

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Tese

**Scaffolds bioativos: avaliação do efeito antimicrobiano e ou/ anti-inflamatório
sobre hDPSCs**

Marindia de Almeida Borba

Pelotas, 2022

Marindia de Almeida Borba

**Scaffolds bioativos: avaliação do efeito antimicrobiano e ou/anti-Inflamatório
sobre hDPSCs**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biomaterias e Biologia Oral - ênfase em inovação tecnológica.

Orientadora: Adriana Fernandes da Silva

Coorientador: Wellington Luiz de Oliveira da Rosa

Pelotas, 2022

Marindia de Almeida Borba

Scaffolds bioativos: avaliação do efeito antimicrobiano e ou/anti-inflamatório sobre a hDPSCs

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biomaterias e Biologia Oral - ênfase em inovação tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 29/04/2022

Banca examinadora:

Profa. Dr^a. Adriana Fernandes da Silva (Orientador)
Doutora em Odontologia - ênfase Biologia Buco Dental / Histologia e embriologia pela Universidade de Campinas.

Profa. Dr^a. Ezilmara Leonor Rolim de Sousa
Doutora em Odontologia - Endodontia pela Universidade Federal de Campinas (UNICAMP)

Prof. Dr^a. Luciane Geanini Pena Dos Santos
Doutora em Odontologia –Doutora em Odontologia – Endodontia pela Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Profa. Dr^a. Máisa Casarin
Doutora em Odontologia – Periodontia pela Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Profa. Dr^a. Alexandra Rubin Cocco (Suplente)
Doutora em Odontologia – Clínica Odontológica - ênfase em Dentística e Cariologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Profa. Dr^a. Natalia Marcumini Pola (Suplente)
Doutora em Odontologia – Periodontia pela Universidade de São Paulo (USP).

A minha mãe,
de quem trago muito,
de quem és meu espelho.

Agradecimentos

Em especial a minha mãe **Vera Lúcia A. de Almeida**, que na maioria das vezes se doou e renunciou aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus. E principalmente por ela me oferecer a oportunidade de estudar, sempre esteve presente em todo esse tempo me apoiando, se dedicando e sou muito feliz e grata por isso. Quero dizer que essa conquista não é só minha, mas nossa.

Aos meus irmãos **Pedro Henrique** e **Maurison**, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre, por estarem sempre torcendo pelas minhas conquistas. Por todo o apoio e incentivo incondicional. Obrigada!

Não posso deixar de agradecer também a uma grande incentivadora, que mesmo longe, marca importante presença em minha vida, minha grande amiga **Vivian Ulrich**. Obrigada por me acompanhar nessa trajetória, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante etapa. Obrigada pela paciência e amizade, você é como uma irmã.

Agradeço aos **amigos** e **colegas** que estiveram presentes nessa caminhada, por terem tornado o dia a dia na pós-graduação tão prazeroso. Meu sincero agradecimento pelas risadas, apoio, conversas, almoços, e por dividir esse momento tão importante. Foi extremamente enriquecedor conhecer e conviver com cada um de vocês.

Agradecimento a minha orientadora **Adriana Fernandes da Silva** e ao coorientador **Wellington Luiz de Oliveira da Rosa**, por aceitarem e pela oportunidade de tê-los me orientando no doutorado. Agradeço pela confiança, amizade, conselhos e paciência. Ainda, pelos ensinamentos, que não foram poucos, pela dedicação, por me apresentarem um “novo mundo” dentro da pesquisa, por trabalhar em grupo, respeitar o próximo e, principalmente, que é muito mais fácil multiplicar quando sabemos dividir!

Agradeço ainda ao meu pai **Maurício Borba**, e aos outros entes queridos que não estão mais nesse plano, mas que sinto estarem próximo a mim. Agradeço a Deus por poder citar todas estas pessoas neste momento tão importante. Obrigado por coloca-las tão caprichosamente em minha vida.

Meus sinceros agradecimentos à **Universidade Federal de Pelotas**, e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia, DAI – Doutorado em inovação e tecnologia**, seu corpo docente e a todos os professores que estiveram próximos, que proporcionaram meu aprendizado. A direção e administração e funcionários que sempre estiveram dispostos a ajudar.

O **Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq**- que me concedeu a bolsa, durante a realização desse doutorado, o que contribui pela viabilização desta tese.

À empresa **Angelus**, pelo auxílio financeiro concedido para a realização deste trabalho.

Às **demais pessoas** que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho ou participaram da minha vida, e que por ventura, eu tenha me esquecido de agradecer.

***“O que os outros pensam não muda quem você é. Então
siga sendo isso tudo que assusta alguns e encanta outros.
Não negue sua intensidade e seja, com luz, amor e
verdade”***

W. L.

Resumo

BORBA, Marindia de Almeida. **Scaffolds bioativos: avaliação do efeito antimicrobiano e ou/anti-inflamatório sobre hDPSCs**; 2022. 93 p. - Tese (Doutorado em Biomateriais e Biologia Oral com ênfase em Inovação Tecnológica) Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

O objetivo desta revisão de escopo foi reunir e mapear as evidências disponíveis sobre o uso de *scaffolds* antimicrobianos e ou anti-inflamatórios sobre as células-tronco da polpa para fins de regeneração pulpar. Dois revisores independentes realizaram uma pesquisa abrangente em quatro bancos de dados eletrônicos até 10 de abril de 2021: MEDLINE, Embase, Scopus e Web of Science. Os critérios de seleção foram: 1) estudos que avaliassem as propriedades biológicas (por exemplo, antimicrobiana, antibacteriana e anti-inflamatória) de scaffolds/hidrogéis carregados ou não com drogas/moléculas bioativas; 2) estudos que verificaram os efeitos dos scaffolds nas células-tronco da polpa dental humana; e 3) estudos que testaram os scaffolds tendo como alvo a endodontia regenerativa. Inicialmente foram identificados 1.804 artigos potencialmente relevantes e, após a exclusão de 364 duplicatas, 1.399 foram considerados inelegíveis com base nos critérios de inclusão. Após a triagem, 41 artigos permaneceram e foram pré-selecionados para análise do texto completo pelos revisores. Por fim, apenas 13 artigos foram selecionados para esta revisão. No geral, os estudos consistiram principalmente em andaimes híbridos carregados com drogas. Seis estudos testaram os efeitos de drogas como metronidazol e ciprofloxacina, e apenas um estudo verificou a propriedade anti-inflamatória do scaffold. A maioria dos estudos verificou as propriedades antimicrobianas contra a bactéria *Enterococcus faecalis*. Em geral, os estudos verificaram a citotoxicidade dos scaffolds em células-tronco da polpa humana, com resultados positivos para viabilidade celular. Os scaffolds que não utilizaram medicamentos em sua composição também podem apresentar propriedades antimicrobianas, criando um ambiente favorável para as células-tronco. Os scaffolds com fármacos resultaram em propriedades antimicrobianas derivadas de sua composição. Em conclusão, o uso de fármacos e moléculas com propriedades antimicrobianas podem reduzir o crescimento bacteriano de acordo com o efeito da dosagem. No entanto, para preservar os resultados de viabilidade celular, são indicadas doses mínimas desses medicamentos. Estruturas naturais como fibrina e colágeno sem o uso de fármacos podem resultar em efeitos antimicrobianos, portanto esses compostos são importantes candidatos para a redução de eventos de inflamação pulpar no futuro.

Palavras-chave: Células-tronco da polpa dentária; engenharia tecidual andaimes; revisão de escopo; regeneração endodôntica.

Abstract

BORBA, Marindia de Almeida. **Bioactive scaffolds: evaluation of the antimicrobial and/or anti-inflammatory effect on hDPSCs; 2022.** 93 p. Thesis – Graduate Program in Dentistry- Faculty the Dentistry. Federal University of Pelotas, Pelotas, 2022.

The objective of this scoping review was to gather and map the available evidence on the use of antimicrobial and/or anti-inflammatory scaffolds on pulp stem cells for pulp regeneration purposes. Two independent reviewers performed a comprehensive search of four electronic databases as of April 10, 2021: MEDLINE, Embase, Scopus, and Web of Science. The selection criteria were: 1) studies that evaluated the biological properties (eg antimicrobial, antibacterial and anti-inflammatory) of scaffolds/hydrogels loaded or not with drugs/bioactive molecules; 2) studies that verified the effects of scaffolds on human dental pulp stem cells; and 3) studies that tested scaffolds targeting regenerative endodontics. Initially, 1,804 potentially relevant articles were identified and, after excluding 364 duplicates, 1,399 were considered ineligible based on the inclusion criteria. After screening, 41 articles remained and were pre-selected for full-text analysis by the reviewers. Finally, only 13 articles were selected for this review. Overall, the studies consisted primarily of drug-laden hybrid scaffolding. Six studies tested the effects of drugs such as metronidazole and ciprofloxacin, and only one study verified the anti-inflammatory property of the scaffold. Most studies have verified the antimicrobial properties against the bacterium *Enterococcus faecalis*. In general, the studies verified the cytotoxicity of scaffolds in human pulp stem cells, with positive results for cell viability. Scaffolds that did not use drugs in their composition may also have antimicrobial properties, creating a favorable environment for stem cells. The scaffolds with drugs resulted in antimicrobial properties derived from their composition. In conclusion, the use of drugs and molecules with antimicrobial properties can reduce bacterial growth according to the effect of the dosage. However, to preserve cell viability results, minimal doses of these drugs are indicated. Natural structures such as fibrin and collagen without the use of drugs can result in antimicrobial effects, so these compounds are important candidates for reducing pulp inflammation events in the future.

Keywords: Dental pulp stem cells; tissue engineering scaffolding; scope review; endodontic regeneration.

Lista de Figuras

Figura 1	Chemical composition, types, and forms of biomaterials used in scaffold composition.....	65
Figura 2	Search flowchart according to the PRISMA statement.....	66
Figura 3	Review authors' judgments about each risk of bias item for each included study.....	67

Lista de Tabelas

Table 1	Antimicrobial/antibacterial and anti-inflammatory effects of evaluated scaffolds.....	62
Table 2	Cytotoxicity and cell viability/proliferation effects of the tested scaffolds allocated by type.....	64
Table supplementary 1	Search terms using a combination of controlled vocabulary and keywords.....	68

Sumário

Introdução.....	13
1 Objetivos.....	17
1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.1 Objetivo Específicos.....	17
2 Projeto de Pesquisa.....	18
3 Relatório do Trabalho de Campo.....	37
4 Artigo.....	38
5 Considerações Finais.....	74
Referências.....	75

Introdução

Nos últimos anos, avanços foram feitos na engenharia de tecidos orais e odontologia regenerativa, devido a crescente busca por pesquisas em áreas como biologia de células-tronco, genética, engenharia molecular e patologias que afetam o órgão dentário e seus tecidos de suporte (MIRAN *et al.*, 2016). Entretanto, a regeneração ainda é guiada pela necessidade da compreensão de três elementos que tem como objetivo restaurar funções de tecidos de órgãos afetados: matriz extracelular (ECM), que serve como um scaffold; uso de moléculas bioativas que regulam o crescimento e a diferenciação celular; e células mesenquimais, necessárias para a formação de novos tecidos (FUKUSHIMA *et al.*, 2019; LEE *et al.*, 2014). Assim, na engenharia tecidual, a regeneração será alcançada se for fornecido um scaffold estrutural, conferindo além de propriedades mecânicas, a capacidade de induzir a migração de populações celulares (GOKER *et al.*, 2019), além de outras características, como degradabilidade do biomaterial em um intervalo de tempo comparável ao crescimento do novo tecido (COLOMBO *et al.*, 2014).

O tratamento endodôntico regenerativo (RET) é definido como um procedimento de base biológica, que visa substituir tecidos danificados do complexo polpa-dentina (DP). Esse método atualmente possui duas estratégias principais: revascularização pulpar ou regeneração tecidual (CASTELLAN *et al.*, 2011). A primeira estratégia visa a regeneração pulpar, através da indução do sangramento da área periapical, enriquecendo o espaço intracanal com um coágulo de estrutura e vascularização natural de fibrina, bem como numerosos componentes celulares e moleculares essenciais para a formação de novos tecidos (DUCRET *et al.*, 2019; SAOUD *et al.*, 2016). A regeneração tecidual, é uma estratégia baseada na engenharia de tecidos, que consiste na combinação de três elementos básicos principais: células-tronco, scaffolds e mediadores com propriedades bioativas. (FERRONI *et al.*, 2015; NAKASHIMA; AKAMINE, 2005).

A polpa dentária é um dos tecidos mais difíceis de regenerar, devido a sua complexa natureza. É um tecido conjuntivo dinâmico, que possui uma capacidade bem característica de responder a infecções ou lesões (MOROTOMI *et al.*, 2019). As pesquisas sobre regeneração aumentam constantemente na literatura, aplicando princípios biológicos para proteger a polpa (AYALA-HAM *et al.*, 2021). As investigações têm se concentrado no uso de scaffolds ou hidrogéis,

estudos com células do tecido pulpar, *in vitro* e *in vivo*, estratégias como essas terapêuticas estão recebendo grande atenção (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a), podendo ser aplicadas em tratamentos clínicos como: capeamento pulpar direto e indireto, pulpotomias e revascularização pulpar, com ênfase em formação de dentina, nervos sensoriais e desenvolvimento de vasos sanguíneos (MOUSSA; APARICIO, 2019).

Os materiais bioativos são componentes inevitáveis da odontologia modernas. Isso se tornou evidente a partir do corpo de evidências que apoiam a regeneração do tecido dentário como uma modalidade de tratamento (MESCHI; PATEL; RUPAREL, 2020). Ainda segundo os autores, devido a gama de aplicações regenerativas o objetivo de muitas empresas e pesquisadores tem sido gerar um material biocompatível, osteoindutor, que não induz coloração do dente, e que seja de fácil manipulação e com o objetivo final de devolver forma e função aos tecidos orais (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020b). Nesse sentido, os scaffolds e hidrogéis vêm ganhando interesse.

Um scaffold é uma estrutura bioativa com base estrutural que suporta a adesão celular, regula sua proliferação e diferenciação e facilita a formação de tecidos (O'BRIEN, 2011). Para a regeneração endodôntica, um scaffold ideal deve-se assemelhar à matriz extracelular do complexo polpa dentina em termos de propriedades biológicas e mecânicas (RADDALL *et al.*, 2019). Deve estabelecer um microambiente tridimensional que permita que as células-tronco/progenitoras se liguem, migrem e proliferem, além de se organizarem espacialmente, para se diferenciarem em linhagens odontogênicas, vasculogênicas e neurogênicas, além de facilitar a angiogênese e neurogênese (LAKMAL; BDS; DDS, 2020; RADDALL *et al.*, 2019).

Os hidrogéis são rede poliméricas hidrofílicas em 3D que podem absorver grandes quantidades de água ou fluidos teciduais. Devido à sua compatibilidade termodinâmica, esses polímeros são macios e elásticos e têm sido usados em muitas aplicações biomédicas (AYALA-HAM *et al.*, 2021). São altamente ajustáveis e biocompatíveis, não são apenas projetados para se assemelhar à estrutura da ECM, mas também podem ser modificados para facilitar a liberação sustentada de agentes quimiotáticos e angiogênicos. Hidrogéis que são preparados por auto-montagem de peptídeos podem ser usados como matrizes para aumentar a adesão e proliferação celular (FUKUSHIMA *et al.*, 2019; LIU *et al.*, 2022).

