no canal mesial de molares superiores imaturos de rato com mesma idade e peso em estudo piloto, identificando CT = 4 mm, como em estudo prévio (REIS-PRADO *et al.*, 2023).

Após remoção do tecido pulpar, os canais foram irrigados com solução de soro fisiológico para remoção de restos de remanescentes pulpares e secos com pontas de papel absorvente. Em seguida, os canais mesiais foram cuidadosamente irrigados com 0,01 mL/min de NaOCl 2,5%, por 5 min, e com 0,01 mL/min de EDTA 17%, por 5 min. Após, o protocolo de irrigação final foi realizado de acordo com o grupo experimental: REP-SF, recebeu irrigação final com soro fisiológico 0,9%, por 5 min (0,01 mL/min); e REP-F18Co, recebeu irrigação final com solução de F18Co, por 5 min (0,01 mL/min). Posteriormente, os canais foram secos com pontas de papel absorvente estéril, e uma lima 10 K estéril foi inserida 0,5 mm além do ápice para induzir sangramento e formação de coágulo sanguíneo dentro do canal mesial (BRACKS *et al.*, 2019; REIS-PRADO *et al.*, 2023). Os dentes foram selados com material reparador PBS CIMMO HP (CIMMO, Pouso Alegre, MG, Brasil), seguido de cimento de ionômero de vidro fotoativado (GC America Inc., Alsip, IL, EUA). Foi aplicada dipirona sódica (150 mg/Kg) nos animais, via subcutânea, para a analgesia pós-cirúrgica.

Figura 1. Imagens representativas da sequência do procedimento operatório de REP nos molares superiores.



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

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

3.7. 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 3 meses. Posteriormente, foram lavadas em água corrente, desidratadas em álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina. A orientação no momento da inclusão permitiu a realização de cortes teciduais dos molares superiores e estruturas de suporte em seu sentido longitudinal, de vestibular para lingual. Após inclusão, as peças foram cortadas com cortes semi-seriados, com 4 µm de espessura, realizados em micrótomo (Leica - RM 2045, Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Alemanha). Para fins de padronização, o corte foi selecionado quando a raiz mesial possa ser visualizada em seu sentido longitudinal pleno.

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

3.8. Forma de análise dos resultados

3.8.1. Análises histológicas

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

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

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

Escores para cada parâmetro

Formação de tecido mineralizado nas paredes dos canais radiculares

- 0 = ausente
- 1 = aumento apenas em comprimento ou apenas em espessura
- 2 = aumento em comprimento e espessura

Presença de tecido mole neoformado no interior do canal radicular

- 0 = ausente
- 1 = presente no terço apical
- 2 = presente até o terço médio
- 3 = presente até o terço cervical

Fonte: Elaborada pela autora, 2023.

3.8.2. Análise das fibras colágenas

Os níveis de maturação das fibras colágenas foram analisados em lâminas histológicas coradas com PSR sob microscopia de luz polarizada. O programa AxioVision Rel 4.8.2 foi utilizado (400×, AxioLab A1 Plus - Carl Zeiss, Jena, Turíngia, Alemanha), permitindo a seleção de cores correspondentes para cada tipo de fibra de colágeno no tecido pulpar. Após a seleção da cor, o programa calculou automaticamente a área marcada de cada tipo de fibra colágena. As fibras amarelas-esverdeadas são consideradas imaturas e finas, enquanto as fibras amarelas-avermelhadas são consideradas maduras e grossas (CINTRA *et al.*, 2017). Os dados foram avaliados por um único operador, calibrado e cego. Lâminas coradas com TM foram utilizadas para avaliação descritiva da presença de colágeno (CINTRA *et al.*, 2017).

3.8.3. Análise imunohistoquímica

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

Lâminas histológicas contendo amostras de todos os grupos experimentais foram submetidas à incubação com os anticorpos primários: anti-PCNA e anti-OCN (do rato gerado em coelho, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Os anticorpos primários foram diluídos em PBS acrescido de 0,1% Triton X-100 (PBS-TX), durante 24 horas, em câmara úmida. Nas etapas subsequentes se empregou o Universal Dako Labeled (HRP) Streptavidin-Biotin Kit® (Dako Laboratories, CA, USA). Após lavagens, as secções histológicas foram incubadas no anticorpo secundário biotinilado, durante

2 horas, lavadas, e tratadas com estreptavidina conjugada com a peroxidase da raiz forte (HRP), por 1 hora. Depois de três lavagens em PBS-TX se procedeu a revelação utilizando-se como cromógeno o 3,3'- tetracloridrato de diaminobenzidina (DAB chromogen Kit®, Dako Laboratories, CA, USA). Ao término de uma série de lavagens em PBS, os cortes histológicos foram contracolorados com *Fastgreen* (para as lâminas de PCNA), ou Hematoxilina de Harris (para as lâminas de OCN). Como controle negativo, os espécimes foram submetidos aos procedimentos descritos anteriormente suprimindo-se a utilização do anticorpo primário.

As secções histológicas foram analisadas sob iluminação de campo claro em microscópio óptico (Optiphot-2, Nikon, Japão) por um investigador que desconheceu os grupos experimentais que estiverem sendo analisados. Para PCNA, a imunomarcagem foi definida como aquela de coloração acastanhada presente no núcleo celular. Em cada espécime, foi analisado todo o terço apical do tecido neoformado no interior dos canais radiculares, em aumento de 400x. Uma análise quantitativa foi efetuada, onde as células foram contadas e os resultados foram expressos em quantidade de células imunomarcadas por mm² (BENETTI *et al.*, 2017; 2019a; 2019b). Para OCN, a imunomarcagem foi definida como a coloração acastanhada presente no citoplasma das células e na matriz extracelular. Como ambas imunomarcações nas células e na matriz extracelular são importantes para este marcador, uma análise semi-quantitativa foi realizada através de escores (BENETTI *et al.*, 2017, 2019a). Os escores utilizados foram (BENETTI *et al.*, 2019a; 2019b): 0 – ausência de imunomarcagem (completa ausência de células imunorreativas); 1 – leve padrão de imunomarcagem (aproximadamente um quarto das células imunorreativas); 2 – moderado padrão de imunomarcagem (aproximadamente metade das células imunorreativas); 3 – alto padrão de imunomarcagem (aproximadamente três quartos das células imunorreativas); 4 – extremamente alto padrão de imunomarcagem (praticamente todas as células imunorreativas).

3.9. Análise estatística

Os dados foram analisados por meio do teste U de Mann-Whitney ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), para avaliar os seguintes desfechos:

- Presença de tecido mineralizado nas paredes dos canais radiculares e de tecido mole neoformado, que foram mensurados por meio de escores;
- Fibras colágenas maduras e imaturas, que foram avaliadas de acordo com as porcentagens;
- Quantidade de células positivas para PCNA por mm²;
- Imunomarcação de OCN, mensurada por meio dos escores.

4 ARTIGO

O artigo *“Final irrigation with bioglass solution in regenerative endodontic procedure induces tissue formation inside the root canals, collagen maturation, cell proliferation and presence of osteocalcin”* foi submetido ao periódico *International Endodontic Journal* (Qualis A1, Fator de Impacto = 5,0).

Final irrigation with bioglass solution in regenerative endodontic procedure induces tissue formation inside the root canals, collagen maturation, proliferation cell and presence of osteocalcin

Abstract

Aim To evaluate the influence of an experimental solution of cobalt-doped F18 bioactive glass (F18Co) on tissue repair following regenerative endodontic procedure (REP) in rat molars.

Methodology The F18Co solution was prepared at a ratio of 1:5 F18Co powder to distilled water. The right or left upper first molars of 12 Wistar rats were used, where the pulps were exposed, removed, and irrigated with 2.5% sodium hypochlorite (NaOCl), followed by 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (5 min each). Subsequently, the molars were divided into two groups ($n = 6$): REP-SS and REP-F18Co, where they received a final irrigation (5 min) with saline solution (SS) or F18Co solution, respectively. Then, intracanal bleeding was induced, and the tooth was sealed. Untreated molars were used as controls ($n = 3$). At 21 days, the rats were euthanized, and the specimens were processed for analysis of mineralized tissue and soft tissue formation inside the root canal using haematoxylin-eosin. The presence and maturation of collagen was evaluated by Masson's trichrome and picosirius red staining. Immunolabeling analyses of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and osteocalcin (OCN) were performed. The data were submitted to the Mann-Whitney U-test ($P < 0.05$).

Results There was similar formation of mineralized tissue in thickness and length in REP-SS and REP-F18Co groups ($P > 0.05$). Regarding the presence of newly formed soft tissue, most specimens of the REP-F18Co had tissue formation up to the cervical third of the canal, while the REP-SS specimens showed formation up to the middle third ($P < 0.05$), and there was higher maturation collagen in REP-F18Co ($P < 0.05$). The number of PCNA-positive cells found in the apical third of the root canal was significantly higher in the F18Co group, as well as the OCN immunolabeling, which was severe in most specimens of REP-F18Co, and low in most specimens of REP-SS.

Conclusion The final irrigation with F18Co bioactive glass solution in REP did not influence mineralized tissue formation but induced soft tissue formation inside the root canals, with higher collagen maturation, and an increase in PCNA-positive cells and OCN immunolabeling.

Introduction

Conventional endodontic therapy in immature permanent teeth with pulp necrosis is still considered a challenge, since there are thin and fragile dentin walls, which may lead to root fracture, in addition to the possibility of overflow of filling materials due to open apex (Diogenes et al., 2014; Kim et al., 2018). One of the proposed treatments is the apexification using repair materials, but this treatment does not allow continued root development (Ding et al., 2009; Andreasen & Kahler, 2015; Lopes et al., 2021). Therefore, regenerative endodontic procedure (REP) has been a promising approach for necrotic immature teeth with incomplete root development to allow the continued root development and tissue neoformation (Kharchi et al., 2020; Lopes et al., 2021).

According to Murray (2007), REP can be defined as biologically based procedures designed to replace damaged structures, including dentin and root structures, as well as cells of the pulp-dentin complex. REP relies on the principles of tissue engineering, such as stem cells, biomimetic scaffolding, and growth factors release from conditioned dentine (Kim et al., 2018). Regarding the irrigation protocol used in REP, the current clinical guidelines (Galler et al., 2016; AAE, 2018) recommend the use of sodium hypochlorite (NaOCl) up to 3%, due to its excellent antimicrobial and solubilisation effects, followed by 17% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) in order to favour the release of growth factors from the conditioned dentine (Reis-Prado et al., 2022; 2023). However, the effects of this irrigating protocol on the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells remain controversial (Deniz Sungur et al., 2019; Aksel et al., 2020), because both NaOCl and EDTA have been shown to influence the properties and behavior of stem cells in different studies (Deniz-Sungur et al., 2019; Aksel et al., 2020; Li et al., 2022). Lower concentrations of NaOCl promoted cell survival and differentiation towards odontoblastic cells, while higher concentrations were cytotoxic (Martin et al., 2014). Therefore, the use of EDTA is important to minimize the cytotoxicity of NaOCl and enhance the release of bioactive molecules from dentin, but it may have some negative impact on cell viability (Aksel et al., 2020) and cell migration (Deniz-Sungur et al., 2019).

The bioglasses have been widely investigated in Endodontics due its high osteoinductive and osteoconductive activity (Gabbai-Armelin et al., 2015; de Araújo-Lopes et al., 2020; Cardoso et al., 2022), in addition to enhancing cell differentiation and angiogenesis *in vitro* (Hench, 2006; Zhang et al., 2015). A highly reactive bioglass

composition named F18 was developed and combines malleability with high bioactivity, increasing its potential for clinical applications (Gabbai-Armelin et al., 2015; Souza et al., 2015). Previously, paste of F18 showed satisfactory results as were biocompatible and stimulated biomineralization when compared to calcium hydroxide paste (de Araújo-Lopes et al., 2020), in addition to promoting remineralization of exposed dentinal tubules during the treatment of dentin hypersensitivity (Reis et al., 2021), and stimulate fibroblasts to secrete angiogenic growth factors (de Laia et al., 2020). Considering the hard tissue formation induction, antibacterial and angiogenic properties of this bioglass, there may be some benefit using a solution from this biomaterial as a final irrigation in REP.

The incorporation of cobalt (Co) ions in the bioglasses composition has been demonstrated (Azevedo et al., 2015; de Laia et al., 2020). The major advantage of doping a bioactive glass with ions such as cobalt is that these ions are gradually released as the bioactive glass degrades (Azevedo et al., 2015). Cobalt ions incorporated into the bioactive glass has been shown to enhance the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), which is important for angiogenic processes (Dziadek et al., 2018; de Laia et al., 2020). Thus, in this study, we propose to evaluate cobalt-doped bioglass, taking advantage of the malleability of ion incorporation in bioglasses.

In the context of tissue formation, the proliferation of cell nuclear antigen (PCNA) is a marker of cell proliferation detectable during the DNA synthesis or cell division (Suzuki et al., 2005; Cappello et al., 2006), which can help identify newly formed or forming tissue (Benetti et al., 2017). Regarding hard tissue formation, the osteocalcin (OCN) is a protein involved in dentine and bone formation, as it is a protein of the osteoblast lineage that is observed also in odontoblasts involved in the formation of tertiary dentine (Hirata et al., 2005; Benetti et al., 2019). In REP, the goal is to promote the formation of newly formed mineralized tissue in root walls and OCN can help in this evaluation. Hence, this study aimed to evaluate the influence of final irrigation with F18Co solution in immature molars of rats submitted to REP. The null hypothesis tested was that there are no differences in the histological findings, or in presence of PCNA-positive cells and OCN, after REP with or without F18Co solution.

Material and Methods

Synthesis of bioglass particles

The melting of F18 bioglass (Souza et al., 2015) was made in an electric furnace at 1200 °C/4 h, using a platinum crucible. Among the reagents used for the synthesis of the material, there will be sodium carbonate (Na_2CO_3), potassium (K_2CO_3), and calcium (CaCO_3), phosphorus pentoxide (P_2O_5), magnesium oxide (MgO) and zinc (ZnO), and silicon dioxide (SiO_2), as previously described (Souza et al., 2015). The reagents were purchased from Sigma-Aldrich (Inc, St Louis, MO) and Santa Rosa LTDA (GO, Brasil). Before melting, the reagents were homogenized in a jar mill (12 h). The glass was poured into water to obtain glass frit, which was dried in an oven (100 °C/24 h) and subjected to grinding in a planetary ball mill (500 rpm) for variable times (5-30 min), for the initial grinding. Then, F18 glass was doped with cobalt oxide (CoO , 1wt.%) (Souza et al., 2017a; 2017b). Afterwards, the bioglass went through milling and sieving steps to obtain particles smaller than 25 μm .

Preparation of solutions

Experimental solution based on F18Co was produced by mixing the powder of material with distilled water, both weighed and prepared in a 1:5 ratio of powder for water.

Animals

The manuscript of this animal study has been written according to Preferred Reporting Items for Animal studies in Endodontology (PRIASE) 2021 guidelines (Nagendrababu et al., 2021; doi: 10.1111/iej.13477; Figure 1).

A total of 12 4-week-old male Wistar albino rats (weighing approximately 80 g) were used. The sample size was based on data of previous study (Scarpato 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 (Scarpato et al., 2014; Bracks et al., 2019; Reis-Prado et al., 2023). 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 feed. The study was approved by the local Animal Research

Ethics Committee (CEUA 94/2021) and conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the National Institutes of Health (Bethesda, MD, USA).



Figure 1. Study's design flowchart.