De modo geral, em aplicações na engenharia tecidual, a conexão biológica entre o biomaterial e as células é controlada pelas propriedades dos materiais e pelas características finais do biomaterial. Por isso, materiais utilizados para a fabricação de scaffolds ou hidrogéis devem ter a capacidade de induzir propriedades antimicrobianas e funcionalidade específica, além de propriedade química adequada para estimular o bio-reconhecimento molecular das células. Aspectos importantes como, fácil manuseio, rápida implantação, baixa viscosidade devem ser considerados, e mais importante, os scaffolds devem ter excelentes propriedades antibacterianas e antimicrobianas para evitar o crescimento de bactérias endodônticas residuais, bem como propriedades de degradação fisiológica visando uma substituição controlada por uma ECM (AYALA-HAM *et al.*, 2021; MEDINA-FERNANDEZ; CELIZ, 2019). E ainda, mas não menos importante, esses biomateriais quando aplicados para endodontia regenerativa devem apresentar o máximo de capacidade anti-inflamatória possível (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020b).

Os biomateriais como scaffolds e hidrogéis podem apresentar a seguinte forma: naturais, sintéticos e híbridos. Com design dependente da aplicação, podendo ser: géis, injetáveis, esponjosos, fibrosos, nanoparticulados, com microesferas, macro e micro e nanoporosos, impressos em 3D (AYALA-HAM *et al.*, 2021). Além de promover e induzir de forma sustentável a regeneração e o reparo dos tecidos, os scaffolds podem estar na forma de nanotransportadores para a entrega de fármacos ou moléculas bioativas, com uma liberação controlada em locais de interesse para avaliação da eficiência do tratamento (CAO *et al.*, 2021). Scaffolds e hidrogéis naturais podem ser formados principalmente de agarose, alginato, quitosana, hialurônico, fibrina e colágeno (MOUSSA; APARICIO, 2019).

Scaffolds naturais como quitosana, são amplamente aplicados, compostos de aminoácidos polissacarídeos, seus produtos residuais não são tóxicos nem imunogênicos, podendo facilmente ser modificada ou acoplada a várias moléculas ou proteínas que potencializam o efeito de reparo (TAMURA *et al.*, 2011). Quando combinada com fibrina, a quitosana mostrou excelente capacidade de manter a viabilidade de células tronco da polpa (DPSCs), com efeito antibacteriano importante contra *Enterococcus faecalis* (DUCRET *et al.*, 2019). O colágeno é uma grande família de proteínas de matrix extracelular e amplamente distribuídos na natureza (WAN *et al.*, 2021). Apresenta estrutura

biológica altamente organizada, têm sido usados na forma de scaffolds de colágeno puro ou combinados com outros materiais naturais ou sintéticos, promovem a proliferação e diferenciação de células-tronco dentárias (JIANG *et al.*, 2017; WAN *et al.*, 2021). Os sintéticos são um grupo de materiais que possuem termoestabilidade e durabilidade em comparação com os naturais. Compostos como ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), ácido poli-l-lático (PLLA) e polilático-glicólico (PLGA), permitem manipulação precisa de suas propriedades, são do tipo biocompatível e biodegradável (LIU *et al.*, 2022; YELICK, 2017). O PLA pode ser conjugado com polietilenoglicol (PEG) que é muito utilizado em estruturas devido sua hidrofilicidade, ou seja, apresenta interação de estruturas polares e a água, baixo teor de adesão de proteínas. O álcool polivinílico (PVA), apresenta alto índice de polidispersidade são biocompatíveis e sensíveis a mudança de PH. O peptídeo multidomínio (MDPh), mostra compatibilidade com a polpa dentária e estimula os odontoblastos a serem esteticamente ativos (COLOMBO *et al.*, 2014).

Devido à alta diversidade da microflora endodôntica, scaffolds com elevadas propriedades antimicrobianas ou anti-inflamatória são requeridos. Identificar a fonte de bactérias pode auxiliar nas estratégias de prevenção dos tecidos em desenvolvimento após os procedimentos regenerativos (FOUAD, 2020). Nesse contexto, táxons bacterianos que podem interferir no crescimento do tecido e causar falha no tratamento, pode-se incluir os anaeróbios gram-negativos, como *Fusobacterium* spp., *Treponema* spp., *Prevotella* spp., *Porphyromonas* spp., bem como organismos gram-positivos *Streptococcus* spp., *Parvimonas* spp., *Propionibacterium* spp., *Actinomyces* spp., e *Eubacterium* spp (CHÁVEZ DE PAZ VILLANUEVA, 2002; FOUAD, 2020; LEITE *et al.*, 2015). Além disso, *Enterococcus faecalis* não foi identificado apenas como uma espécie bacteriana prevalente em casos de doença persistente (ZHANG *et al.*, 2015), mas também por promover a sobrevivência de outras bactérias no ambiente endodôntico e sua resistência ao tratamento (FOUAD, 2020; MÖLLER *et al.*, 2004). Ao grande espectro de bactérias que pode influenciar nos tratamentos endodônticos, a prevenção contra o esse crescimento pode estar associada com o uso de fármacos ou composições bioativas, aliadas ao tipo de material utilizado nas estruturas e devem ser amplamente investigadas.

Em síntese, uma variedade de tipos de biomateriais já tem sido extensivamente investigado e aplicado no desenvolvimento de scaffolds ou

hidrogéis, para aplicação em procedimentos da regeneração endodôntica (AYALA-HAM *et al.*, 2021; CAO *et al.*, 2021; MOUSSA; APARICIO, 2019). No entanto, um candidato que possua todas as propriedades favoráveis e necessárias para a fabricação e, que possa suportar e guiar com sucesso a regeneração do complexo polpa-dentina (DP) ainda precisa ser identificado. Devido ao imenso potencial e aos avanços na rápida evolução dos biomateriais utilizados em scaffolds para regeneração endodôntica, além da ampla variedade de biomateriais sendo investigados, a presente revisão teve como objetivo fornecer uma visão geral dos biomateriais que vem sendo utilizados na regeneração, e se esses scaffolds quando carregados com fármacos aumentam os efeitos antimicrobianos/anti-inflamatórios sobre as células tronco pulpares, verificando assim se podem ser usados como um sistema alternativo para a regeneração da polpa.

1 Objetivo

1.1 Objetivo geral

Assim, o objetivo geral desta revisão de escopo foi avaliar se scaffolds bioativos carregados com fármacos potencializam os efeitos antimicrobianos e ou/anti-inflamatórios sobre as células-tronco pulpares e, verificar se podem ser usados como um sistema alternativo para a regeneração pulpar.

1.1.1 Objetivos específicos

- Mapear os principais estudos que caracterizem efeitos antimicrobianos e ou/anti-inflamatórios de *scaffolds* naturais, sintéticos e híbridos para hDPSCs, carregados ou não com fármacos ou compostos bioativos sobre as células-tronco da polpa.
- Examinar a extensão, alcance e natureza desta evidência;

- Sumarizar e divulgar os dados da investigação e identificar as lacunas da pesquisa existentes sobre este tema.

2 Projeto de pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Projeto de Tese

Bioatividade de novos materiais odontológicos biocerâmicos

Marindia de Almeida Borba

Pelotas, 2020

Marindia de Almeida Borba

Bioatividade de novos materiais odontológicos biocerâmicos

Projeto de Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Biomateriais e Biologia Oral com ênfase em Inovação Tecnológica (área de concentração: Biomateriais e Biologia Oral).

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Adriana Fernandes da Silva.

Coorientador: Prof^º. Dr. Wellington Luiz Oliveira da Rosa

Pelotas, 2020

Marindia de Almeida Borba

Bioatividade de novos materiais odontológicos biocerâmicos.

Qualificação de Tese _____, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutora em Biomateriais e Biologia Oral com ênfase em Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

Área de Concentração: Biomateriais

Data da qualificação: 29/07/2020

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Adriana Fernandes da Silva (Orientadora)
Doutora em Biologia Buco-Dental pela Universidade de Campinas (Unicamp)

Prof. Dr. Eliseu Aldright Münchow
Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Wellington Luiz de Oliveira da Rosa
Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Suplente)
Doutor em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)

Dr^a. Andreza Maria Fabio Aranha (Suplente)
Doutora em Odontologia (Unesp)

Resumo

BORBA, Marindia de Almeida. **Bioatividade de novos materiais odontológicos biocerâmicos; 2020 f.** Projeto de Tese. Qualificação (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Biocerâmicos são amplamente aplicados na área biomédica e odontológica. No início dos anos 90 os biocerâmicos foram inseridos como um novo grupo de materiais dentários, onde as principais indicações para uso são como cimentos, obturadores e seladores. A química desses materiais é baseada no cimento Portland, o maior exemplo é o agregado trióxido mineral (MTA), o primeiro a ser introduzido com sucesso no mercado. Desde então diversas formulações de e produtos similares foram incluídos no mercado, como os com base em silicato de cálcio, que são exemplos de novos cimentos, foram criados com o propósito de melhoria de suas propriedades físico-químicas e biológicas e mecânicas, preparo e tempo de manuseio. Com isso, o uso de estratégias que utilizem princípios biológicos em odontologia é de importância fundamental para que novas opções de tratamentos clínicos possam ser futuramente explorados. O entendimento dos mecanismos moleculares e celulares estimulado por biocerâmicos odontológicos pode ajudar a elucidar os eventos de reparo tecidual, o que pode implicar na melhora dos desfechos clínicos, desde uma perfuração radicular, cirurgia para-endodôntica, lesão de furca, ou mesmo exposição pulpar accidental. Desta forma, o objetivo desse projeto é avaliar o papel bioativo de 2 (dois) novos materiais biocerâmicos quanto a citotoxicidade desses materiais através da viabilidade celular, a capacidade deles de inibir as metaloproteínases 2 e 9 pelo ensaio de zimografia, capacidade deles de estimular a proliferação de novas células endoteliais com ensaio de *sprouting* e também a capacidade antimicrobiana destes, pela técnica de acúmulo de biofilme e microcosmos. Os materiais a serem analisados são provenientes da empresa Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, localizada em Londrina Paraná. Os dois novos biocerâmicos já foram patenteados para comercialização nos Estados Unidos, são eles: *Bio-C Sealer Ion+* e o *Bio-C Repair Ion+*.

Palavras-chave: cimento dentário; silicato de cálcio; materiais biocompatíveis; materiais dentários; biocerâmicas.

Abstract

BORBA, Marindia de Almeida.; **Bioactivity of new bioceramic dental materials; 2020 f.** Thesis Project (Post Degree in Dentistry) – Graduate Program in Dentistry, Faculty in Dentistry, Federal University of Pelotas, 2020.

Bioceramics are widely available in the biomedical and dental fields. In the early 90s, bioceramics were introduced as a new group of dental materials, where the main indications for use are as cements, obturators and selectors. The chemistry of these materials is based on Portland cement, the greatest example being mineral trioxide aggregate (MTA), or the first is successfully introduced to the market. Since then, several formulations and similar products have not been included in the market, such as those based on calcium silicon, which are examples of new cements, were created with the aim of improving their physical, chemical and chemical and chemical and mechanical characteristics, preparation and handling progress. Thus, the use of strategies that use biological methods in dentistry is of fundamental importance for new options of use that can be explored in the future. Understanding the molecular and cellular mechanisms estimated by dental bioceramics can help to clarify technical repair events, or what may imply improvements in clinical outcomes, from root perforation, surgery for endodontics, skin injury or the same accidental pulp exposure. Thus, the objective of this project is to evaluate the bioactive role of 2 (two) new bioceramic materials on the cytotoxicity of these materials through cell viability, a capacity of which is inhibited as metalloproteinases 2 and 9 by the zymography test, proliferation of new endothelial cells with sprout test and also with antimicrobial capacity in them, by the biofilm and microcosm accumulation technique. The materials to be analyzed are from the company Angelus Indústria de Produtos Odontológicas S / A, located in Londrina, Paraná. The two new bioceramics have already been patented for commercialization in the United States, they are: Bio-C Sealer Ion + and Bio-C Repair Ion +.

Key-words: dental cement; tricalcium silicate; biocompatible materials; dental materials; bioceramics.

Lista de tabelas

Tabela 1 Classificação morfológica qualitativa de citotoxicidade dos extratos.....	17
Tabela 2 Cronograma das atividades do projeto de tese.....	27
Tabela 3 Orçamento para o desenvolvimento do projeto de tese.....	27

Lista de abreviaturas e siglas

BHI	Infusão de cérebro coração
CEM	Cimento de mistura enriquecida com cálcio
CO ₂	Dióxido de carbon
DAI	Doutorado para inovação
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
EBA	Cimento de óxido de zinco e eugenol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERRM	Endosequence Root Repair material
EUA	Estados Unidos da América
h	Horas
ICT'S	Instituições de Ciência e Tecnologia
IRM	Material restaurador temporário
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
min	Minutos
MMPs	Metalloproteinasas
MTA	Agregado de trióxido mineral
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difenil tetrazólio
NEM	N-etil—maleimida
NTcels	Número total de células
PBS	Solução tampão fosfato
RPM	Rotações por minute
UFC	Unidades formadoras de colônias

Sumário

Introdução	9
1 Projeto DAI	14
2 Objetivos	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 Hipótese	16
4 Materiais e métodos	16
4.1 Materiais.....	16
4.2 Metodologia.....	17
4.2.1 Ensaio de biocompatibilidade.....	17
4.2.1.1 Ensaio de viabilidade celular	17
4.2.2 Ensaio de inibição de metaloproteínases.....	20
4.2.2.1 Potencial de inibir MMP-2 e 9 através da técnica de zimografia.....	20
4.2.3 Ensaio angiogênico.....	21
4.2.4 Ensaio microbiológicos.....	22
4.2.4.1 Ensaio de monocultura – Acúmulo de biofilme de <i>Streptococcus mutans</i> sobre os biocerâmicos.....	22
4.2.4.2 Modelo de microcosmos – Efeito antimicrobiano dos biocerâmicos..	24
4.2.4.3 Verificação do acúmulo de biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	25
4.2.5 Análise estatística.....	26
5 Cronograma de Execução	27
6 Orçamento do projeto	27
Referências	28

Introdução

Os materiais cerâmicos são compostos formados entre elementos metálicos e não metálicos. Geralmente são óxidos, nitretos e carbetos, podendo ser divididos em dois grandes grupos: as cerâmicas tradicionais que são as porcelanas, vidros, tijolos, abrasivos; e o grupo das cerâmicas avançadas que são as eletrônicas, refratários avançados, biocerâmicas (ABC, 2011a, CALLISTER, 2012). O autor ainda descreve que as cerâmicas são materiais inorgânicos e de natureza cristalina, possuindo uma estrutura pouco simétrica quando comparado à estrutura dos metais por exemplo. Estruturas cristalinas são formadas a partir de ligações covalentes, ligações iônicas e interações de ambas.

Dentro do universo das cerâmicas, as com ligação covalente são as que manifestam melhores propriedades mecânicas. Nessa classe das propriedades mecânicas, têm-se as biocerâmicas, uma cerâmica que exige alto grau de resistência à tração, à compressão e elevada dureza. As biocerâmicas vêm sendo estudadas desde o século XVIII com o uso de porcelanas para coroas dentárias, já na década de 20 houve o incremento do gesso na ortopedia como preenchimento ósseo, mas devido sua fragilidade e baixa resistência ao desgaste não obteve sucesso clínico (CHEVALIER; GREMILLARD, 2009).