REP procedure

The animals were anaesthetised via intramuscular injection using ketamine 10% (80 mg/Kg; Ketamina Agener 10%, União Química Farmacêutica Nacional S/A, Embu-Guaçu, São Paulo, Brazil) and xylazine 2% (15 mg/Kg; Xilazin, Syntec do Brasil LTDA, Cotia, São Paulo, Brazil). The upper left or right first immature molars of the animals were used, and the protocol operative was based on a previous study (Reis-Prado et al., 2023). The teeth were isolated with special dental clamp that was sealed gingival barrier (Top dam, FGM, Joinville, SC, Brazil), preventing any contact with saliva. Then, endodontic access in mesial root canal was carefully performed with a sterile long neck (LN) round bur with diameter of 0.06 mm (Dentsply Maillefer, Tulsa, OK, USA) in low speed coupled to an electric motor (Beltec, Araraquara, SP, Brazil) and under constant irrigation with saline solution. Operative procedures were performed using an operating microscope (24× magnification; Alliance, São Paulo, SP, Brazil). After exposing the dental pulp, the pulpectomy on the mesial root canal was performed using size 10 K-files (Dentsply Sirona, Ballaigues, Switzerland). The working length was defined using upper molar of one animal of same age, when after endodontic access, a radiograph was taken with size 10 K-file introduced in mesial canal of the first molars on both sides, and a root canal length of 4 mm was registered, similar to previous study (Reis-Prado et al., 2023). Then, after pulpectomy, mesial canal was carefully and gently irrigated with 0.1 mL/min 2.5% NaOCl for 5 min, followed by 17% EDTA, also for 5 min.

After, the final irrigation protocol was performed according to the experimental groups: REP-SS group - the mesial canals were irrigated with saline solution, for 5 min (0.1 mL/min); and REP-F18Co group - the mesial canals were irrigated with F18Co solution, for 5 min (0.1 mL/min). Subsequently, the canals were dried with sterile absorbent paper points. Intracanal bleeding 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 (Bracks et al., 2019). PBS CIMMO HP (CIMMO, Pouso Alegre, MG, Brazil) repair material was placed for coronal barrier, and the cavities were sealed with resin-modified glass ionomer cement light-cured (GC America Inc., Alsip, IL, USA). For postoperative analgesia, the rats received one subcutaneous application of 150 mg/Kg of dipyrone (Neo Química; São Paulo, SP, Brazil). The untreated upper left or right first molars of rats from the experimental groups were randomly selected as control (n = 3) for histologic reference, and observation of physiologic root development.

Sample preparation and histological analysis

At twenty-one days after the REP, the rats were euthanised and the right and left jaws were separated, dissected, fixed in a solution of 4% buffered formaldehyde for 24 h. After, the pieces were decalcified in 10% EDTA solution for 45 days, when were then processed and embedded in paraffin. Serial histological sections (4 μ m) were cut in the mesiosagittal plane and were selected from the point where the mesial root of the first molar was seen in all its longitudinal extension. Then, the histological sections were selected for haematoxylin-eosin (H&E) staining, Masson's trichrome (MT), picrosirius red (PSR), and for immunohistochemical analysis (Benetti et al., 2017; 2019a; Reis-Prado et al., 2023).

The analyses were performed under light microscopy (400 $\times$ magnification; DM4000 B; Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) by a single calibrated and blinded operator to the experimental groups. The tissues were analysed and scored according to the histological parameters involving presence of mineralized tissue formed on the walls of the root canal (Zhang et al., 2014; Palma et al., 2017; Reis-Prado et al., 2023) and of newly intracanal connective tissue (Reis-Prado et al., 2023). These rated parameters were described in Table 1.

The collagen fibres maturation was analysed in the sections stained by PSR under polarized light microscopy. The images were obtained of the centre of the apical third of the root canal (400 $\times$ magnification; Leica QWin V3, Leica Microsystems; Reis-Prado et al., 2023), allowing the selection of corresponding colours for each type of collagen fibre. After colour selection, the program automatically calculated the marked area of each collagen fibre type inside the pulp chamber. Greenish-yellow fibres were classified as immature and thin, while yellowish-red fibres were considered mature and thick (Cintra et al. 2017; Benetti et al., 2020; Terayama et al., 2020).

Immunohistochemical analyses

The immunohistochemical assessments was performed using an indirect immunoperoxidase technique (Benetti et al., 2019a; 2019b) for PCNA and OCN. Histological sections were deparaffinized and hydrated. Antigen retrieval was performed by immersing the histological slides in buffer citrate solution (pH 6.0, Antigen Retrieval Buffer, Spring Bioscience Corporation, Pleasanton, CA, USA) in a pressurized chamber (Decloaking Chamber, Biocare Medical, Concord, CA, USA) at 95°C (10 min). The

slides were rinsed with phosphate-buffered saline at the end of each stage of the immunohistochemical reaction. The histological sections were immersed in 3% hydrogen peroxide solution (1h 20 min) and in 1% bovine serum albumin (12 h) to block the endogenous peroxidase activity and nonspecific sites, respectively. The histological slides were divided and incubated with one of the following primary antibodies: anti-PCNA and anti-OCN (rabbit primary antibodies, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), which were diluted (Antibody Diluent with Background Reducing Components, Dako Laboratories, Carpinteria, CA, USA) and placed in a moist chamber (24 h). Then, the histological sections were incubated with a biotinylated secondary antibody (1h 30 min) and treated with streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (1h 30 min) (Universal Dako Labelled Streptavidin-Biotin kit, Dako Laboratories, CA, USA). The reaction was then developed using the chromogen 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB Chromogen kit, Dako Laboratories) and counterstained with *fast green* (sections for PCNA immunolabeling) or Harris haematoxylin (sections for OCN immunolabeling). The negative controls were submitted to the procedures but without the primary antibodies.

For analyses, immunolabeling was evaluated in the apical third of the root canal (400× magnification). For PCNA analysis, cells that had a brown nucleus were counted and were analysed as the number of cells per mm² (Benetti et al., 2017; 2019a; 2019b). The immunolabeling of OCN was defined as the presence of a brownish colour in the cytoplasm of the cells and extracellular matrix. Because immunolabeling of both the cells and the extracellular matrix is of great importance for study, a semi-quantitative analysis was performed, which provides information on the numbers of immunolabelled cells and immunolabeling intensity of the extracellular matrix. The scores were assigned as follows (Ferreira et al., 2018; Benetti et al., 2019b): 0, immunolabeling missing (complete absence of immunoreactive cells); 1, low pattern of immunolabeling (approximately one-quarter of the immunoreactive cells); 2, moderate pattern of immunolabeling (approximately one-half of the immunoreactive cells); 3, severe pattern of immunolabeling (approximately three-quarters of the immunoreactive cells); and 4, very severe pattern of immunolabeling (approximately all immunoreactive cells).

Statistical analysis

The data were analysed using the Mann-Whitney U-test at the significance level of 5% ($P < 0.05$).

Results

Histologic findings

Representative images and data of the histological analysis and data can be seen in Figure 2 and Table 1, respectively. At 21 days of REP, the most specimens of REP-F18Co group had increase of mineralized tissue in length and thickness on the root canal wall, as well as half of the specimens of the REP-SS group; there was no significant difference between the groups ($P > 0.05$). Regarding parameter of newly formed soft tissue, most specimens of the REP-F18Co had tissue formation up to the cervical third of the canal, while the most specimens of REP-SS had tissue formation up to the middle third; there was a significant difference between the groups ($P < 0.05$).

Presence and maturation of collagen fibres

Representative images of the TM and PSR staining can be seen in Figure 2, and the results are shown in Table 2. The groups exhibited more mature collagen fibres in the apical third of root canal, but there were more mature collagen fibres in the REP-F18Co group compared to the REP-SS group ($P < 0.05$).

Analysis for the PCNA and OCN immunolabeling

Representative images of the PCNA and OCN can be seen in Figure 2, whereas the analysis for each marker is displayed in Table 3 and 4, respectively. Regarding PCNA analysis, the REP-F18Co group had a significantly higher amount of immunolabelled cells in the apical third of the newformed tissue inside the root canals, compared to the REP-SS group ($P < 0.05$). No PCNA-positive cells were found in the middle (both groups) and cervical (REP-F18Co group) thirds.