No sentido de obter sucesso clínico almejado, criou-se um material que apresentasse simultaneamente uma interface estável com tecido conjuntivo e um bom comportamento mecânico do implante com o tecido (HENCH, 1998). Conforme relatos de Oréfice e Park (2008), a primeira biocerâmica implantada e patenteada data do ano de 1965, sua aplicação foi como próteses totais de quadris, mas esta prótese ainda não satisfazia as necessidades, se fazia necessário um biomaterial mais estável. Na década de 70 surgiu um novo conceito que tinha como propósito uma nova maneira de se estabelecer a definição de biocompatibilidade dando origem a uma nova classe de biomateriais: os materiais bioativos. Este conceito foi baseado na procura de materiais idealmente dominados inertes, não apresentando respostas inflamatórias ou infecciosas no local do implante (ORÉFICE et al., 2008; PARK, 2008).

Esse novo conceito foi apresentado por Larry Hench, os biomateriais foram produzidos propondo uma nova compreensão de biocompatibilidade, gerando melhores próteses e a interface desejada, esses biomateriais foram classificados em: materiais bioinertes, que são ignorados pelos tecidos vizinhos diminuindo assim a

probabilidade inflamatória; e bioativa, que apresentam a função de provocar resposta biológica específica na interface com o tecido (HENCH, 1998; CHEVALIER et al., 2009).

Atualmente materiais biocerâmicos são amplamente aplicados na área biomédica e odontológica. Biocerâmica é uma terminologia que se refere a cerâmica projetada para interagir com o sistema biológico e aplicada para usos biomédicos, seja para usos terapêuticos como implantes, reparos, aprimoramentos, veículos de administração de medicamentos, adjuvantes de vacinas ou diagnósticos (ANA et al., 2018). Conforme os autores, além de ser considerada entre os materiais mais antigos utilizados pelo homem, a biocerâmica também representa a cerâmica funcional. Isso ocorre porque muitas cerâmicas são conhecidas e foram desenvolvidas para obter propriedades biocompatíveis, e extensivamente utilizadas para diversos fins como citado anteriormente.

Apesar dos materiais biocerâmicos serem estudados desde o século XVIII (CHEVALIER et al., 2009), apenas no início dos anos 90 foram inseridos como um novo grupo de materiais dentários materiais à base de biocerâmicos, as principais indicações para uso são como cimentos, obturadores e seladores. Esses materiais apresentam-se com uma ampla gama de versões no mercado, sua química é baseada no cimento Portland. Um dos grandes exemplos é o agregado de trióxido mineral (MTA), foi o primeiro a ser introduzido com sucesso no mercado, membro da família do silicato de cálcio (DUTTA; SAUNDERS, 2014; SURYA RAGHAVENDRA et al., 2017). O pó de MTA consiste em partículas finas hidrofílicas que se fixam na presença de água. A patente original traz os seguintes constituintes: silicato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato tricálcico e aluminoferrato de tetracálcio com pó de óxido de bismuto adicionado como agente radiopacificante (TORABINEJAD; WHITE, 1993, 1995). O material então introduzido pelo Dr. Torabinejad em 1993, era osteocondutor, indutivo e biocompatível (SURYA RAGHAVENDRA et al., 2017).

O primeiro material biocerâmico produto de MTA a ser comercializado foi “ProRoot MTA”, tornou-se disponível nos Estados Unidos em 1999. Posteriormente foram introduzidos vários produtos similares de diversas marcas comerciais. Devido a variabilidade desses biocerâmicos ou híbridos no mercado após o surgimento do MTA e, também as indicações variadas para o uso desses biocerâmicos, os materiais apresentaram diferenças que afetaram em especial suas propriedades. Com isso exigiu-se o desenvolvimento de novas formulações para facilitar melhorias de suas

propriedades. Outro ponto crucial a modificar-se, foram os riscos percebidos e associados à presença de alumínio, arsênio e metais pesados, componentes do cimento Portland, exigindo assim o desenvolvimento de uma nova família de cimentos à base de cálcio mais puro (CAMILLERI, 2015).

Essas novas formulações não são baseadas em minerais naturais ou processos industriais. Com isso, o silicato de tricálcio substituiu a formulação original do cimento Portland, eliminando o alumínio e oligoelementos. Os novos materiais que foram então desenvolvidos possuem alicerce na química de radiopacificadores e silicato tricálcio (CAMILLERI, 2015), que são reconhecidos pela sua bioatividade e biocompatibilidade (DUTTA; SAUNDERS, 2014). Como exemplo dos novos cimentos de silicato de cálcio, pode-se citar: BioAggregate, Biodentine, cimento de mistura enriquecida com cálcio (CEM), massa de reparação de raiz EndoSequence e material de reparo radicular iRoot BP Plus (BP-RRM). Esses novos biocerâmicos são indicados como cimento selador e cimento reparador, e precisam ser de fácil manipulação e aplicação. Entre as aplicações clínicas pode-se destacar: como cimento obturador em ortograda e retrograda, uso no retratamento endodôntico, na reparação de perfuração radicular, em cirurgia periapical e no capeamento pulpar em terapia pulpar vital (PARIROKH; TORABINEJAD; DUMMER, 2018; SHAMSY *et al.*, 2019) e também regeneração e cicatrização óssea como barreiras apicais, apexificação, apicogênese.

A odontologia está mudando constantemente, devido a introdução a novas técnicas e tecnologias. Avanços na ciência dos materiais proporcionaram nos últimos 20 anos, índices extensos de estudos *in vivo* e *in vitro* envolvendo o MTA. Tem sido demonstrado que o MTA, quando comparado aos tradicionais materiais de preenchimento retrógrado, apresenta propriedades superiores em termos de capacidade de selamento, biocompatibilidade e regeneração tecidual perirradicular. Pesquisas com cultura celular e citotoxicidade apresentaram sua superioridade ao amálgama de prata (OSORIO, 1998; ZHU *et al.*, 2000), IRM (ZHU *et al.*, 2000), cimento Super EBA (OSORIO, 1998; SOUZA *et al.*, 2006), cimento de ionômero de vidro (OSORIO, 1998; SOUZA *et al.*, 2006) e guta-percha (SOUZA *et al.*, 2006). E também, muitos estudos de vazamento de corante e infiltração bacteriana mostraram que o MTA exibiu menos vazamentos que o amálgama, Super EBA e IRM (FISCHER; ARENS; MILLER, 1998; TORABINEJAD *et al.*, 1995b). Entretanto, o longo tempo de preparação relatado da formulação original de MTA (2 h e 45 min) (SURYA RAGHAVENDRA *et al.*, 2017; TORABINEJAD *et al.*, 1995a) se torna uma

preocupação clínica, pois pode desaparecer antes de se estabelecer (KOGAN *et al.*, 2006). Quando em comparação com outros materiais que foram sugeridos como preenchimentos de raiz, como os cimentos IRM e Super EBA, o MTA tem um tempo significativamente maior (TORABINEJAD *et al.*, 1995a).

Outro ponto a ser levado em consideração, em relação ao MTA, são as suas propriedades de manipulação. Por exemplo, ao misturar o MTA com água estéril resulta em uma mistura arenosa e granulada, tornando difícil para entregar ao local da operação e também para condensar adequadamente (KOGAN *et al.*, 2006). Das biocerâmicas atuais, Biodentine é reivindicada por ter propriedades e comportamento mecânico semelhantes à dentina humana, possuindo excelentes propriedades de vedação sem a preparação do dente, não requer procedimento de restauração em duas etapas (SURYA RAGHAVENDRA *et al.*, 2017). Embora este material seja encapsulado e tenha um mix consistente, ainda é um material difícil de usar. Quanto ao tempo, a Biodentine apresenta configuração mais rápida de endurecimento de 9 min, há um risco menor de contaminação bacteriana do que com o MTA (SINGH *et al.*, 2014; SURYA RAGHAVENDRA *et al.*, 2017), ainda assim, é longo quando comparado a outros materiais restauradores. Outros materiais de silicato de cálcio foram desenvolvidos para tentar superar alguns dos problemas observados. Um grupo de materiais de pasta tornou-se disponível recentemente. O *Endosequence Root Repair Material* (ERRM) está disponível em pasta ou em bisnaga pronto para uso. Apresenta propriedades físicas semelhantes ao MTA uma vez definido (SURYA RAGHAVENDRA *et al.*, 2017; WALSH *et al.*, 2014), entretanto, propriedades de manuseio muito melhores. Ainda, estudos *in vitro* mostram a capacidade de selamento comparável ao MTA e Biodentine (Bolhari *et al.*, 2015; SARASWATHI *et al.*, 2015), Endosequence tradicional (ANTUNES *et al.*, 2016; NAIR *et al.*, 2011), BioAggregate (Bolhari *et al.*, 2015), CEM (MORADI; LOMEE; GHARECHAHI, 2015) e iRoot BP Plus (LEAL *et al.*, 2013). E também, todos os materiais biocerâmicos são biocompatíveis e induzem a regeneração tecidual perirradicular em animais (ASGARY; EGHBAL; EHSANI, 2010; CHEN *et al.*, 2015; EDREES *et al.*, 2019; KOHOUT *et al.*, 2015; TABARI *et al.*, 2020) e diferenciação de células humanas (A. SABERI *et al.*, 2016; DE-DEUS *et al.*, 2012; ESCOBAR-GARCÍA *et al.*, 2016; KÜÇÜKKAYA *et al.*, 2016). Cabe citar, nenhum desses materiais exibiu um perfil citotóxico crítico. Dessa forma, materiais dentários que apresentem melhoria em propriedades de manipulação e, mais biocompatíveis podem ser desenvolvidos, o que poderia desempenhar uma

função desejável sem provocar efeitos locais ou sistêmicos indesejáveis e gerar resposta tecidual mais apropriada, otimizando o desempenho clinicamente relevante da terapia.

Foi observado em estudos recentes, uma tendência em pesquisas com MTA e seus derivados e, materiais bioativos (DA ROSA *et al.*, 2018), os autores apresentaram que os países com elevado pedidos de patentes para esses materiais foram os Estados Unidos e Japão, refletindo mercado relevante para esta tecnologia. Através desses resultados, os autores sugerem a necessidade de uma estreita relação entre a universidade e a indústria para melhorar a integração entre o conhecimento científico e tecnológico.

Sendo assim, esse estudo apresenta como objetivo principal analisar o perfil de biotividade *in vitro* de dois novos biocerâmicos prontos para uso nos Estados Unidos, oriundos da empresa brasileira: Angelus Industria de Produtos Odontológicos S/A (Londrina, Paraná-Brasil), quanto ao seu perfil Bioativo. E ainda, auxiliar a empresa a determinar com mérito científico para justificar novas investigações e aplicabilidade para esses produtos.

1 Projeto DAI

O Programa Doutorado para Inovação (DAI – UFPEL) consiste em contribuir na formação de recursos humanos em nível de pós-graduação para pesquisa aplicada, desenvolvimento tecnológico e inovação. Além de fomentar projetos inovadores que apresentem risco tecnológico, por meio da pesquisa acadêmica, tem como principal objetivo auxiliar as empresas no desenvolvimento ou na melhoria de produtos, processos e serviços que favoreçam avanço de setores econômicos e estratégicos. O programa baseia-se no fortalecimento a pesquisa, empreendedorismo e a inovação nas ICTs por meio do envolvimento de estudantes em projetos de interesse do setor empresarial, mediante parceria Universidade-Empresa. O programa busca criar uma rede de profissionais e alunos de diversas áreas, como Odontologia, Engenharias, Biotecnologia, Farmácia, Química, entre outras, para dessa forma contribuir com as empresas que fazem parte do programa.

O Projeto “*Bioatividade de novos materiais odontológicos biocerâmicos*” – COCEPE 9902, é em conjunto com a empresa Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A situada na cidade de Londrina no estado do Paraná - Brasil, e tem

como principal objetivo caracterizar quanto a bioatividade dois novos biocerâmicos produzidos pela empresa e aprovados para consumo nos Estados Unidos (EUA). O projeto visa o uso de estratégias que utilizem princípios biológicos em odontologia e, é de importância fundamental para que novas opções de tratamentos clínicos possam ser futuramente exploradas. O estudo dos mecanismos moleculares e celulares estimulados por biocerâmicos odontológicos pode ajudar a elucidar os eventos de reparo tecidual, o que pode vir a implicar em uma melhora dos desfechos clínicos, desde uma perfuração radicular, cirurgia paraendodôntica, lesão de furca, ou mesmo exposição pulpar accidental. Com isso, além de avaliar o papel biotivo de dois novos materiais biocerâmicos quanto a capacidade deles de estimular a proliferação de novas células endoteliais, potencial de inibir metaloproteinases, propriedades antimicrobianas, consiste também em investigar novas aplicabilidades auxiliando e traçando objetivos juntamente com a empresa.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Esse projeto tem o objetivo de investigar o perfil bioativo de dois novos biocerâmicos prontos para uso, oriundos da empresa de materiais dentários Angelus S/A.

2.2 Objetivos Específicos

Analisar:

- 1) a biocompatibilidade dos biocerâmicos através de ensaio de citotoxicidade
- 2) o desfecho de inibição de metaloproteinases 2 e 9 através do método de zimografia;
- 3) a capacidade dos novos materiais de induzirem a angiogênese através de células endoteliais *in vitro* pela técnica de *sprouting*;
- 4) a capacidade antimicrobiana desses produtos pela técnica de acumulação de biofilme e microcosmos.

3 Hipótese

A hipótese a ser testada é a de que os novos biocerâmicos produzidos pela empresa serão biocompatíveis e terão efeito antimicrobiano quando testados.

4 Materiais e Métodos

4.1 Materiais

Os materiais a serem analisados serão dois novos biocerâmicos da empresa Angelus Indústria de Produtos Odontológicos S/A, são eles: *Bio-C Sealer Ion +* e o *Bio-C Repair Ion +*.

4.2 Metodologia

Este trabalho verificará a bioatividade dos materiais em duas partes, ensaios de biocompatibilidade e ensaios microbiológicos.

4.2.1 Ensaios de biocompatibilidade

Os ensaios de biocompatibilidade serão realizados no LNTC-Bio (Laboratório do núcleo de Biologia tecidual e celular no Laboratório de microbiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel)).

4.2.1.1 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade dos biocerâmicos, serão realizados de acordo com ISO 10993 (ISO 10993, 2009). Serão selecionados fibroblastos de camundongos de uma linhagem imortalizada L929, bem como com células tronco de origem da polpa humana (STPH). Os efeitos citotóxicos serão avaliados por meio qualitativos e quantitativos. Na análise qualitativa serão avaliadas as alterações, por exemplo, morfologia geral, descolamento, integridade da membrana. A mudança de morfologia

normal deve ser registrada conforme a tabela 1, de acordo com a ISO 10993 ponto 8.5 (2009) para determinação de citotoxicidade.

Tabela 1 – Classificação morfológica qualitativa de citotoxicidade dos extratos.

Grau	Reatividade	Condições de todas as culturas
0	Nenhuma	Grânulos intracitoplasmáticos discretos, sem lise celular, sem redução do crescimento celular.
1	Fraco	Não mais de 20% das células são redondas, fixadas frouxamente e sem grânulos intracitoplasmáticos, ou mostram alterações na morfologia; células lisadas ocasionais estão presentes; apenas uma ligeira inibição do crescimento observável.
2	Leve	Não mais de 50% das células são redondas, isentas de grânulos intracitoplasmáticos, sem lise celular extensa; não superior a 50% de inibição do crescimento observável.
3	Moderado	Não mais de 70% das camadas celulares contêm células arredondadas ou são lisadas; as camadas celulares não estão completamente destruídas; mais de 50% de inibição do crescimento observável.
4	Forte	Destruição quase completa ou completa das camadas celulares.