Immunolabelling of OCN was observed in the extracellular matrix and cytoplasm of cells present in the newformed tissue inside the root canals of both groups. Low immunolabeling of OCN was observed in the REP-SS group, while severe immunolabeling of OCN was observed in most specimens of REP-F18Co group ($P < 0.05$).

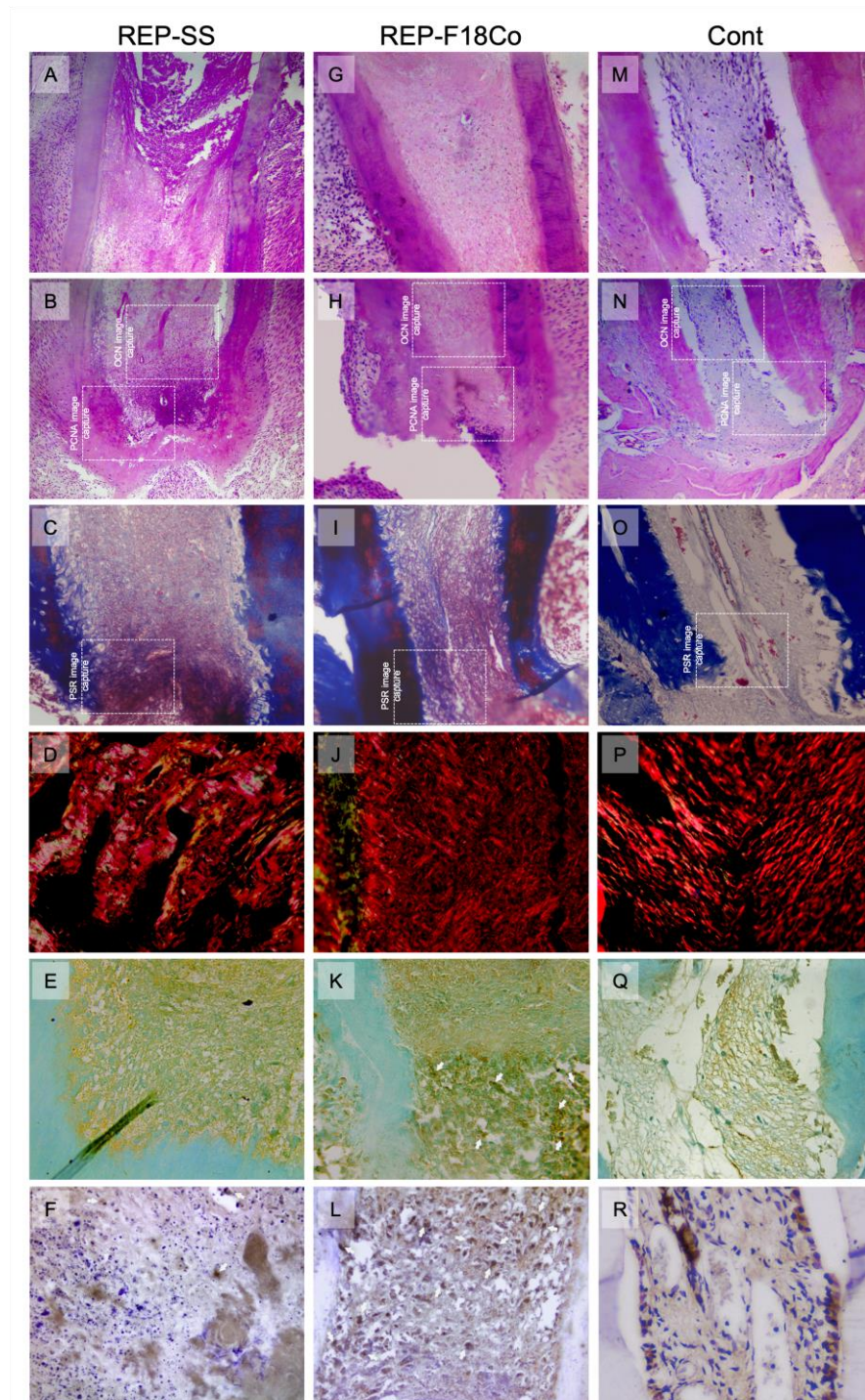


Figure 2. Representative images of histological analysis (A, B, G, H, M, N); collagen analysis by MT (C, I, O) and PSR (D, J, P) staining; PCNA (E, K, Q) and OCN (F, L, R) analysis. REP-SS group: image of the (A) cervical-middle thirds, showing tissue formation up middle third, and (B) apical third with newformed tissue, inflammatory infiltrate, and newly formed mineralized tissue; (C, D) panoramic microscopic view of the apical third of the root canal space showing a tissue with collagen maturation; (E) small number of PCNA-positive cells, and (F) low pattern of immunolabeling for OCN. REP-F18Co group: image of the (G) cervical-middle thirds, showing tissue formation up cervical third, and (H) apical third with newformed tissue, inflammatory infiltrate, and newly formed mineralized tissue; (I, J) images of apical third with collagen maturation; (K) higher number of PCNA-positive cells, and (L) severe pattern of OCN immunolabeling. Cont group: panoramic microscopic view of the (M) cervical-middle thirds and (N) apical third showing pulp tissue; (O, P) panoramic microscopic view of collagen of the apical third; immunolabeling of (Q) PCNA and (R) OCN. White arrows point to cells with brown nuclei, positive for PCNA, or with brownish cytoplasm, positive for

OCN. Dotted white squares indicate approximate magnification of captures for PSR, PCNA, and OCN analysis. [100×, H&E, MT staining; 400×, PSR staining, PCNA immunolabeling, OCN immunolabeling]

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-F18Co	REP-SS	
Mineralized tissue formed on the root canal wall			= 0.575
0 = absent	0/6	0/6	
1 = increase only in length or only in thickness	2/6	3/6	
2 = increase in length and thickness	4/6	3/6	
Presence of newly connective tissue on the root canal			= 0.006*
0 = absent	0/6	0/6	
1 = within the apical third	0/6	2/6	
2 = extending to the medium third	1/6	4/6	
3 = extending to the cervical third	5/6	0/6	

The symbol * indicates presence of significant difference between the groups ($P < 0.05$). The data were analyzed using the Mann–Whitney U-test.

REP: regenerative endodontic procedure; F18Co: cobalt-doped F18 bioglass; SS: saline solution.

Table 2 Percentages of immature and mature collagen fibres in the apical third of root

Groups	% collagen fibres $\pm$ SD [median (IQR: Q1; Q3)]	
	Immature	Mature
REP-F18Co	3.64 $\pm$ 2.19 [4.06 (1.08; 5.64)]	96.36 $\pm$ 2.189 [95.94 (94.36; 98.92)]
REP-SS	19.65 $\pm$ 14.86 [16.30 (11.13; 27.16)]	80.35 $\pm$ 14.86 [83.70 (72.84; 88.87)]
P-value*	0.015	0.015

canal according to the experimental groups

*The data were analysed using the Mann–Whitney U-test ($P < 0.05$).

Abbreviations: IQR, interquartile range; Q1, lower quartile (25%); Q3, upper quartile (75%); REP: regenerative endodontic procedure; F18Co: cobalt-doped F18 bioglass; SS: saline solution.

Table 3 Number of the PCNA-positive cells/mm² in the apical third of root canal

Groups	Number of cells $\pm$ SD [median (IQR: Q1; Q3)]
REP-F18Co	99.1 $\pm$ 40.3 [96.5 (61.3; 138.0)]
REP-SS	45.6 $\pm$ 31.9 [38.0 (21.5; 68.7)]
<i>P</i> -value*	0.041

according to the experimental groups

*The data were analysed using the Mann–Whitney U-test ($P < 0.05$).

Abbreviations: IQR, interquartile range; Q1, lower quartile (25%); Q3, upper quartile (75%); REP: regenerative endodontic procedure; F18Co: cobalt-doped F18 bioglass; SS: saline solution.

Table 4 OCN immunolabeling evaluation in experimental groups after 21 days of REP

Scores for OCN immunolabeling	Experimental groups (n = 6)		<i>P</i> -value
	REP-F18Co	REP-SS	
0 = immunolabeling missing (complete absence of immunoreactive cells)	0/6	0/6	
1 = low pattern of immunolabeling (approximately ¼ of the immunoreactive cells)	0/6	4/6	
2 = moderate pattern of immunolabeling (approximately ½ of the immunoreactive cells)	2/6	2/6	0.009
3 = severe pattern of immunolabeling (approximately ¾ of the immunoreactive cells)	4/6	0/6	
4 = very severe pattern of immunolabeling (approximately all immunoreactive cells)	0/6	0/6	

*The data were analyzed using the Mann–Whitney U-test ($P < 0.05$).

REP: regenerative endodontic procedure; F18Co: cobalt-doped F18 bioglass; SS: saline solution.

Discussion

This study used an *in vivo* model with Wistar rats to evaluate the influence of an F18Co bioglass solution on repair process of immature rat molar undergoing REP. It was found that the F18Co bioglass solution induced the formation of connective tissue inside root canal, with collagen maturation, presence of PCNA-positive cells and higher OCN immunolabeling, while did not influence the formation of mineralized tissue on the walls of the root canal.

Wistar rat molars were used because they provide an acceptable and previously standardized model (Reis-Prado et al., 2023). These animals exhibit biological responses and 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).

The most studied and widely used irrigating solutions in REP are NaOCl (Diogenes et al., 2014; Galler et al., 2016; AAE, 2018), chlorhexidine (Nagata et al., 2014; Ruksakiet et al., 2020) and EDTA (Galler et al., 2011; 2016; Gonçalves et al., 2016; Chae et al., 2018; Ivica et al., 2019; Atesci et al., 2020). However, bioactive glasses have been studied in dentistry as they establish a connection between the material and the tissues, besides to contribute to the regeneration of hard and soft tissues with proliferation of osteoblasts and fibroblasts (Gabbai-Armelin et al., 2015; 2017). Previous studies characterized a highly porous fibrous glass scaffold based on F18 bioglass, and evaluated its properties, showing biomaterial degradation over time with soft tissue growth (Gabbai-Armelin et al., 2015; 2017), and its potential to regenerate connective tissues assisting tissue repair. These results support the findings of this study regarding the formation of connective tissue.

It was observed that when using the F18Co solution as the final irrigating solution in REP, tissue formation reached the cervical third in most specimens, compared to the group where the irrigation final was performed with solution saline and had connective tissue present in the middle third. Previously, when F18 was evaluated as a membrane form, a rapid response in cell growth was also observed, attributed to its rapid dissolution, releasing ions such as Ca, Na, Si, and P in the medium (Hidalgo-Pitaluga et al., 2018), important for the tissue repair process as they activate mesenchymal stem cells (Crovace

et al., 2016), which may explain the results found here. These ions may have been released in the solution prepared from the bioglass, exerting positive effects on tissue regeneration.

PCNA is a protein involved in cell cycle regulation and is often used as a marker of cell proliferation (Benetti et al., 2017; Ricardo et al., 2019; Kadashett et al., 2020). In REP, the goal is to promote the formation of healthy tissue on the root canal space. Therefore, the analysis of the presence of positive cells for PCNA may indicate a proliferating tissue, which is important to understand the results observed in the histological analysis of this study. The present results found significant presence of PCNA-positive cells when using the bioglass solution, which is consistent with the histological results obtained. Moreover, previously, F18 induced the *in vitro* proliferation fibroblasts (Crovace et al., 2016), corroborating with this result. However, PCNA-positive cells were found mainly in the most apical region of the root canal, not being found in the central region of the newly formed tissue. It may be that the analysis period used was not enough to show cell proliferation in the tissue present inside the root canal, despite observing cells during the histological analysis. This may mean that the tissue is not yet mature enough, and a longer analysis period may show more satisfactory results.

On the other hand, the collagen fibres were quite mature in the apical third of the tissue inside the root canal. The extracellular matrix of the dental pulp contains collagen fibres, which make up approximately 34% of its composition (Cintra et al., 2017). It is important to analyse the collagen when evaluating the formation of newly formed tissue inside the root canals, because the presence of collagen fibres suggests the different stages of tissue maturation and remodelling (Digka et al., 2019). The collagen is known for its strength and contribution to the formation and organization of the mineralized extracellular matrix (Parenteau-Bareil et al., 2010; Zhu et al., 2022), and plays an important role in cell proliferation regulation and modulation of the tissue environment during repair and regeneration processes (Parenteau-Bareil et al., 2010; Zhu et al., 2022). To evaluate the maturation of these collagen fibres in the tissues is important for the understanding the development of effective therapeutic strategies to tissue regenerate. In this study, REP-F18Co group showed more mature fibres in the apical third of the newly formed tissue inside the root canals. However, these results contradict those of Reis-Prado et al. (2023), where there was a greater amount of immature fibres in this region after REP. This discrepancy could be due to the period of the analysis, as the previous study analysed the response tissue at 15 days after REP, while the present study analysed at 21 days.

Regarding newformed mineralized tissue, both the groups had increase in the length and thickness on root canal walls, but there was no significant difference between groups during histological analysis. The data of REP-SS corroborate with the previous results of the Reis-Prado et al. (2023), which showed that the use of EDTA in REP increased the deposition of mineralized tissue in the root. However, the REP-F18Co group had significant greater OCN immunolabeling.

De Araújo-Lopes et al. (2020) evaluated the induction of mineralization of experimental pastes of two bioglass and glass-ceramic materials, compared to calcium hydroxide paste, and F18 showed significant osteopontin immunolabeling. It is worth noting that the materials were inserted into the subcutaneous tissue of the animals for 7 or 30 days (de Araújo-Lopes et al., 2020), highlighting that F18 was effective in inducing the presence of mineralization marker even in connective tissue.

In the context, OCN plays an important role in mineralized tissue formation. In previous study, Zhu et al. (2014) aimed to evaluate the specific markers in newly generated tissues after REP, as well as OCN, which was detected both in the newformed tissue inside the root canal and in the periodontal ligament. According to the authors, these data show that the tissue inside the root canal resembles periodontal tissue. Likewise, the results of this present study do not show a tissue similar to the dental pulp inside the root canal, but a connective tissue still in formation, and without the presence of cells similar to odontoblasts at the interface with the dentin.

However, OCN immunolabeling was significant in REP-F18Co group. This significant difference founded in the group irrigated with F18Co solution may be due to the release of calcium ions and the alkaline pH of the bioglasses (Mehrvarzfar et al., 2011; Jones, 2013; Crovace et al., 2016). Moreover, membranes of F18 bioglass increased the metabolic activity of osteoblastic cells in other study (Hidalgo-Pitaluga et al., 2018), corroborating these results. In addition, the interaction of bioactive materials with mesenchymal stem cells from the dental pulp showed the ability to accelerate hard tissue formation (Olaru et al., 2021). There was also observed formation of hydroxycarbonate apatite on the F18 surface when in contact with tissues (Gabbai-Armelin et al., 2017). Furthermore, the presence of OCN in the extracellular matrix may also be related to tissue collagen maturation (Benetti et al., 2019a), corroborating the PSR data found in this study.