Para o cultivo celular

Inicialmente o tubo de criogenia graduado de 4,5 ml contendo a respectiva linhagem será levado à temperatura de 37°C em parcial imersão em banho-Maria (Biopar, Mod BM 03, Brasil) por ± 5 min e a seguir, dentro da capela de fluxo laminar, o conteúdo será adicionado a uma garrafa de cultivo celular de área de superfície 25 cm², a garrafa já deve conter 5 ml de meio *Eagle* modificado por Dulbecco (DMEM) completo à temperatura de 37°C. A garrafa de cultivo será colocada em estufa de 5% CO₂ à 37°C, permanecendo por um período de 3h com a finalidade de promover a adesão celular no fundo da mesma. Ao passar esse período, o meio de cultura contendo DMSO que serve como protetor criogênico, deverá ser removido da garrafa utilizando uma pipeta Pauster estéril acoplada à uma bomba de vácuo (AspiraMax Indústria de Aparelhos Médicos Ltda. Brasil), deverá ser sugado o meio. Com isso, um novo meio de cultura (DMEM, completo) será adicionado à linhagem celular que

permanecera em atmosfera úmida, à 37°C, para obter-se a confluência de aproximadamente 70% da superfície cultivável da garrafa.

Contagem celular

A contagem celular deverá ser realizada antes da realização dos experimentos, para determinar o número de células existentes nos frascos cultivados. O propósito da contagem é identificar o número de células para uma divisão igualitária de células por grupo. O número de células semeadas em cada poço, será de 2×10^4 para a citotoxicidade. Para determinar a contagem celular, as células inicialmente serão lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas do seu substrato, deve-se utilizar 3 ml de solução de tripsina-EDTA (Gibco/Invitrogen) para garrafas de cultivo de 75 cm², por 5 minutos. Deve-se neutralizar a ação da tripsina com a adição de no mínimo a mesma quantidade de meio (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico.

O conteúdo total da garrafa será removido e colocado em um Falcon de 15 ml. O volume celular será ressuspenso com uma pipeta volumétrica de 10 ml, para dessa forma homogeneizar as células no sobrenadante. De cada suspensão celular, 20 µl serão dispensados em um tubo de criogenia. Uma gota dessa mistura será colocada em um hematocítmetro (Labor Optik, Friedchsdorf, Germany), e levado ao microscópio de fase invertido para a realização da contagem. Células com aspecto brilhante e de formato arredondado serão consideradas viáveis, células escurecidas de formato distorcido serão consideradas mortas. O cálculo será realizado com base na fórmula onde o número total de células viáveis contadas nos 4 quadrantes externos será multiplicado por 10^4 (fator de correção do hematocítmetro). Esse valor será dividido pelo número de quadrados contados (nesse caso 4) e multiplicado pelo fator de diluição que é a quantia do meio de cultura adicionado. Com isso, obtém-se quantidade aproximada de células presentes em cada garrafa. O número total de células (NT) presentes no frasco será obtido através da equação abaixo, onde FD é o fator de diluição:

$$NT_{\text{cels}} = \frac{N^{\circ} \text{ total células viáveis} \times FD \times 10^4}{4 (N^{\circ} \text{ quadrados contados})}$$

Em concordância com a quantidade de células viáveis existentes, será calculado o número de células necessárias para o plaqueamento celular, para a realização dos ensaios de citotoxicidade.

Viabilidade celular

Os eludatos dos materiais testados serão utilizados em diferentes concentrações não definidas ainda, todos os procedimentos serão realizados em capela de fluxo laminar. A suspensão das células será plaqueada em uma concentração de 2×10^4 células por poço e distribuídas em placas de cultivo celular (ELISA, Techno Plastic Products) de 96 poços. Cada poço receberá 200 µl de DMEM suplementado com 10% SFB e 1% antibiótico. As placas serão incubadas à 37°C com 5% CO₂ por 24 h, para promover a adesão celular. Após as 24 h, serão retirados 200 µl do meio de cultura de cada poço e adicionados 200 µl/poço das diferentes concentrações testadas de cada material (FERNANDEZ et al., 2010). Nos poços definidos como controles, serão adicionados 200 µl de DMEM com a mesma quantidade de células e seu meio de cultura, será trocado após as primeiras 24 h. Poços preenchidos com DMEM serão usados como “brancos”. Após essas 24 h, será realizada a remoção do meio com os materiais-testes e adicionados 20 µl de MTT (sal tetrazolium [3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5]- difeniltetrazolium brometo) (Sigma/Aldrich) diluídos em 180 µl de DMEM em cada poço (5 mg/ml MTT). As placas serão incubadas em ambiente sem luminosidade por 4 h à 37°C com 5% CO₂. Após, a solução contendo MTT diluído em DMEM será aspirada e solubilizada em 200 µl de Dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil) adicionados a cada poço.

As placas serão levadas a uma mesa agitadora (Biomixer, TS-2000A UDRL Shaker) a uma velocidade de 150 rpm por 10 minutos para a solubilização dos cristais de formazan produzidos pela redução do MTT. Com isso poderá se obter a absorbância, que será medida usando um espectrofotômetro (Thermoplate, TP-Reader) em um comprimento de onda de 540 nm.

4.2.2 Ensaio inibidor de metaloproteinases (MMPs)

4.2.2.1 Potencial de inibir MMP-2 e 9 através da técnica de zimografia

A atividade proteolítica de cada material será examinada em gel de poliacrilamida a 10% contendo 0,05% de gelatina. O meio condicionado pelas MMPs será obtido através da saliva humana conforme estudo prévio (MAKELA et al., 1994), a saliva será misturada ao tampão de amostra (2% SDS; 125mM Tris-HCl (pH 6,8); 10% de glicerol e 0,001% de azul de bromofenol) e então a eletroforese será realizada. O gel será incubado em tampão de revelação que conterá os materiais utilizados no estudo. Será utilizado como controle positivo 0,5% de N-etil-maleimida (NEM) que não inibe a atividade das MMPs, e como controle negativo será utilizado 0,5% de EDTA que é um conhecido inibidor das MMPs, bem como um controle contendo apenas a solução tampão (Tris-CaCl₂) sem nenhum grupo teste.

Após a eletroforese, o gel será lavado duas vezes em Triton X-100 (2%) por 60min a temperatura ambiente e então incubado a 37°C por 24h em tampão 50mM Tris-HCl (a incubação, os géis serão corados com Azul de Coomassie G-250 a 0,05% (Bio Rad, Richmond, CA). A atividade gelatinolítica será detectada como bandas não coradas no gel que ficará corado em azul. Após será feita a análise semiquantitativa das bandas para quantificar a inibição das MMPs pelas diferentes concentrações dos diferentes monômeros utilizados, as bandas serão escaneadas e os valores de transmitância obtidos serão analisados usando o software ImageJ (NIH, Bethesda, MD, EUA). Se for demonstrado algum grau de inibição de alguma das substâncias testes, os dados serão plotados e submetidos à regressão linear.

4.2.3 Ensaio Angiogênico

Serão utilizadas para os ensaios células endoteliais microvasculares da derme humana (HDMEC, Cambrex Corp., East Rutherford, NJ, USA, passagens 7-10) que serão cultivadas em meio de cultura EGM-2MV (500mL) (Cambrex, San Diego, CA, USA), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 5%, hidrocortisona 0,04%, ácido ascórbico 0,1%, proteína recombinante do fator de crescimento semelhante a insulina 1 (R3-IGF-1) 0,1%, sulfato de gentamicina e anfotericina B (GA-1000) 0,1%, proteína recombinante do fator de crescimento fibroblástico (rhFGF-B) 0,4%, proteína recombinante do fator de crescimento vascular endotelial (rhVEGF) 0,1%. Em

normóxia, as células pulpares humanas serão cultivadas em estufa a 37°C com 100% de umidade, 5% de CO₂, 21% O₂ 74% N₂.

Testes de proliferação e formação de tubos capilares in vitro

O efeito in vitro será analisado sobre a proliferação e a formação de estruturas semelhantes a capilares (*sprouts*), pelas células endoteliais (HDMEC). Para a avaliação da angiogênese *in vitro* (*sprouting assay* colágeno tipo I (Vitrogen 100; Cohesion Technologies, Palo Alto, CA, USA)) a 4°C será tamponado com PBS 10X gelado e 0,1M NaOH (concentração de 8:1:1), mantido em gelo. Quando necessário, o pH da solução de colágeno será ajustado para 7,4, adicionando 0,1M de NaOH ou HCl. Em placas de 6 compartimentos, 1,5 mL do colágeno preparado foi colocado em cada compartimento e incubado a 37°C *overnight* para geleificação. Serão implantadas HDMEC (5x10⁴ células) sobre o gel de colágeno em meio de cultura EGM- 2MV já em *overnight*.

O meio condicionado dos dois produtos biocerâmicos serão incorporados no meio celular e será analisado a influência de cada um em estimular ou não o número de capilares em relação ao grupo controle. O número de tubos capilares será contado diariamente em aumento de 100X (Microscópio de contraste de fase, Modelo IMT-2, Olympus Optical Company Co. LTD, Tokyo, Japan), acoplado a uma câmera (Evolution MP Color, Media Cypernectics, US) durante 5 dias. Para a contagem, seis campos de cada compartimento serão selecionados aleatoriamente e os dados serão obtidos de dois compartimentos por tratamento (n = 12). O meio de cultura EGM-2MV será utilizado como controle negativo, sendo que este mesmo meio de cultura suplementado com 50ng da proteína recombinante do VEGF165 (rhVEGF165, BD Transduction Laboratories, San Jose, CA, USA), como controle positivo. Para a avaliação da proliferação e viabilidade das células endoteliais será realizada a análise colorimétrica do WST-1 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany). HDMEC (1x10³ células) serão implantadas em 6 compartimentos por condição em placas de 96 compartimentos e cultivadas a 37°C *overnight* para adesão das células no fundo dos compartimentos.

A taxa de proliferação celular será avaliada em três períodos (24h, 48h e 72h). Após os determinados períodos de tempo, o corante WST-1 (1:10) será adicionado meio de cultura sobre as células e mantido 1 hora a 37°C. Em seguida, as placas

serão analisadas por espectrofotometria com comprimento de onda de 450 nm (Microplate Reader, Tecan, Genios, Austria). As análises da proliferação e formação de tubos capilares pelas células endoteliais serão analisadas e caso, seja obtida uma distribuição que seja considerada fora da normalidade, testes não paramétricos serão utilizados. Os testes estatísticos serão avaliados ao nível de significância de 5%.

4.2.4 Ensaios microbiológicos

Ensaios microbiológicos serão desenvolvidos no Laboratório de Microbiologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFPel.

4.2.4.1 Ensaio de monocultura - Acúmulo de biofilme de *Streptococcus mutans* sobre os biocerâmicos

Reativação de cepas de *Streptococcus. mutans* UA 159

As Cepas de *Streptococcus. Mutans* UA 159 armazenadas a -80°C serão reativadas, e transferidos 100 µl para um tubo estéril contendo 9 ml de LMW mais 1 ml de glicose, e incubados por 18 horas em estufa de CO₂. Após este período, 10 µl da mistura serão transferidos para uma placa de ágar sangue onde se realizará um *streak* do caldo no ágar. A placa será incubada por 24 h em estufa de CO₂ e a partir do crescimento registrado na placa, serão coletadas colônias isoladas. As mesmas serão transferidas para um tubo estéril com 9 ml de LMW mais 1 ml de glicose (*starter*) e incubadas por 18 horas em estufa de CO₂.

Teste de acúmulo de biofilme

Antes de suspender os blocos nas placas será preparado o meio de cultura, onde 100 uL de *starter* será transferido para um tubo contendo 40,5 ml de meio LMW e 4,5 ml de glicose. A mistura será homogeneizada e 2 ml serão transferidos para cada poço da placa. Imediatamente após o procedimento a placa com os discos será incubada em estufa de CO₂ por 24 horas, para permitir a aderência inicial dos microrganismos.

Passado as 24 horas, os blocos serão lavados com solução salina e será trocado o meio. Deve-se então verificar o pH do LMW, e 1 ml do meio será armazenado na geladeira para posterior análise de Ca^{+2} . O mesmo procedimento será realizado após 48 h.

Para a coleta do biofilme, após 72 horas, os blocos serão lavados com solução salina, e será coletado cuidadosamente o biofilme formado nos blocos. Para posterior análise de peso seco de cada diluição realizada, serão coletados 100 μL e repicados em placas de petri contendo meio Agar BHI para análise de UFC (LI, et al., 2009).

Determinação da viabilidade bacteriana de *Streptococcus mutans* nos biofilmes

O bloco com biofilme formado em 72 horas, exposto a solução de sacarose 1% in vitro; será transferido para um eppendorf com 1 mL de solução NaCl 0,9% (salina). Será realizada a sonicação por 30 s a 7 watts para dispensar todo o biofilme na solução salina, serão realizadas diluições seriadas, obtendo assim as diluições de 10x (1), 100x (2), 1000x (3), 10000x (4), 100000x (5) e 1000000x (6). As amostras passaram por plaqueamento em meio ágar BHI, dividindo-as em 6 partes, onde serão colocadas 3 alíquotas (de 20 μL) de cada diluição. A numeração da placa corresponderá à diluição. As placas serão incubadas a 37°C, 10% pCO_2 por 24 h, simulando as condições orais de temperatura e pCO_2 . Após o período de incubação, será realizado a contagem das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). Para estimar as UFC será aplicada a seguinte fórmula:

$$[UFC \times 1000/20] \times \text{diluição}$$

Peso seco do biofilme

No mesmo eppendorf com biofilme e solução salina sonicado, serão retirados 300 μL para outro eppendorf já previamente pesado e codificado. A solução será centrifugada por 5 min, 10000 g a 4°C. O sobrenadante será descartado e o tubo com o precipitado será levado ao dessecador por 24-48 h com P_2O_5 . Será pesado novamente o eppendorf, o peso seco do biofilme em 1 mL será:

$$P_{\text{secofinal}} = (P_{\text{seco eppendorf}} \times 1000) / 300.$$

4.2.4.2 Modelo de microcosmos - Efeito antimicrobiano dos biocerâmicos

Coleta da saliva

A coleta de saliva será realizada através da estimulação por filme de parafina (Parafilm "M"®, American National Can™, Chicago, Illinois, EUA) de um voluntário adulto e saudável (M.S.A.), que não este sob terapia antibiótica por 1 ano. O doador suspenderá a higiene oral por 24h previamente às coletas, que serão realizados no período matutino (em jejum). A saliva será depositada em um coletor graduado estéril e transportada em gelo ao Laboratório de Microbiologia (FO-UFPEL). Uma alíquota de saliva (0,5mL) será separada para quantificação microbiana (UFC/mL). O restante será homogeneizado em agitador de tubos tipo Vortex e imediatamente utilizado como inóculo. Para cada experimento, a coleta de saliva será realizada no momento de sua utilização.

Protocolo de obtenção e crescimento dos biofilmes

A saliva será inoculada sobre os discos do cimento em placas de 24 micro poços, em um volume de 400 µl por poço. Após 1 h em repouso a 37°C, a saliva será delicadamente aspirada da base dos poços, e 1,8 ml de meio DMM (com ou sem sacarose) serão adicionados em cada micro poço. O modelo usado será de regime semi-dinâmico, a adição de DMM com sacarose será efetuada em tempos (6 h) e concentrações (1%) as placas serão incubadas. Após o período de desafio cariogênico os discos serão enxaguados através de imersão em 2 ml de solução salina estéril, inseridos em uma nova placa contendo DMM, e novamente incubados. Os biofilmes serão formados independentemente sobre os discos do cimento suspensos em dispositivos de fio ortodôntico, em cada micro poço. As placas serão incubadas em condição atmosférica de anaerobiose (5-10% CO₂ e menos que 1% O₂) em jarras (Probac do Brasil produtos Bacteriológicos Ltda., Santa Cecília, SP) com geradores de anaerobiose (Anaerobac- Probac) sob temperatura controlada (37°C), e mantida em repouso na incubadora. Os meios, DMM com e sem adição de sacarose, serão renovados diariamente. Após cada renovação, será realizada a leitura de pH (pHmetro – Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP; eletrodo V621 – Analion, Ribeirão Preto, SP) do sobrenadante, individualmente em cada micro poço (FILOCHE; SOMA; SISSONS, 2007). Passado 72 h, os discos de esmalte serão removidos dos poços com pinça estéril, e as bactérias não aderidas serão removidas gentilmente por

lavagem em 2 ml de solução salina estéril (THURNHEER et al., 2003). Os biofilmes serão removidos da superfície do disco com ajuda do sonificador.

4.2.4.3 Verificação do acúmulo de biofilme por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Serão preparados discos dos biocerâmicos, os espécimes serão esterilizados com óxido de etileno, após isso será realizado o condicionamento dos blocos com saliva, descrita no ensaio anterior. Após, 4, 8, 12 e 24h os blocos de cimento de cada grupo serão analisados no MEV (LI et al., 2009).

Preparo de amostras biológicas para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Uma vez retirados do meio de cultura, os discos de biocerâmicos serão enxaguados com Tampão fosfato-salino (PBS) duas vezes por um período de 5 minutos cada. Para a fixação das proteínas, será utilizado glutaraldeído 2,5% em PBS (solução 0,1 M em PBS, pH 7,4) durante 10 minutos. Após a fixação serão enxaguados novamente em PBS duas vezes por 5 minutos cada um. Para fixação de lipídeos será utilizado o tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,05M (pH 6,8) por 60 minutos à temperatura ambiente, em uma capela de biossegurança. Depois da fixação, os espécimes serão lavados com PBS, duas vezes por 5 minutos cada um. Para desidratação das amostras, estes serão lavados duas vezes em concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 80% e 100%) durante 5 minutos. Em seguida as amostras permanecerão durante uma hora em ambiente limpo sobre papel-filtro em temperatura ambiente para secagem. A secagem final será realizada em secador de ponto crítico ou dessecador. Finalmente as amostras serão fixadas em *stubs* para sua posterior metalização (LI et al., 2009).

4.2.5 Análise estatística

O número de repetições em cada avaliação terá como base o cálculo amostral executado previamente a partir de um estudo piloto, adotando-se o poder de teste próximo ou superior a 80%, sendo empregado o programa SigmaStat® (Versão 3.01,

Systat Software Inc., Port Richmond, CA, USA). A partir dos resultados, o método estatístico será escolhido com base na aderência ao modelo de distribuição normal e igualdade de variância. Para todos os testes será considerado estatisticamente significativo o valor $p < 0,05$.

5 Cronograma de execução

Tabela 2- Cronograma das atividades do projeto de tese.

Atividades/Semestre	2019	2020	2021	2024
<i>Cumprimento dos créditos</i>	X	X	X	
<i>Especificação dos objetivos, revisão de metodologia</i>	X	X		
<i>Treinamento para utilização das metodologias</i>	X	X	X	
<i>Revisão de Literatura</i>		X	X	
<i>Cultivo das células endoteliais</i>		X	X	X
<i>Realização das metodologias propostas</i>		X	X	X
<i>Análise dos resultados e testes estatísticos</i>			X	X
<i>Redação de artigos</i>			X	X
<i>Envio para congressos</i>			X	X
<i>Preparo do relatório final</i>				X
<i>Envio para publicação de artigos científicos</i>			X	X
<i>Redação da tese</i>			X	X
<i>Defesa da tese</i>				X

6 Orçamento

Tabela 2 – Orçamento para o desenvolvimento do projeto de tese.

Descrição dos produtos a serem adquiridos*	Quantidade	Custo (unidade)	Custo (total)
Acrilamida Vetec	1 frasco	R\$ 103,73	R\$ 103,73
Marcador de peso molecular	1	R\$ 984,50	R\$ 984,50
Soro Fetal Bovino (Cell biologics Incorporation)	3	R\$ 321,52	R\$ 964,56
Meio Especial para células endoteliais (Lonza)	6	R\$ 674,84	R\$ 4044,20
Meio Ágar BHI	1	R\$ 318,17	R\$ 318,17
NCTC clone 929 [L cell, L-929, derivative of Strain L]	1	R\$ 2154,00	R\$ 2154,00
HaCat – células imortalizadas humana	1	R\$ 4706,00	R\$ 4706,00
Reagentes		R\$ 5700,00	R\$ 5700,00
Luvras para procedimento	4 caixa	R\$ 22,00	R\$ 88,00
Máscara descartável	2 caixa	R\$ 12,00	R\$ 24,00
Inibidores de proteases	1	R\$ 500,00	R\$ 500,00
Microtubo para centrífuga tipo Eppendorf, Cral	1 pacote	R\$ 18,15	R\$ 18,15
Ponteiras de 200µl Axygen	1 pacote	R\$ 35,86	R\$ 35,86
Ponteiras de 1000µl, Axygen	1 pacote	R\$ 38,60	R\$ 38,60
Tubo tipo Falcon 50 ml, Cral	3 pacotes	R\$ 14,08	R\$ 42,24
Tubo tipo Falcon 15 ml, Cral	3 pacotes	R\$ 26,07	R\$ 78,21
Placas de Petri 6cm	caixa	R\$ 150,00	R\$ 150,00
+Os custos serão oriundos da equipe executora		Custo total: R\$ 19.950,00	

Referências

- A. SABERI, Eshagh *et al.* Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 75–80, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.012>
- AFAMI, Marina E. *et al.* Multicomponent Peptide Hydrogels as an Innovative Platform for Cell-Based Tissue Engineering in the Dental Pulp. [S. l.], 2021 a.
- AFAMI, Marina E. *et al.* Ultrashort peptide hydrogels display antimicrobial activity and enhance angiogenic growth factor release by dental pulp stem/stromal cells. **Materials**, [S. l.], v. 14, n. 9, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma14092237>
- AKSEL, H. *et al.* Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Antibiotic-loaded Chitosan Hydrogels as a Potential Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. **Journal of endodontics**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.09.007>
- ALBUQUERQUE, M. T. P. *et al.* Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. **Journal of Dental Research**, [S. l.], v. 1, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034514549809>
- ALIPOUR, Mahdiah *et al.* The Antimicrobial, Antioxidative, and Anti-Inflammatory Effects of Polycaprolactone/Gelatin Scaffolds Containing Chrysin for Regenerative Endodontic Purposes. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2021, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/3828777>
- ALIPOUR, Mahdiah *et al.* Synthesis, characterization, and evaluation of curcumin-loaded endodontic reparative material. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Z. Aghazadeh, Stem Cell Research Center and Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, v. 35, n. 9, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbt.22854>
- ANA, Ika Dewi *et al.* Bioceramics for Clinical Application in Regenerative Dentistry. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 1077, p. 309–316, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_16
- ANTUNES, H. S. *et al.* Sealing ability of two root-end filling materials in a bacterial nutrient leakage model. **International endodontic journal**, [S. l.], v. 49, n. 10, p. 960–965, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12543>
- ASGARY, Saeed; EGHBAL, Mohammad Jafar; EHSANI, Sara. Periradicular Regeneration after Endodontic Surgery with Calcium-enriched Mixture Cement in Dogs. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 837–841, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.005>
- AYALA-HAM, Alfredo *et al.* Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering. **Frontiers in Materials**, [S. l.], v. 8, n. July, p. 1–26, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmats.2021.708945>
- BAKOTA, Erica L. *et al.* Self-Assembling Multidomain Peptide Fibers with Aromatic Cores. **Biomacromolecules**, [S. l.], 2013.
- BANCHS, Francisco; TROPE, Martin. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 30, n. 4, p. 196–200, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00003>
- BECERRA, Patricia *et al.* Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. **Journal of**

Endodontics, [S. l.], v. 40, n. 1, p. 133–139, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.017>

BEKHOUCHE, M. *et al.* Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. **Journal of materials chemistry. B**, England, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/d0tb00989j>

BOTTINO, M. C. *et al.* Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. **Journal of dental research**, [S. l.], v. 92, n. 11, p. 963–969, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034513505770>

CAMILLERI, Josette. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. **Endodontic Topics**, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 31–46, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/etp.12073>

CAO, Huan *et al.* Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. [S. l.], n. November, p. 1–31, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x>

CASTELLAN, Carina S. *et al.* Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [S. l.], v. 4, n. 7, p. 1343–1350, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.05.003>

CHÁVEZ DE PAZ VILLANUEVA, Luis Eduardo. Fusobacterium nucleatum in endodontic flare-ups. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, [S. l.], v. 93, n. 2, p. 179–183, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/moe.2002.120803>

CHEN, Ian *et al.* Healing after root-end microsurgery by using mineral trioxide aggregate and a new calcium silicate-based bioceramic material as root-end filling materials in dogs. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 41, n. 3, p. 389–399, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.005>

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. **Journal of the European Ceramic Society**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1245–1255, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.025>

COLOMBO, John S. *et al.* Dental Pulp Regeneration. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 40, n. 4, p. S6–S12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.019>

COLOMBO, John S.; JIA, Shihai; D'SOUZA, Rena N. Modeling Hypoxia Induced Factors to Treat Pulpal Inflammation and Drive Regeneration. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S19–S25, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.039>

COLOMBO, John S.; JIA, Shihai; D'SOUZA, Rena N. Modeling Hypoxia Induced Factors to Treat Pulpal Inflammation and Drive Regeneration. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S19–S25, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.039>

CUEVAS-SUÁREZ, Carlos Enrique *et al.* Bonding Strength of Universal Adhesives to Indirect Substrates: A Meta-Analysis of in Vitro Studies. **Journal of Prosthodontics**, [S. l.], v. 29, n. 4, p. 298–308, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jopr.13147>

DA ROSA, Wellington L. O. *et al.* Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [S. l.], v. 106, n. 3, p. 1358–1368, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33934>

DARBY, Ian A.; HEWITSON, Tim D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. **Cell and**

Tissue Research, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2461-3>

DE-DEUS, G. *et al.* Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 508–513, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.02003.x>

DIANAT, Omid *et al.* Endodontic repair in immature dogs' teeth with apical periodontitis: blood clot vs plasma rich in growth factors scaffold. **Dental Traumatology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 84–90, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/edt.12306>

DUCRET, Maxime *et al.* Current challenges in human tooth revitalization. [S. l.], v. 28, p. 159–168, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/BME-171637>

DUCRET, Maxime *et al.* Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. **Dental Materials**, England, v. 35, n. 4, p. 523–533, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.01.018>

DUCRET, Maxime; FABRE, Hugo; FARGES, Jean-christophe. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal. [S. l.], p. 1–8, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.017>

DUTTA, Arindam; SAUNDERS, William P. Calcium silicate materials in endodontics. **Dental Update**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 708–722, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.12968/denu.2014.41.8.708>

EDREES, Hadeel Y. *et al.* Induction of Osteogenic Differentiation of. **Materials**, [S. l.], v. 12, p. 2311, 2019.

ERAMO, S. *et al.* Dental pulp regeneration via cell homing. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 51, p. 405–419, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12868>

ESCOBAR-GARCÍA, Diana María *et al.* Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine™) Used as Root-End Filling Materials. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7926961>

EZELDEEN, Mostafa *et al.* Chlorite oxidized oxyamylose differentially influences the microstructure of fibrin and self assembling peptide hydrogels as well as dental pulp stem cell behavior. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84405-4>

FARGES, Jean-christophe *et al.* Human odontoblast-like cells produce nitric oxide with antibacterial activity upon TLR2 activation. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 6, n. June, p. 1–9, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00185>

FERRONI, Letizia *et al.* A Hyaluronan-Based Scaffold for the in Vitro Construction of Dental Pulp-Like Tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, p. 4666–4681, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms16034666>

FISCHER, E. J.; ARENS, D. E.; MILLER, C. H. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. **Journal of endodontics**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 176–179, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80178-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80178-7)

FOUAD, Ashraf F. Contemporary Microbial and Antimicrobial Considerations in Regenerative Endodontic Therapy. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S105–S114, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.030>

FUKUSHIMA, K. A. *et al.* Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration—A systematic review. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 98, p. 182–

194, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.023>

GALLER, K. M. *et al.* A Customized Self-Assembling Peptide Hydrogel for dental pulp tissue engineering. **TISSUE ENGINEERING PART A**, [S. l.], v. 18, p. 176–184, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0222>

GOKER, Funda *et al.* Gene Delivery Therapeutics in the Treatment of Periodontitis and Peri-Implantitis: A State of the Art Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20143551>

JIANG, X.; LIU, H.; PENG, C. Clinical and Radiographic Assessment of the Efficacy of a Collagen Membrane in Regenerative Clinical Trial. **Regenerative endodontics**, [S. l.], p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.04.011>

KAMOCKI, K.; NÖR, J. E.; BOTTINO, M. C. Dental pulp stem cell responses to novel antibiotic-containing scaffolds for regenerative endodontics. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 48, n. 12, p. 1147–1156, 2015 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12414>

KAMOCKI, Krzysztof; NÖR, Jacques E.; BOTTINO, Marco C. Effects of ciprofloxacin-containing antimicrobial scaffolds on dental pulp stem cell viability-In vitro studies. **Archives of oral biology**, [S. l.], v. 60, n. 8, p. 1131–1137, 2015 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.002>

KLIMCZAK, Aleksandra; KOZLOWSKA, Urszula. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells : Their Role in Tissue Homeostasis. **Stem cells international**, [S. l.], v. 2016, 2016.

KOGAN, Paul *et al.* The Effects of Various Additives on Setting Properties of MTA. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 569–572, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.006>

KOHOUT, George D. *et al.* Comparison of quick-set and mineral trioxide aggregate root-end fillings for the regeneration of apical tissues in dogs. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 248–252, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.005>

KÜÇÜKKAYA, Selen *et al.* In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-Based Endodontic Cement as Root-End Filling Materials. **Scientifica**, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/9203932>

KWON, Y.; LIM, E.; MIN, K. Effects of Epigallocatechin-gallate, an Antimicrobial Crosslinking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffold. **TISSUE ENGINEERING PART A**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. S193, 2015.