Regenerative endodontic procedures are indicated for teeth with incomplete root development and necrosis. However, in this study, necrosis was not induced, which presents a limitation. The intention was to test the biological potential of an experimental

F18Co irrigating solution, so this contaminated model was excluded to eliminate any variables, as has been done in other research studies (Bracks et al., 2019; Nosrat et al., 2019; Alexander et al., 2020; Reis-Prado et al., 2023). Therefore, after this study, this contaminated model approach can be considered a suggestion for future research. It is noteworthy that the F18 used in the present study was doped with cobalt ions, that can improve the antioxidant activity of the materials, in addition to antimicrobial activity (Fang et al., 2008; Nair et al., 2011). Also, cobalt ions have improved the biological and magnetic characteristics of materials used in biomedicine, in addition to stimulating the angiogenesis (Littmann et al., 2018). Overall, this study highlights that the use of a bioglass solution as a final irrigation in REP instead of saline solution can improve the tissue repair process, with induction of tissue formation inside the root canals, collagen maturation, cell proliferation and mineralization marker induction. New studies should be carried out with different bioglasses, analyses of new markers, and extended evaluation periods.

Conclusion

The final irrigation with F18Co bioactive glass solution in REP did not influence mineralized tissue formation, but induced soft tissue formation inside the root canals, with higher collagen maturation, and an increase in PCNA-positive cells and OCN immunolabeling.

Conflicts of interest

The authors explicitly state that there are no conflicts of interest in connection with this article.

References

- Aksel, H., Albanyan, H., Bosaid, F., Azim, A.A. (2020) Dentin Conditioning Protocol for Regenerative Endodontic Procedures. *Journal of Endodontics*, 46, 1099-1104.
- 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.
- Arslan, H., Şahin, Y., Topçuoğlu, H.S., Gündoğdu, B. (2019) Histologic evaluation of regenerated tissues in the pulp spaces of teeth with mature roots at the time of the regenerative endodontic procedures. *Journal of Endodontics*, 45, 1384–1389.
- Atesci, A.A., Avci, C.B., Tuglu, M.I., Ozates Ay, N.P., Eronat, A.C. (2020) Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology. *Journal of Endodontics*, 46, 200-208.
- Azevedo, M.M., Tsigkou, O., Nair, R., Jones, J.R., Jell, G., Stevens, M.M. (2015) Hypoxia inducible factor-stabilizing bioactive glasses for directing mesenchymal stem cell behavior. *Tissue Engineering Part A*, 21, 382-389.
- Benetti, F., Briso, A.L.F., de Araújo Lopes, J.M., Carminatti, M., Conti, L.C., Gallinari, M.O., Ervolino, E., Cintra, L.T.A. (2019b) In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. *International Endodontic Journal*, 52, 1723-1737.
- Benetti, F., Briso, A.L.F., 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.
- Benetti, F., Bueno, C.R.E., Reis-Prado A.H., Souza, M.T., Goto, J., Camargo, J.M. et al. (2020) Biocompatibility, biomineralization, and maturation of collagen by RTR®, bioglass and DM bone® materials. *Brazilian Dental Journal*, 31, 477–484.
- Benetti, F., Gomes-Filho, J.E., Ferreira, L.L., et al. (2017) Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo: Effects of the dental bleaching in pulp. *Archives of Oral Biology*, 22, 103-109.

Bracks, I.V., Espaladori, M.C., Barros, P., de Brito, L.C.N., Vieira, L.Q., Ribeiro, Sobrinho, A.P. (2019) Effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerative endodontic therapy. *International Endodontic Journal*, 52, 1457-1465.

Cappello, F., Di Stefano, A., David, S., Rappa, F., Anzalone, R., La Rocca, G., Zummo, G. (2006) Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease, *Cancer*, 107, 2417-2424.

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.

Chae, Y., Yang, M., Kim, J. (2018) Release of TGF-B1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. *International Endodontic Journal*, 51, 1389-1397.

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.

Cintra, L.T.A., Ferreira, L.L., Benetti, F. et al. (2017) The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. *International Endodontic Journal*, 50, 790-798.

Crovace, M.C., Souza, M.T., Chinaglia, C.R., Peitl, O., Zanutto, E.D. (2016) Biosilicate®—A multipurpose, highly bioactive glass-ceramic. In vitro, in vivo and clinical trials. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 432, 90–110.

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

De Araújo Lopes, J.M., Benetti, F., Rezende, G.C., Souza, M.T., Conti, L.C., Ervolino, E. et al. (2020) Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-ceramic materials. *International Endodontic Journal*, 53, 1494–1505.

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.

Deniz-Sungur, D., Aksel, H., Ozturk, S., Yilmaz, Z., Ulubayram, K. (2019) Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability. *International Endodontic Journal*, 52, 838-846.

Digka, A., Sakka, D., Lyroudia, K. (2020) Histological assessment of human regenerative endodontic procedures (REP) of immature permanent teeth with necrotic pulp/apical periodontitis: A systematic review. *Australian Endodontic Journal*, 46, 140-153.

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.R., Ruparel, N.B., Teixeira, F.B., Hargreaves, K.M. (2014) Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*, 40, 52-57.

Dziadek, M., Zagrajczuk B., Menaszek, E. Dziadek, K., Cholewa-Kowalska, K. (2018) A simple way of modulating in vitro angiogenic response using Cu and Co-doped bioactive glasses. *Materials Letters*, 215, 87–90.

Fang, D., Li, Z., Zhong-ming, Q., Mei, W.X., Ho, Y.W., Yuan, X.W. et al. (2008) Expression of bystin in reactive astrocytes induced by ischemia/reperfusion and chemical hypoxia in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1782, 658-663.

Ferreira, L.L., Gomes-Filho, J.E., Benetti, F., Carminatti, M., Ervolino, E., Briso, A.L.F., Cintra, L.T.A. (2018) The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model: a study of immunoregulatory cytokines. *International Endodontic Journal*, 51, 347-356.

Gabbai-Armelin P.R., Souza M.T., Kido H.W., Tim, C.R., Bossini, P.S., Magri, A.M., et al. (2015) Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 26, 177-190.

Gabbai-Armelin, P.R., Souza, M.T., Kido, H.W., Tim, C.R., Bossini, P.S., Fernandes, K.R., et al. (2017) Characterization and biocompatibility of a fibrous glassy scaffold. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 11, 1141-1151.

Galler, K.M. (2016) Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *International Endodontic Journal*, 49, 926–936.

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.

Gonçalves, L.F., Fernandes, A.F., Cosme-Silva, L., Colombo, F.A., Martins, N.S., Oliveira, T.M. et al. (2016) Effect of EDTA on TGF- β 1 released from the dentin matrix and its influence on dental pulp stem cell migration. *Brazilian Oral Research*, 30, 131-140.

Hench, L.L. (2006) The story of Bioglass. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 17, 967-978.

Hidalgo-Pitaluga, L., Souza, M.T., Zanutto, E.D., Romero, M.E.S., Hatton, P.V. (2018) Electrospun F18 Bioactive Glass/PCL-Poly (ϵ -caprolactone)-Membrane for Guided Tissue Regeneration. *Materials*, 11, 400-410.

Hirata, M., Yamaza, T., Mei, Y.F., Akamine, A. (2005) Expression of osteocalcin and Jun D in the early period during reactionary dentin formation after tooth preparation in rat molars. *Cell and Tissue Research*, 319, 455-465.

Ivica, A., Zehnder, M., Mateos, J.M., Ghayor, C., Weber, F.E. (2019) Biomimetic conditioning of human dentin using citric acid. *Journal of Endodontic*, 45, 45-50.

Jones, J.R. (2013) Review of bioactive glass: from Hench to hybrids. *Acta Biomaterials*, 9, 4457-4486.

Kadashetti, V., Patil, N., Datkhile, K., Kanetakar, S., Shivakumar, K.M. (2020) Analysis of expression of p53, p63 and proliferating cell nuclear antigen proteins in odontogenic keratocyst: An immunohistochemical study. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, 24, 273-278.

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

Kim, S.G., Malek, M., Sigurdsson, A., Lin, L.M., Kahler, B. (2018) Regenerative endodontics: a comprehensive review. *International Endodontic Journal*, 5, 1367–1388.