KWON, Young-Sun *et al.* Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. **Journal of endodontics**, United States, v. 43, n. 2, p. 289–296, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.017>

LAKMAL, Waruna; BDS, Dissanayaka; DDS, Chengfei Zhang. Scaffold-based and Scaffold-free Strategies in Dental Pulp Regeneration. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S81–S89, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.022>

LEAL, Fernanda *et al.* Similar sealability between bioceramic putty ready-to-use repair cement and white MTA. **Brazilian Dental Journal**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 362–366, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302051>

LEE, ESTHER J.; KASPER, F. KURTIS; MIKOS, A. G. Biomaterials for Tissue Engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 323–337, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>

LEITE, Fábio R. M. *et al.* Prevalence of Treponema Species Detected in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-regression Analysis. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 579–587, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.020>

LI, Sandra *et al.* Virus entry inhibition by chlorite-oxidized oxyamylose versus induction of antiviral interferon by poly (I : C). **Biochemical pharmacology**, [S. l.], v. 76, p. 831–840, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.022>

LI, Yuting *et al.* Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. **The Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2015, p. 1–10, 2015.

LIU, He *et al.* Bioactive Materials Biomaterial scaffolds for clinical procedures in endodontic regeneration. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 12, n. July 2021, p. 257–277, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.008>

MA, Lie *et al.* Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. **Biomaterials**, [S. l.], v. 25, p. 2997–3004, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.092>

MCINTYRE, Patrick W. *et al.* The antimicrobial properties, cytotoxicity, and differentiation potential of double antibiotic intracanal medicaments loaded into hydrogel system. **Clinical oral investigations**, Germany, v. 23, n. 3, p. 1051–1059, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2542-7>

MEDINA-FERNANDEZ, Ignacio; CELIZ, Adam D. Acellular biomaterial strategies for endodontic regeneration. **Biomaterials Science**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 506–509, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8bm01296b>

MESCHI, Nastaran; PATEL, Biraj; RUPAREL, Nikita B. Material Pulp Cells and Tissue Interactions. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S150–S160, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.031>

MIRAN, Shayee; MITSIDIS, Thimios A.; PAGELLA, Pierfrancesco. Innovative Dental Stem Cell-Based Research Approaches: The Future of Dentistry. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7231038>

MÖLLER, Åke J. R. *et al.* Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. **European Journal of Oral Sciences**, [S. l.], v. 112, n. 3, p. 207–215, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00135.x>

MORADI, Saeed; LOMEE, Mahdi; GHARECHAH, Maryam. Comparison of fluid filtration and bacterial leakage techniques for evaluation of microleakage in endodontics. **Dental Research Journal**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 109–114, 2015.

MOROTOMI, Takahiko; WASHIO, Ayako; KITAMURA, Chiaki. Current and future options for dental pulp therapy. **Japanese Dental Science Review**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 5–11, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.001>

MOUSSA, Dina G.; APARICIO, Conrado. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin - pulp complex regeneration. [S. l.], n. July 2018, p. 58–75, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/term.2769>

NAIR, Uma *et al.* A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: An in vitro leakage study using Enterococcus faecalis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, [S. l.], v. 112, n. 2, p. e74–e77, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.01.030>

NAKASHIMA, Misako; AKAMINE, Akifumi. The Application of Tissue Engineering to Regeneration of Pulp and Dentin in Endodontics. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 31, n. 10, p. 711–718, 2005.

NAUTA, Tessa D.; HINSBERGH, Victor W. M. Van; KOOLWIJK, Pieter. Hypoxic

Signaling During Tissue Repair and Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], p. 19791–19815, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms151119791>

O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)

OSORIO, Rosa Maria. Cytotoxicity of endodontic materials. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 91–96, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80084-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80084-8)

OUZZANI, Mourad *et al.* Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>

PAGE, Matthew J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. **The BMJ**, [S. l.], v. 372, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>

PALASUK, Jadesada *et al.* Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. **Journal of endodontics**, [S. l.], v. 40, n. 11, p. 1879–1884, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.017>

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M.; DUMMER, P. M. H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part I: vital pulp therapy. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 177–205, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12841>

PETRINO, Joseph A. *et al.* Challenges in Regenerative Endodontics : A Case Series. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 536–541, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.006>

POLAT, Günseli Güven; YILDIRIM, Ceren. The use of platelet rich plasma in the treatment of immature tooth with periapical lesion : a case report. **Restorative dentistry & endodontics**, [S. l.], v. 7658, p. 230–234, 2014.

RADDALL, Gavin; MELLO, Isabel; LEUNG, Brendan M. Biomaterials and Scaffold Design Strategies for Regenerative Endodontic Therapy. [S. l.], v. 7, n. November, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00317>

REDL, H. *et al.* In vitro properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics. **Biomaterials**, [S. l.], v. 4, p. 29–32, 1983.

ROSA, V. *et al.* Dental Pulp Tissue Engineering in. **Journal of dental research**, [S. l.], v. 92, n. 11, p. 970–975, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034513505772>

SAOUD, Tarek Mohamed A. *et al.* Regeneration and repair in endodontics-a special issue of the regenerative endodontics-a new era in clinical endodontics. **Dentistry Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/dj4010003>

SARASWATHI, Devabhaktuni Disha *et al.* A Comparative Evaluation of Sealing Ability of Three Recent Root-End Filling Materials: An In Vitro Study. **Journal of Advanced Oral Research**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 33–39, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2229411220150206>

SHAMSY, Enass *et al.* Evaluation of the apical seal of mineral trioxide aggregate in the absence and presence of Smear Layer. **Journal of Contemporary Dental Practice**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 298–303, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2513>

SINGH, Harpreet *et al.* JBR Journal of Interdisciplinary Biodentine : A Promising Dentin substitute. [S. l.], v. 2, n. 5, p. 1–5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2376-032X>

SOUZA, N. J. A. *et al.* Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 40–47, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.01045.x>

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. PERIAPICAL INFLAMMATORY RESPONSES. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 498–521, 1998.

SURYA RAGHAVENDRA, Srinidhi *et al.* Bioceramics in Endodontics – a Review. **Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry**, [S. l.], v. 51, n. 0, p. 128–137, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17096/jiufd.63659>

TABARI, Mitra *et al.* Biocompatibility of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Different Accelerators: an Animal Study. **Journal of dentistry (Shiraz, Iran)**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 48–55, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.30476/DENTJODS.2019.77826.0>

TAMURA, H. *et al.* Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. [S. l.], v. 84, p. 820–824, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.001>

TORABINEJAD, Mahmoud *et al.* Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 349–353, 1995 a. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80967-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80967-2)

TORABINEJAD, Mahmoud; TURMAN, Michael. Revitalization of Tooth with Necrotic Pulp and Open Apex by Using Platelet-rich Plasma : A Case Report. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 265–268, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.004>

TORABINEJAD, Mahmoud *et al.* Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 109–112, 1995 b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80433-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80433-4)

TRICCO, Andrea C. *et al.* PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): Checklist and explanation. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 169, n. 7, p. 467–473, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/M18-0850>

ULUSOY, A. T. *et al.* Evaluation of Blood Clot , Platelet-rich Plasma , Platelet-rich Fibrin , and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment : **Journal of Endodontics**, [S. l.], p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.02.002>

VERMA, P. *et al.* Effect of Residual Bacteria on the Outcome of Pulp Regeneration in Vivo. **Journal of Dental Research**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 100–106, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034516671499>

VISHWANAT, Lakshmi *et al.* Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. **Journal of Endodontics**, [S. l.], p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.023>

WALSH, Ryan M. *et al.* Evaluation of Compressive Strength of Hydraulic Silicate-based Root-end Filling Materials. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 969–972, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.11.018>

WAN, Mei-chen *et al.* Bioactive Materials Biomaterials from the sea : Future building blocks for biomedical applications. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 4255–4285, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.028>

WIGLER, Ronald *et al.* Revascularization : A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 319–326, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.014>

WILLYARD, C. The secrets of healing without scars. **Nature**, [S. l.], v. 563, 2018.

XU, Yuan *et al.* Scaffold for Tendon Tissue Engineering. **Tissue Engineering PART**

C, [S. l.], v. 19, n. 12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0328>

YELICK, P. C. GelMA-Encapsulated hDPSCs and HUVECs for Dental Pulp Regeneration. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034516682005>

ZHANG, Jun *et al.* Effects of bioactive cements incorporating zinc-bioglass nanoparticles on odontogenic and angiogenic potential of human dental pulp cells. **Journal of Biomaterials Applications**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 954–964, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0885328214550896>

ZHU, Qiang *et al.* Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 404–406, 2000. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004770-200007000-00006>

3 Relatório de campo

A tese foi redigida segundo o Manual de Normas para Dissertações, Teses e Trabalhos Científicos da Universidade Federal de Pelotas de 2019, adotando o nível de descrição em artigos descrita no referido manual, disponível em <https://wp.ufpel.edu.br/sisbi/normas-da-ufpel-para-trabalhos-academicos/>.

O projeto de pesquisa inicial intitulado “Bioatividade de novos materiais odontológicos biocerâmicos” foi apresentado da data de 29 de junho de 2020 e aprovado pela Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Adriana Fernandes da Silva (orientadora), Prof. Dr. Eliseu Aldright Münchow, Prof. Dr. Wellington Luiz de Oliveira da Rosa, Prof. Dr. Rafael Guerra Lund (Suplente), Dr^a. Andreza Maria Fabio Aranha (Suplente), porém, devido a pandemia causada pela disseminação do vírus SARS-CoV-2, causador da doença COVID-19, em março de 2020 as aulas teóricas e práticas foram suspensas, sem previsão de retorno, impossibilitando o uso normal do laboratório e a aplicação do projeto. Uma nova trajetória de pesquisa então se iniciou, agora de forma online, uma scoping review sobre agentes bioativos sobre as células-tronco da polpa.

Essa scoping review intitulada “Anti-inflammatory and antimicrobial scaffolds for dental pulp tissue: A Scoping Review”, é apresentada e redigida na forma de artigo, seguindo os critérios estabelecidos pela revista *Journal of endodontics*, disponíveis em: <https://www.elsevier.com/journals/journal-of-endodontics/0099-2399/guide-forauthors>.

4 Artigo

Anti-inflammatory and antimicrobial scaffolds for dental pulp tissue: A Scoping Review

Marindia de Almeida Borba, Eliseu A. Münchow, Wellington Luiz Oliveira da Rosa, Heloysa Talia Schwengber, Adriana Fernandes da Silva, Cesar Bellinati

Será submetido à revista *Journal endodontics*

Anti-inflammatory and antimicrobial scaffolds for dental pulp tissue: A Scoping Review

Marindia de Almeida Borba MSc¹, Eliseu A. Münchow DDS, MSc, PhD², Wellington Luiz Oliveira da Rosa DDS, MSc, PhD¹, Heloysa Talia Schwengber DDS¹, Adriana Fernandes da Silva DDS, MSc, PhD^{1*}, Cesar Bellinati^{3*}

¹ Graduate Program in Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil

² Department of Conservative Dentistry, School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul, POA, RS, Brazil

³ Director of the Research Sector of the Company Angelus S/A, Londrina, PR, Brazil

*Corresponding author:

Adriana Fernandes da Silva, Graduate Program in Dentistry, Dental School, Federal University of Pelotas

Gonçalves Chaves St., 457/503, Centro

Zip Code: 96015-560

Pelotas, Brazil

E-mail: adrisilvapiva@gmail.com

Abstract

The aim of this scoping review was to gather and map the available evidence regarding the use of antimicrobial scaffolds for pulp regeneration purposes. Two independent and blinded reviewers carried out a comprehensive search in four electronic databases up to April 10th 2021: MEDLINE, Embase, Scopus, and Web of Science. The selection criteria were: 1) studies that evaluated the biological properties (e.g., antimicrobial, antibacterial, and anti-inflammatory) of scaffolds/hydrogels loaded or not with drugs/bioactive molecules; 2) studies that verified the scaffolds effects on human dental pulp stem cells (hDPSCs); and 3) studies that tested the scaffolds having a target to be used for regenerative endodontics. After screening, ten articles met the eligibility criteria and were selected to be part of the study. Overall, the studies consisted mostly of drug-loaded hybrid scaffolds. Six studies tested the effects of drugs such as metronidazole and ciprofloxacin, and only one study verified the scaffold anti-inflammatory property. Most studies verified the antimicrobial properties against *Enterococcus faecalis* bacteria. In general, the studies verified the scaffolds cytotoxicity in hDPSCs, with positive results for cell viability. Scaffolds that did not use medication in their composition may also demonstrate antimicrobial properties, creating a favorable environment for stem cells. The drug-laden scaffolds resulted in antimicrobial properties derived from their composition. In conclusion, it may be understood that the use of drugs and molecules with antimicrobial properties may reduce bacterial growth according to a dosage effect. However, in order to preserve cell viability outcomes, minimal doses of these drugs are indicated. Natural structures such as fibrin and collagen without the use of drugs may result in antimicrobial effects, so these compounds are important candidates for the reduction of pulp inflammation events in the future.

Keywords: Stem cells; dental pulp; tissue engineering; scaffolds; scoping review.

1 Introduction

Regenerative endodontic treatment (RET) is defined as a biologically based procedure designed to replace damaged tissues from the dentin-pulp (DP) complex (CASTELLAN *et al.*, 2011). Currently, this regenerative method has two main strategies: pulp revascularization or tissue regeneration. The former strategy targets pulp regeneration by inducing bleeding from the periapical area with the aid of endodontic files, enriching the intracanal space with a blood clot full of natural fibrin structure and vasculature, as well as numerous cellular and molecular components essential for new tissue formation (KWON; LIM; MIN, 2015) (BANCHS; TROPE, 2004; DUCRET *et al.*, 2019)(SAOUD *et al.*, 2016). Due to using an innate mechanism, pulp revascularization has the benefit of preventing a foreign body immune response, since all the participants in the regeneration process are derived from the patient (DIANAT *et al.*, 2017), and clinical reports have shown a successful scenario for this approach (PETRINO *et al.*, 2010; POLAT; YILDIRIM, 2014; TORABINEJAD; TURMAN, 2011). Despite these positive results, there are still limitations related to this technique, including but not limited to the uncertainty regarding the nature of the regenerated tissues and the lack of long-term evidence in terms of root maturation and dentin walls strengthening (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; BECERRA *et al.*, 2014). In addition, a risk of tooth color change has been reported after pulp revascularization due to the associated antimicrobial therapy needed to combat intracanal infection, i.e., the well accepted triple antibiotic paste (TAP) (PETRINO *et al.*, 2010; POLAT; YILDIRIM, 2014; TORABINEJAD; TURMAN, 2011).

Conversely, tissue engineering is a strategy based on the combination of three main basic elements: stem cells, scaffolds, and cell mediators with bioactive properties. Over the years, several attempts have been made to establish a new method for tissue engineering (FERRONI *et al.*, 2015; KWON; LIM; MIN, 2015; NAKASHIMA; AKAMINE, 2005), and therapeutic strategies are receiving great attention for the DP complex regeneration (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a). Among the tested techniques, the cell-based strategies show promising results (DARBY; HEWITSON, 2016), in which a cellular product consisting of

stem cells is injected into the intracanal space (NAUTA; HINSBERGH; KOOLWIJK, 2014). In tissue engineering applications, the biological connection between scaffold and cells is controlled by the properties of the materials and final scaffold characteristics. Thus, the materials used for the scaffolds production must have the ability of inducing antimicrobial properties and appropriate intrinsic and chemical functionality to stimulate cells molecular bio-recognition, targeting cell proliferation, adhesion, and activation events. Moreover, important aspects such as the easy handling, rapid implantation by the professional, and low viscosity should be considered, and more importantly, the scaffolds must have excellent antibacterial properties to prevent the growth of residual endodontic bacteria as well as physiological degradation properties aiming a controlled replacement by an extracellular matrix (ECM) (BAKOTA *et al.*, 2013; KLIMCZAK; KOZLOWSKA, 2016; MEDINA-FERNANDEZ; CELIZ, 2019). Last but not least, scaffolds used in regenerative endodontics must present anti-inflammatory capacity as much as possible (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a).