Li, Y., Jin, C., Zhao, S., Xie, H. (2022) Effects of sodium hypochlorite and ethylenediaminetetraacetic acid on proliferation, osteogenic/odontogenic differentiation, and mechanosensitive gene expression of human dental pulp stem cells. *Tissue and Cell*, 79, 1-7.

Littmann, E., Autefage, H., Solanki, A.K., Kallepitis, C., Jones, J.R., Alini, M. et al. (2018) Cobalt-containing bioactive glasses reduce human mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation despite HIF-1 α stabilisation. *Journal of the European Ceramic Society*, 38, 877-886.

Lopes, L.B., Neves, J.A., Botelho, J., Machado, V., Mendes, J.J. (2021) Regenerative Endodontic Procedures: An Umbrella Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18, 754-765.

Martin, D.E., De Almeida, J.F., Henry, M.A., Khaing, Z.Z., Schmidt, C.E., Teixeira, F.B., Diogenes, A. (2014) Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *Journal of Endodontics*, 40, 51-55.

Mehrvarzfar, P., Akhavan, H., Rastgarian, H., Soleymanpour, R., Ahmadi, A. (2011) An in vitro comparative study on the antimicrobial effects of bioglass 45S5 vs. calcium hydroxide on *Enterococcus faecalis*. *Iranian Endodontic Journal*, 6, 29–33.

Murray, P.E., Garcia-Godoy, F., Hargreaves, K.M. (2007) Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *Journal of Endodontics*, 33, 377-390.

Nagata, J.Y., Soares, A.J., Souza-Filho, F.J., Zaia, A.A., Ferraz, C.C., Almeida, J.F., Gomes, B.P. (2014) Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *Journal of Endodontic*, 40, 778-783.

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.

Nair, M.G., Nirmala, M., Rekha, K., Anukaliani, A. (2011) Structural, optical, photocatalytic and antibacterial activity of ZnO and Co doped ZnO nanoparticles. *Materials Letters*, 65,1797-1800.

Nosrat, A., Kolahdouzan, A., Khatibi, A.H., Verma, P., Jamshidi, D., Nevins, A.J. et al. (2019) Clinical, radiographic, and histologic outcome of regenerative endodontic treatment in human teeth using a novel collagen-hydroxyapatite scaffold. *Journal of Endodontic*, 45, 136-143.

Olaru, M., Sachelarie, L., Calin, G. (2021) Hard Dental Tissues Regeneration- Approaches and Challenges. *Materials*, 14, 25-42.

Palma, P.J., Ramos, J.C., Martins, J.B., Diogenes, A., Figueiredo, M.H., Ferreira, P. et al. (2017) Histologic evaluation of regenerative endodontic procedures with the use of chitosan scaffolds in immature dog teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics*, 43, 1279–1287.

Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., Berthod, F. (2010) Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 16, 1863–1887.

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.

Reis, B.O., Prakki, A., Stavroullakis, A.T., Souza, M.T., Siqueira, R.L., Zanotto, E.D., Briso, A.L.F., Cintra, L.T., dos Santos, P.H. (2021). Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses. *Journal of Dentistry*, 111, 1-10.

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.

Ruksakiet, K., Hanák, L., Farkas, N., Hegyi, P., Sadaeng, W., Czumbel, L.M., Sang-Ngoen, T., Garami, A., Mikó, A., Varga, G., Lohinai, Z. (2020) Antimicrobial Efficacy of Chlorhexidine and Sodium Hypochlorite in Root Canal Disinfection: A Systematic Review and Meta-analysis of Randomized Controlled Trials *Journal of Endodontics*, 46, 1032-1041.

Santos, F.G., Bonkovoski, L.C., Garcia, F.P., Cellet, T.S., Witt, M.A., Nakamura, C.V., Rubira, A.F., Muniz, E.C. (2017) Antibacterial Performance of a PCL-PDMAEMA Blend Nanofiber-Based Scaffold Enhanced with Immobilized Silver Nanoparticles. *ACS Applied Materials Interfaces*, 9, 9304-9314.

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.

Scarparo, 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.

Souza, M.T., Campanini, L.A., Chinaglia, C.R., Peitl, O., Zanotto, E.D., Souza, C.W.O. (2017a) Broad-spectrum bactericidal activity of a new bioactive grafting material (F18) against clinically important bacterial strains. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 50, 730-733.

Souza, M.T., Peitl, O., Zanotto, E.D. Vitreos Composition, Bioactive Vitreous Fibres and Fabrics and Articles. WO 201 502 151 9 A1. [Patent]. 2015. Available from: <https://patentscope.wipo.int/search/en/detail.jsf?docId=WO2015021519>

Souza, M.T., Renno, A.C., Peitl, O., Zanotto, E.D. (2017b) New highly bioactive crystallization-resistant glass for tissue engineering applications. *Translational Materials Research*, 4, 1-14.

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.

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.

Zhang, J., Park, Y.D., Bae, W.J., El-Fiqi, A., Shin, S.H., Lee, E.J., Kim, H.W., Kim, E.C. (2015) Effects of bioactive cements incorporating zinc-bioglass nanoparticles on odontogenic and angiogenic potential of human dental pulp cells. *Journal of Biomaterials Applications*, 29, 954-964.

Zhu, J., Li, Z., Zou, Y. et al. (2022) Advanced application of collagen-based biomaterials in tissue repair and restoration *Journal of Leather Science and Engineering*, 30, 1-10.

Zhu, X., Wang, Y., Liu, Y., Huang, G.T., Zhang, C. (2014) Immunohistochemical and histochemical analysis of newly formed tissues in root canal space transplanted with dental pulp stem cells plus platelet-rich plasma. *Journal of Endodontics*, 40, 1573-1578.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo avaliou a influência da irrigação final com solução do biovidro F18 doado com cobalto (F18Co), em procedimento endodôntico regenerativo (REP), utilizando molares imaturos de ratos. Os resultados histológicos mostraram que a irrigação final com F18Co não influenciou a formação de tecido mineralizado, mas induziu a formação de tecido mole dentro dos canais radiculares, com maior maturação do colágeno e aumento de células positivas para PCNA e imunomarcagem de OCN. Estes resultados favoráveis podem ser atribuídos, dentre outros fatores, à rápida dissolução e ação do F18, liberando íons como cálcio e sódio no meio, importantes para o processo de reparo tecidual pela ativação das células-tronco mesenquimais, o que pode ter sido potencializado pela presença do cobalto. Ainda, a presença do possível pH alcalino da solução poder ser outro fator que beneficiou o processo de reparo, o que precisa ser avaliado.

Neste estudo, a necrose não foi induzida previamente ao procedimento de REP, assim como ocorre clinicamente. O intuito era avaliar o potencial biológico da solução irrigadora experimental, eliminando quaisquer variáveis. Desta forma, o modelo contaminado pode ser considerado uma sugestão para pesquisas futuras. Ainda, a análise de outros biovidros, marcadores e tempo de avaliação mais longo, também é necessária para fortalecer estes resultados.

No geral, este estudo destaca que o uso de solução de biovidro como irrigação final em REP, em vez de solução salina, pode melhorar o processo de reparo tecidual, com indução da formação de tecido no interior dos canais radiculares, maturação do colágeno, proliferação celular e indução de marcadores de mineralização.