Various types of scaffolds have been tested, including natural and synthetic polymers/copolymers, hydroxyapatite/tricalcium phosphate powders, self-assembly peptide systems, and platelet-rich plasma (BAKOTA *et al.*, 2013; GALLER *et al.*, 2012; KLIMCZAK; KOZLOWSKA, 2016; MEDINA-FERNANDEZ; CELIZ, 2019) (**Figure 1**). Of note, none of these scaffolds were found to possess the structural and functional properties of an ideal biomaterial for DP regeneration, warranting the design and development of innovative formulations (KLIMCZAK; KOZLOWSKA, 2016; NAUTA; HINSBERGH; KOOLWIJK, 2014; PAGE *et al.*, 2021). Hence, the purpose of this scoping review was to elucidate if drug-laden scaffolds enhance the antimicrobial/anti-inflammatory effects over pulp stem cells, and to verify whether they can be used as an alternative scaffolding system for pulp regeneration.

2. Methods

2.1. Registration information and research scope

The current scoping review is reported following the *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis extension for Scoping Review* (PRISMA ScR) (PAGE

et al., 2021; TRICCO *et al.*, 2018). The protocol was registered in the Open Science Framework and can be accessed through the following link: <https://osf.io/ykvmz>. The research question was as follows: Do drug-loaded scaffolds enhance the antimicrobial/anti-inflammatory effects over pulp stem cells?

2.2. *Eligibility criteria*

Eligible studies were: (i) studies that evaluated the biological properties (e.g., antimicrobial, antibacterial, anti-inflammatory) induced by scaffolds or hydrogels loaded with drugs or absent from any drug; (ii) studies that verified the foregoing properties on human dental pulp stem cells (hDPSCs); and (iii) studies that tested the scaffolds for application in dental pulp regeneration. The exclusion criteria were: (i) studies that did not use hDPSCs (e.g., studies testing other stem cells lineages); (ii) studies that did not test scaffolds based on natural, synthetic or hybrid composition; (iii) studies that did not show the use of scaffolding or hydrogels for pulp regeneration; (iv) studies that did not evaluate the scaffold antimicrobial or antibacterial or anti-inflammatory properties; and (v) studies with the following design: review, protocol, book chapter, and clinical trial.

2.3. *Primary outcome*

This review aimed to describe the antimicrobial and anti-inflammatory effects of natural, synthetic and hybrid scaffolds to hDPSCs, loaded or not with drugs or bioactive compounds, for pulp regeneration. To that end, the review considered the following main outcomes: for antimicrobial scaffolds, to verify the decrease in the count of bacteria in order to reduce the quantity of residual bacteria in clinical procedures; for the anti-inflammatory property, the target was to verify if the hypoxia-induced cell products can be captured within the hydrogel system and thus become useful in the resolution of pulp inflammation. In this sense, it is essential to resolve pulp inflammation in a timely manner, as the secretion of inflammatory cytokines by damaged cells can cause significant pain and discomfort to the patient.

2.4. *Information sources and search strategy*

A literature search was conducted to identify the available literature evaluating the use of scaffolds in the pulp regeneration until March 15th 2022. Relevant articles were searched and obtained from library sources and the following online databases: MEDLINE (PubMed), SciVerse Scopus, Elsevier's Embase and Web of Science. The research question was adapted from the PECO framework, as follows: (P) Population: dental pulp regeneration; (E) Exposure: scaffolds loaded with drugs/bioactive molecules; (C) Comparison: neat scaffolds without incorporation of any drugs/bioactive molecules; (O) Outcome: biological properties such as antibacterial activity or anti-inflammatory response). The search strategy consisted of the following terms (Supplementary 1 – osf.io/ykvmz). The Mendeley Desktop 1.19.4 Reference Manager (England) was used to group and manage the references and they were exported to Rayyan – a web and mobile app for systematic reviews (OUZZANI *et al.*, 2016) for the articles selection and reading. The references of the selected studies were searched manually for other possible relevant information from studies that could meet the inclusion criteria.

2.5. Selection process

All the articles initially found by the search strategy were screened (titles and abstracts) by two blinded and independent reviewers (MAB and HTS) utilizing the web application Rayyan (Qatar Computing Research Institute, Doha, QA) (OUZZANI *et al.*, 2016). Furthermore, a search for a manual study was carried out, observing the references cited in the included studies. The articles that clearly met the eligibility criteria and those that were uncertain were selected for full-text analysis. The initial inter observer agreement between the two examiners was calculated by Cohen's kappa coefficient ($k = 0.89$). The papers assessed that fulfilled all the eligibility criteria were included in this review, and those that had any disagreement between the two reviewers were clarified through discussion with a third reviewer (AFS).

2.6. Data collection process

Data of interest from the included studies were tabulated and interpreted by two independent reviewers (MAB and HTS) in an Excel spreadsheet (Microsoft Corporation,

Redmond, WA, USA). The other reviewers (AFS and WLOR) crosschecked all the recovered information. For each included study, the following general data were systematically recorded: publication details (authors and year); methodological details (scaffold material, exposure [drug delivery] and trial type [in vitro/ in vivo]); and outcome assessment effect (antimicrobial, antibacterial and anti-inflammatory) over hDPSCs. If it was not possible to find any information regarding these parameters, the corresponding author of the included study was contacted via email to retrieve the missing data. If the authors did not receive any answer in two weeks, then a second email was sent, and only after a month since the first contact, if no response was received, the decision to exclude the study was made.

2.7. Risk of bias assessment

The methodological quality of each included study was assessed by two reviewers according to the parameters published elsewhere (CUEVAS-SUÁREZ *et al.*, 2020). Studies included in the present review were independently assessed for inner methodological risk of bias using Review Manager Software version 5.4.1 (The Nordic Cochrane Center, The Cochrane Collaboration; Copenhagen, Denmark). The risk of the article bias was evaluated according to the description given of the following parameters: blinding of outcome assessment; incomplete outcome data; the use of reference standards; information on the cell medium; information on the cell passage; and other biases. The studies were finally scored as having low risk of bias when attending to at least five items; moderate risk of bias when attending from three to four items; and high risk of bias when attending two or less items.

3. Results

3.1. Search strategy

Figure 2 shows the PRISMA flowchart criteria summarizing the study selection process and the reasons for exclusions. A total of 1,804 potentially relevant articles were initially identified, and after exclusion of 364 duplicates, 1,399 were considered ineligible based on the inclusion criteria. After screening, 41 articles remained and were pre-selected for the full-text analysis by two independent reviewers ($\kappa = 0.89$). The reasons for exclusion are described in

Figure 2. Finally, only 13 articles were selected for this review ($\kappa = 0.90$). The included articles were all published in English and they were published from 2013 to 2021.

3.2. Study selection

The characteristics of the 13 included studies are summarized in **Tables 1** and **2**. They were categorized as per the type of scaffold as natural (AFAMI *et al.*, 2021a; AKSEL *et al.*, 2020; DUCRET *et al.*, 2019; MCINTYRE *et al.*, 2019), synthetic (AFAMI *et al.*, 2021a; BOTTINO *et al.*, 2013; KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015a; PALASUK *et al.*, 2014) and hybrid (ALIPOUR *et al.*, 2021a, 2021b; BEKHOUCHE *et al.*, 2020; COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a; EZELDEEN *et al.*, 2021; KWON *et al.*, 2017). Eleven studies evaluated the scaffolds antimicrobial effect (AFAMI *et al.*, 2021b; AKSEL *et al.*, 2020; ALIPOUR *et al.*, 2021b, 2021a; BEKHOUCHE *et al.*, 2020; BOTTINO *et al.*, 2013; DUCRET; FABRE; FARGES, 2015; EZELDEEN *et al.*, 2021; KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015a; MCINTYRE *et al.*, 2019), whereas only three investigated the anti-inflammatory effect (ALIPOUR *et al.*, 2021b, 2021a; COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a). Concerning the microorganisms tested in the studies, the most frequently reported was *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) (Aksel *et al.*, 2020; Bekhouche *et al.*, 2020; Bottino *et al.*, 2013; Ducret *et al.*, 2019; Kamocki *et al.*, 2015; Kwon *et al.*, 2017; McIntyre *et al.*, 2019; Palasuk *et al.*, 2014), followed by *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) and *Fusobacterium nucleatum* (*F. nucleatum*) (BOTTINO *et al.*, 2013; PALASUK *et al.*, 2014), *Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) (MCINTYRE *et al.*, 2019) and *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) (KWON *et al.*, 2017). Six studies incorporated drugs in the scaffolds (AKSEL *et al.*, 2020; BEKHOUCHE *et al.*, 2020; BOTTINO *et al.*, 2013; KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015b; MCINTYRE *et al.*, 2019; PALASUK *et al.*, 2014), one article used hydrogen peroxide (H_2O_2) to simulate hypoxia (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a), and one article used chlorite-oxidized oxyamylose (COAM) macromolecule cross-linking agent (EZELDEEN *et al.*, 2021), and two articles verified the anti-inflammatory effect through the production of $TNF\alpha$ with the use of lipopolysaccharides of *Escherichia coli* as an inflammation-inducing agent (ALIPOUR *et al.*, 2021b, 2021a).

Most studies verified if the scaffolds were cytotoxic against pulp stem cells, with the exception of one study (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a). In general, scaffolds did not show cytotoxicity to the cells evaluated, resulting in cell viability within the range from 77 to 90% (BEKHOUCHE *et al.*, 2020; BOTTINO *et al.*, 2013; DUCRET *et al.*, 2019; EZELDEEN *et al.*, 2021; KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015b; KWON *et al.*, 2017; MCINTYRE *et al.*, 2019; PALASUK *et al.*, 2014), as shown in **Table 2**. Two articles presented the results of cytotoxicity in absorbance values, and none were cytotoxic to the cells (AKSEL *et al.*, 2020; KWON *et al.*, 2017).

3.3. *Risk of bias of included studies*

The results for the risk of bias for each included study are shown in Figure 3. Information on cell passage and cell environment were the items most reported by the studies (92.3%). Most studies did not use reference standards (~54%). Regarding incomplete reporting of outcome data, most studies had dubious scores (53.9%) and information about blinding of outcome assessment was not clearly identified in all thirteen studies. The studies scored ideally in terms of other biases (84.6%). Overall, most studies scored as having moderate risk of bias (46.2%), followed by high (23.1%) and low (30.7%) risk of bias.

4. Discussion

Endodontic therapeutic processes linked to tissue engineering and designed for dental pulp regeneration are increasingly under investigation, so materials with biocompatible and antimicrobial properties are necessary to improve the predictability of regenerative endodontic treatment (KWON; LIM; MIN, 2015; KWON *et al.*, 2017; WIGLER *et al.*, 2013). The present scope review gathered information on a small number of possible materials options that could be used as scaffolds, thus representing an alternative to conventional treatment. Amongst the different types of scaffolds identified in the article herein, while some demonstrated a natural composition, the others were composed of synthetic or hybrid origins, and the latter derived from the union of natural and synthetic products. No less important, some of the gathered types of scaffolds were added with a variety of drugs and/or bioactive molecules.

One of the key elements in dental pulp tissue engineering is the development and application of scaffolds with biocompatible properties that do not induce any cytotoxic effect to the pulp stem cells. Several review studies have already given a list of scaffolding materials for tissue regeneration, although without attempting for the optimal structural and functional characteristics of the DP complex, thereby highlighting the need for a straightforward investigation on the field towards the best match between scaffold material and cellular response (ERAMO *et al.*, 2018; RADDALL; MELLO; LEUNG, 2019; ULUSOY *et al.*, 2019). Notably, cellular activation of a scaffold leads to the stimulation of specific intracellular signaling pathways that may drive blood clot formation and extracellular matrix remodeling, suggesting that cell adhesion to a scaffold matrix is a key step in triggering tissue regeneration (DUCRET *et al.*, 2017).

Regenerative endodontic methods face several challenges (DUCRET *et al.*, 2017; MOUSSA; APARICIO, 2019). For instance, the induction of dentin secretion by odontoblasts is a difficult task, as well as the preparation of scaffolds with important antibacterial activity without unbalancing biocompatibility (FARGES *et al.*, 2015; MOUSSA; APARICIO, 2019). This is commonly considered an important obstacle to the clinical use of scaffolds during endodontic regenerative treatment. Worth mentioning, studies using an animal model show that persistent microorganisms remaining into the root canal system can hinder the DP regeneration (VERMA *et al.*, 2017). Also, other relevant challenges that must be considered in the future are the scaffolds biological properties, their easiness of handling and storage, and last but not least, their effective costs (DUCRET *et al.*, 2017; DUCRET; FABRE; FARGES, 2015).

Concerning the antimicrobial properties of irrigating solutions typically used during root canal disinfection in conventional endodontics, the use of chlorhexidine or sodium hypochlorite may be tricking for the complete intracanal bacteria elimination. This is firstly due to the complex anatomy of the endodontic intracanal space and due to the deep bacteria penetration into dentinal tubules and bacterial organization in the form of biofilms. Furthermore, studies carried out in animal models have shown that residual bacteria prevent DP regeneration (REDL

et al., 1983; VISHWANAT *et al.*, 2017). Therefore, other strategies should be advocated in order to improve the decontamination of infected root canals. According to the findings herein, this obstacle could be overcome with the loading of antimicrobials drugs or molecules with antibacterial/antimicrobial properties during scaffold projection. In this review the following ingredients added into varying scaffolds were identified with the foregoing target: metronidazole and ciprofloxacin (AKSEL *et al.*, 2020; BOTTINO *et al.*, 2013; KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015b; MCINTYRE *et al.*, 2019; PALASUK *et al.*, 2014), and minocycline (AKSEL *et al.*, 2020) or clindamycin (AKSEL *et al.*, 2020; BEKHOUCHE *et al.*, 2020). Some scaffolds were also based on fibrin/chitosan (AKSEL *et al.*, 2020) or fibrin/poly-(DL)-lactic acid (PLA) nanoparticles (NPs) (BEKHOUCHE *et al.*, 2020), which may demonstrate antimicrobial activity even under the absence of specific drugs. Last, other scaffolds were prepared using polydioxanone (PDSII) (BOTTINO *et al.*, 2013; KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015b; PALASUK *et al.*, 2014) or methylcellulose (MCINTYRE *et al.*, 2019).

Overall, a considerable bacterial reduction was demonstrated within the fibrin/chitosan hydrogel prepared in the study by (AKSEL *et al.*, 2020), regardless of the antibiotic content. In particular, the scaffold loaded with clindamycin nanoparticles resulted in highly drug-dependent dosages against *E. faecalis* (BEKHOUCHE *et al.*, 2020). Another study also inhibited the growth of *E. faecalis* for up to 3 weeks with the use of ciprofloxacin on scaffolding (BOTTINO *et al.*, 2013). Antibiotic paste concentrations based on ciprofloxacin and metronidazole (1, 5 and 10 mg/mL) demonstrated significant antibiofilm effects when compared to the control (drug-free scaffold). However, dentin infected by two species and treated with the scaffolds containing 5 and 10 mg/mL of the drugs had better results than the specimens treated with the less concentrated scaffold (1 mg/mL) (MCINTYRE *et al.*, 2019). Scaffolds containing only metronidazole did not inhibit the growth of *E. faecalis*, *P. gingivalis*, and *F. nucleatum*, although those containing ciprofloxacin resulted in greater inhibition zones, with those created against *E. faecalis* being considerably smaller than the counterparts in *P. gingivalis* and *F. nucleatum* bacteria (PALASUK *et al.*, 2014).