REFERÊNCIAS

- AKSEL, H. *et al.* Dentin Conditioning Protocol for Regenerative Endodontic Procedures. **Journal of Endodontics**, v. 46, p. 1099-104, 2020.
- AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTICS. AAE Clinical Consideration for a Regenerative Procedure. **Revised**. v.4, n.1, p.18, 2018.
- ANDREASEN, F. M.; KAHLER, B. Pulpal Response after Acute Dental Injury in the Permanent Dentition: Clinical Implications – A Review. **Journal of Endodontic**, v. 41, n. 3, p. 299-308, Mar. 2015.
- AZEVEDO, M.M. *et al.* Hypoxia inducible factor-stabilizing bioactive glasses for directing mesenchymal stem cell behavior. **Tissue Engineering Part A**, v.21, n.1-2, p. 382–389, 2015.
- BENETTI, F. *et al.* Hydrogen peroxide induces cell proliferation and apoptosis in pulp of rats after dental bleaching in vivo: Effects of the dental bleaching in pulp. **Archives of Oral Biology**, v.81, p. 103-109, 2017.
- BENETTI, F. *et al.* Biocompatibility, Biomineralization, and Maturation of Collagen by RTR®, Bioglass and DM Bone® Materials. **Brazilian Dental Journal**, v. 31, n. 5, p. 477-484, Sep/Oct. 2020.
- BENETTI, F. *et al.* Concentration-dependent effect of bleaching agents on the immunolabeling of interleukin-6, interleukin-17, and CD5-positive cells in the dental pulp. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 7, p. 789-799, Jul. 2018.
- BENETTI, F. *et al.* In vivo analysis of the presence of heme oxygenase-1, transcription factor Jun-D and CD90+/CD73+/CD105+/CD45- cells in the pulp of bleached teeth. **International Endodontic Journal**, v.52, n.12, p. 1723-1737, 2019b.
- BENETTI, F. *et al.* The presence of osteocalcin, osteopontin and reactive oxygen species-positive cells in pulp tissue after dental bleaching. **International Endodontic Journal**, v.52, n. 5, p. 665-675, may. 2019a.
- BRACKS, I. V. *et al.* Effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerative endodontic therapy. **International Endodontic Journal**, v. 52, n. 10, p. 1457-1465, Oct. 2019.
- CAPPELLO, F. *et al.* Hsp60 and Hsp10 down-regulation predicts bronchial epithelial carcinogenesis in smokers with chronic obstructive pulmonary disease, **Cancer**, v. 107, n. 10, p. 2417-2424, 2006.
- CHAE, Y.; YANG, M.; KIM, J. Release of TGF- β 1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. **International Endodontic Journal**. 2018 v.51, n.12, p.1389-1397, dec, 2018.
- CINTRA, L.T.A. *et al.* The effect of dental bleaching on pulpal tissue response in a diabetic animal model. **International Endodontic Journal**, v.50, n.8, p.790-798, 2017.
- DE ARAÚJO LOPES, J.M *et al.* Biocompatibility, induction of mineralization and antimicrobial activity of experimental intracanal pastes based on glass and glass-

ceramic materials. **International Endodontic Journal**, v.53, n.11, p.1494-1505, 2020.

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

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

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

DZIADEK, M. *et al.* A simple way of modulating in vitro angiogenic response using cu and co-doped bioactive glasses. **Materials Letters**, v.215, p. 87–90, 2018.

GABBAI-ARMELIN, P.R. *et al.* Effect of a new bioactive fibrous glassy scaffold on bone repair. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.26, p-177-180, 2015.

GALLER, K. M. *et al.* European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. **International Endodontic Journal**, v. 4, n. 8, p. 717-723, Aug. 2016.

GOMES-FILHO, J. E. *et al.* Histologic Characterization of Engineered Tissues in the Canal Space of Closed-apex Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 12, p. 1549-1556, Dec. 2013.

GORUSTOVICH, A.A; ROETHER, J.A; BOCCACCINI, A.R. Effect of bioactive glasses on angiogenesis: a review of in vitro and in vivo evidences. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 16, p. 199,2010.

HENCH, L.L. The story of Bioglass. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.17, n. 11, p. 967-978, 2006.

HENCHE, L.L; ANDERSSON. Bioactive glasses, Chapter 3, 1969. (An Introduction to Bioceramics Downloaded from www.worldscientific.com).

HIRATA, M. *et al.* Expression of osteocalcin and Jun D in the early period during reactionary dentin formation after tooth preparation in rat molars. **Cell and Tissue Research**, v. 319, n.3, p. 455-465, 2005.

KHARCHI, Adam S.; TAGIYEVA-MILNE, Nara; KANAGASINGAM, Shalini. Regenerative Endodontic Procedures, Disinfectants and Outcomes: A Systematic Review. **Primary Dental Journal**, v. 9, n. 4, p. 65–84, 2020.

KIM, S. G. *et al.* Regenerative endodontics: a comprehensive review. **International Endodontic Journal**, v. 51, n. 12, p. 1367–1388, 2018.

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

LAMBRICHTS, I. *et al.* Dental Pulp Stem Cells: Their Potential in Reinnervation and Angiogenesis by Using Scaffolds. **Journal of Endodontics**, v.43, n.9, p.12-16, 2017.

LI, Y. *et al.* Effects of sodium hypochlorite and ethylenediaminetetraacetic acid on proliferation, osteogenic/odontogenic differentiation, and mechanosensitive gene expression of human dental pulp stem cells. **Tissue & Cell**, v. 79, p. 101955, 2022.

LOPES, L. B. *et al.* Regenerative Endodontic Procedures: An Umbrella Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 2, p. 754, 2021.

MARTIN, D. *et al.* Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 1, p. 51–55, 2014.

MURRAY, P.E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K.M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. **Journal of Endodontics**, v. 33, n. 4, p. 377–390, 2007.

PALMA, P.J. *et al.* Histologic Evaluation of Regenerative Endodontic Procedures with the Use of Chitosan Scaffolds in Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis. **Journal of Endodontics**, v. 43, n. 8, p. 1279-1287, Aug. 2017.

REIS, B. O. *et al.* Analysis of permeability and biological properties of dentin treated with experimental bioactive glasses. **Journal of Dentistry**, v. 111, p. 103719, 2021.

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

REIS-PRADO, A. H. *et al.* Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review. **International Endodontic Journal**, v. 55, n. 6, p. 579–612, 2022.

SCARPARO, R. K. *et al.* Intracanal delivery of Resolvin E1 controls inflammation in necrotic immature rat teeth. **Journal of Endodontics**, v. 40, n. 5, p. 678-682, May 2014.

SHETTY, S. *et al.* Coronal pulpotomy technique analysis as an alternative to pulpectomy for preserving the tooth vitality in context to tissue regeneration: a correlated clinical study across 4 permanent molars. **European Journal of Molecular & Clinical Medicine**, v. 07, n. 07, p. 5255–5262, 2020.

SHIMIZU, E. *et al.* Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. **Journal of Endodontics**, v. 39, n. 8, p. 1078–1083, Aug. 2013.

SOUZA, M.T *et al.* Broad-Spectrum Bactericidal Activity of a New Bioactive Grafting Material (F18) Against Clinically Important Bacterial Strains, **International Journal of Antimicrobial Agents** v. 50, n.6, p.730-733, 2017.

SOUZA, M.T; PEITL, O.; ZANOTTO, E.D. Vitreos Composition, Bioactive Vitreous Fibres and Fabrics and Articles. 2015. WO 201 502 151 9 A1. Patent.

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

XYNOS, I. D. *et al.* Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. **Journal of Biomedical Materials Research**. v.55, p.150-157, 2001.

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

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



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

CEUA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Influência da diabetes mellitus na regeneração do tecido pulpar após uso de medicações intracaneais e soluções irrigadoras experimentais à base de biovidros", protocolo do CEUA: 94/2021 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 12/07/2021.

Vigência da Autorização	12/07/2021 a 11/07/2026
Finalidade	Pesquisa
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6

Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	6
Peso/Idade	80g / 4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	3
Peso/Idade	10g / 5(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG

Dados dos animais agrupados (uso do biotério)	
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	48
Idade	4(semanas)
Sexo	masculino
Origem	Biotério Central da UFMG
*Espécie/linhagem	Rato heterogênico / Rattus albinus, Wistar
Nº de animais	3
Idade	5(dias)
Sexo	indiferente
Origem	Biotério Central da UFMG

Considerações posteriores:

12/07/2021	Aprovado na reunião ordinária on-line do dia 12/07/2021. Validade: 12/07/2021 à 11/07/2026
------------	--

Belo Horizonte, 16/08/2022.

Atenciosamente,

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

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