Despite the use of drugs to induce antimicrobial properties, they may affect cell viability and proliferation events. Thus, it would be important to verify the use of these biomaterials without drug loading to investigate their effects on dental pulp stem cells. Amidst the biomaterials without modification with drugs, i.e., the control groups as considered in this review, the fibrin-chitosan framework strongly inhibited the growth of *E. faecalis* without affecting the hDPSCs viability (AKSEL *et al.*, 2020; DUCRET *et al.*, 2019). Moreover, synthetic scaffolds based on polydioxanone (KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015b) resulted in antimicrobial effects (e.g., the growth of *E. faecalis* was inhibited) without affecting the cell viability, which values ranged from 82 to 100% (KAMOCKI; NÖR; BOTTINO, 2015b; PALASUK *et al.*, 2014). Another biomaterial that brought positive results was based on methylcellulose (MCINTYRE *et al.*, 2019), reducing the growth of *E. faecalis* and *P. intermedia* and concomitantly showing cell viability results.

From the studies that did not incorporate antimicrobial drugs into the scaffolds, the study by (EZELDEEN *et al.*, 2021) evaluated a specific type of macromolecule, namely chlorite-oxidized oxyamylose (COAM), which is a polyanionic polysaccharide-derived that acts as a broad-spectrum antibacterial, antiviral, and immunomodulator agent (LI *et al.*, 2008). The previous study found a significant effect of COAM in the hDPSCs viability (EZELDEEN *et al.*, 2021). Of note, the use of these macromolecules did not affect neither the fibrin microstructures nor the cell morphology, probably because fibrin is a natural hydrogel, promoting natural adhesion outcomes (LI *et al.*, 2015). The study by (KWON *et al.*, 2017) evaluated the efficacy of epigallocatechin gallate (EGCG) on the hDPSCs viability and proliferation. EGCC is an antibacterial crosslinking agent, especially with collagen structures. Its effects were derived from concentration levels as minimum as 0.1 and 10 $\mu\text{mol/L}$. In addition, those minimum concentrations did not reduce the biomaterial antibacterial capacity, and it also allowed adequate proliferation events of hDPSCs within the scaffold. In turn, collagen is one of the most popular materials due to its favorable biocompatibility and biodegradability properties (MA *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2013), and it can be used in the form of a hydrogel, which is suitable

for application in the complex structure of the root canal delimited by rigid dentin tissue (ROSA *et al.*, 2013).

Another limitation that may occur with the current scaffolds used for endodontic regeneration is their undefined ability to resolve pulp inflammation, representing a challenge for researchers. Even though the DP complex naturally reacts to injury, forming the so-called restorative dentin bridge that protects the pulp from further damage, this process can be harmful if inflammation persists over time (COLOMBO *et al.*, 2014; COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a; FARGES *et al.*, 2015). In addition, inflammation can also cause tissue damage at the host material-tissue interface (WILLYARD, 2018). Thus, a timely reduction of pulp inflammation becomes an essential task, as the secretion of inflammatory cytokines by damaged cells can cause significant pain and discomfort to the patient, creating an unfavorable microenvironment for pulp healing and reparative dentin (STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998).

The emerging field of regenerative endodontics has encouraged the development and application of targeted therapies that take advantage of the intrinsic healing capabilities of host cells within the dental pulp and the periapical complexes (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; STASHENKO; TELES; D'SOUZA, 1998). The use of hypoxia may be an alternative vehicle, since it is a powerful inducer of repair cues in all types of tissues, including the dental pulp. Remarkably, a trauma- or inflammation-derived injury caused by bacteria incursion may usually cause damage to the tissue vasculature and a reduction in the level of oxygen (NAUTA; HINSBERGH; KOOLWIJK, 2014). This event may specifically induce some populations like the mesenchymal progenitor cells to respond to the hypoxic condition, which could initiate directly the repair process by differentiating into various repair effectors as well as indirectly by promoting resolution through their secretariat modulation of the inflammatory response (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a; NAUTA; HINSBERGH; KOOLWIJK, 2014).

An *in vitro* study evaluated the use of Multidomain Peptides (MDPs) cultivated with human exfoliated deciduous tooth stem cells (SHEDs) with the addition of hydrogen peroxide

(H₂O₂) to induce the hypoxia environment and to verify an anti-inflammatory response (COLOMBO; JIA; D'SOUZA, 2020a). Their results showed that SHEDs formed in three-dimensional low-density MDP constructs were able to respond to simulated hypoxia and to secrete bioactive molecules in their surrounding matrix. The SHEDs formed within the encapsulated constructs showed the ability to modulate inflammation through factors deposited in their encapsulation matrix, even with those that were not exposed to simulated hypoxia conditions. The results demonstrated the ability to convert the phenotype of lipopolysaccharide-stimulated macrophages from a pro-inflammatory to a pro-resolution state, thereby reducing pro-inflammatory markers.

The development of different types of scaffolds is fundamental in tissue engineering procedures, as they provide a three-dimensional environment in which cells can adhere, proliferate, migrate and differentiate (NAKASHIMA; AKAMINE, 2005). The findings gathered from this scope review reveals that the currently used biomaterials, such as fibrin hydrogels and the natural-, synthetic- and hybrid-based scaffolds, incorporated with macromolecules or not, can be used as alternative strategies for endodontic regeneration, promoting the DP complex regeneration. Nevertheless, it is still important to better elucidate the mechanisms by which the hDPSCs regulate hydrogel/scaffold degradation, as well as the events necessary for the replacement of biomaterials with a well-differentiated DP complex, providing structural and functional properties similar to the tissue of origin. Further studies are warranted to investigate the efficiency of such antimicrobial and anti-inflammatory scaffolds, especially against endodontic bacteria housed in the dentinal tubules shelter.

Concerning the quality analysis of the included studies, three items presented a high risk of bias: blinding of outcome assessment, incomplete outcome data, and absence of using reference standards. This high risk of bias results is probably due to the high heterogeneity of the included studies and because they have all an in vitro experimental design. In this review the use of reference standards was considered as an important risk of bias item, which means whether the articles refer to technical standards or other works; of note, this item may be

related to the methodological quality of the included studies. Therefore, this result in question may lead to the non-replicability of studies, showing that it is important to verify their methodological quality. Another important factor was the scarcity of studies that present or verify anti-inflammatory scaffolds, which need to be further investigated in the future.

5. Conclusion

The use of drugs or bioactive molecules with antimicrobial properties during scaffolding reduces bacterial growth according to the dosage. However, to preserve the cellular viability of human dental pulp stem cells, minimal doses of these drugs are necessary, which in some studies ended up in keeping adequate the antibacterial effect. Natural structures based on fibrin and collagen as well as hybrid scaffolds without drug loading can work as antimicrobial structures, preventing the growth of endodontic bacteria; moreover, these biomaterials can induce even an anti-inflammatory response, reducing pulp inflammation. Lastly, the verified scaffolds are not toxic to pulpal cells, contributing to a favorable environment for tissue regeneration of the dentin pulp complex.

References

- A. SABERI, Eshagh *et al.* Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, [S. l.], v. 10, n. 2, p. 75–80, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.012>
- AFAMI, Marina E. *et al.* Multicomponent Peptide Hydrogels as an Innovative Platform for Cell-Based Tissue Engineering in the Dental Pulp. [S. l.], 2021 a.
- AFAMI, Marina E. *et al.* Ultrashort peptide hydrogels display antimicrobial activity and enhance angiogenic growth factor release by dental pulp stem/stromal cells. **Materials**, [S. l.], v. 14, n. 9, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ma14092237>
- AKSEL, H. *et al.* Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Antibiotic-loaded Chitosan Hydrogels as a Potential Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. **Journal of endodontics**, [S. l.], 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.09.007>
- ALBUQUERQUE, M. T. P. *et al.* Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. **Journal of Dental Reserach**, [S. l.], v. 1, n. 10, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034514549809>
- ALIPOUR, Mahdiah *et al.* The Antimicrobial, Antioxidative, and Anti-Inflammatory Effects of Polycaprolactone/Gelatin Scaffolds Containing Chrysin for Regenerative Endodontic Purposes. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2021, 2021 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2021/3828777>
- ALIPOUR, Mahdiah *et al.* Synthesis, characterization, and evaluation of curcumin-loaded endodontic reparative material. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, Z. Aghazadeh, Stem Cell Research Center and Department of Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran, v. 35, n. 9, 2021 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbt.22854>
- ANA, Ika Dewi *et al.* Bioceramics for Clinical Application in Regenerative Dentistry. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, [S. l.], v. 1077, p. 309–316, 2018.

Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_16

ANTUNES, H. S. *et al.* Sealing ability of two root-end filling materials in a bacterial nutrient leakage model. **International endodontic journal**, [S. l.], v. 49, n. 10, p. 960–965, 2016.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12543>

ASGARY, Saeed; EGHBAL, Mohammad Jafar; EHSANI, Sara. Periradicular Regeneration after Endodontic Surgery with Calcium-enriched Mixture Cement in Dogs. **Journal of**

Endodontics, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 837–841, 2010. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.005>

AYALA-HAM, Alfredo *et al.* Hydrogel-Based Scaffolds in Oral Tissue Engineering. **Frontiers in Materials**, [S. l.], v. 8, n. July, p. 1–26, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.3389/fmats.2021.708945>

BAKOTA, Erica L. *et al.* Self-Assembling Multidomain Peptide Fibers with Aromatic Cores.

Biomacromolecules, [S. l.], 2013.

BANCHS, Francisco; TROPE, Martin. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 30, n. 4, p.

196–200, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00003>

BECERRA, Patricia *et al.* Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. **Journal of Endodontics**, [S. l.],

v. 40, n. 1, p. 133–139, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.017>

BEKHOUCHE, M. *et al.* Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. **Journal of materials chemistry. B**, England, 2020. Disponível em:

<https://doi.org/10.1039/d0tb00989j>

BOTTINO, M. C. *et al.* Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. **Journal of dental research**, [S. l.], v. 92, n. 11, p. 963–969, 2013. Disponível em:

<https://doi.org/10.1177/0022034513505770>

CAMILLERI, Josette. Mineral trioxide aggregate: present and future developments.

Endodontic Topics, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 31–46, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1111/etp.12073>

CAO, Huan *et al.* Current hydrogel advances in physicochemical and biological response-driven biomedical application diversity. *[S. l.]*, n. November, p. 1–31, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00830-x>

CASTELLAN, Carina S. *et al.* Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, *[S. l.]*, v. 4, n. 7, p. 1343–1350, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.05.003>

CHÁVEZ DE PAZ VILLANUEVA, Luis Eduardo. Fusobacterium nucleatum in endodontic flare-ups. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, *[S. l.]*, v. 93, n. 2, p. 179–183, 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1067/moe.2002.120803>

CHEN, Ian *et al.* Healing after root-end microsurgery by using mineral trioxide aggregate and a new calcium silicate-based bioceramic material as root-end filling materials in dogs. **Journal of Endodontics**, *[S. l.]*, v. 41, n. 3, p. 389–399, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.005>

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. **Journal of the European Ceramic Society**, *[S. l.]*, v. 29, n. 7, p. 1245–1255, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.025>

COLOMBO, John S. *et al.* Dental Pulp Regeneration. **Journal of Endodontics**, *[S. l.]*, v. 40, n. 4, p. S6–S12, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.019>

COLOMBO, John S.; JIA, Shihai; D'SOUZA, Rena N. Modeling Hypoxia Induced Factors to Treat Pulpal Inflammation and Drive Regeneration. **Journal of Endodontics**, *[S. l.]*, v. 46, n. 9, p. S19–S25, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.039>

COLOMBO, John S.; JIA, Shihai; D'SOUZA, Rena N. Modeling Hypoxia Induced Factors to Treat Pulpal Inflammation and Drive Regeneration. **Journal of Endodontics**, *[S. l.]*, v. 46, n. 9, p. S19–S25, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.039>

CUEVAS-SUÁREZ, Carlos Enrique *et al.* Bonding Strength of Universal Adhesives to Indirect Substrates: A Meta-Analysis of in Vitro Studies. **Journal of Prosthodontics**, *[S. l.]*,

v. 29, n. 4, p. 298–308, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/jopr.13147>

DA ROSA, Wellington L. O. *et al.* Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, [S. l.], v. 106, n. 3, p. 1358–1368, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33934>

DARBY, Ian A.; HEWITSON, Tim D. Hypoxia in tissue repair and fibrosis. **Cell and Tissue Research**, [S. l.], 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2461-3>

DE-DEUS, G. *et al.* Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 45, n. 6, p. 508–513, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.02003.x>

DIANAT, Omid *et al.* Endodontic repair in immature dogs' teeth with apical periodontitis: blood clot vs plasma rich in growth factors scaffold. **Dental Traumatology**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 84–90, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/edt.12306>

DUCRET, Maxime *et al.* Current challenges in human tooth revitalization. [S. l.], v. 28, p. 159–168, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3233/BME-171637>

DUCRET, Maxime *et al.* Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. **Dental Materials**, England, v. 35, n. 4, p. 523–533, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.01.018>

DUCRET, Maxime; FABRE, Hugo; FARGES, Jean-christophe. Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal. [S. l.], p. 1–8, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.017>

DUTTA, Arindam; SAUNDERS, William P. Calcium silicate materials in endodontics. **Dental Update**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 708–722, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.12968/denu.2014.41.8.708>

EDREES, Hadeel Y. *et al.* Induction of Osteogenic Differentiation of. **Materials**, [S. l.], v. 12, p. 2311, 2019.

ERAMO, S. *et al.* Dental pulp regeneration via cell homing. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 51, p. 405–419, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12868>

ESCOBAR-GARCÍA, Diana María *et al.* Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine™) Used as Root-End Filling Materials. **BioMed**

Research International, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1155/2016/7926961>

EZELDEEN, Mostafa *et al.* Chlorite oxidized oxyamylose differentially influences the microstructure of fibrin and self assembling peptide hydrogels as well as dental pulp stem cell behavior. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em:

<https://doi.org/10.1038/s41598-021-84405-4>

FARGES, Jean-christophe *et al.* Human odontoblast-like cells produce nitric oxide with antibacterial activity upon TLR2 activation. **Frontiers in Physiology**, [S. l.], v. 6, n. June, p. 1–9, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00185>

FERRONI, Letizia *et al.* A Hyaluronan-Based Scaffold for the in Vitro Construction of Dental Pulp-Like Tissue. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 16, p. 4666–4681, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms16034666>

FISCHER, E. J.; ARENS, D. E.; MILLER, C. H. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. **Journal of endodontics**, [S. l.], v. 24, n. 3, p. 176–179, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80178-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80178-7)

FOUAD, Ashraf F. Contemporary Microbial and Antimicrobial Considerations in Regenerative Endodontic Therapy. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S105–S114, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.030>

FUKUSHIMA, K. A. *et al.* Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration—A systematic review. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 98, p. 182–194, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.11.023>

GALLER, K. M. *et al.* A Customized Self-Assembling Peptide Hydrogel for dental pulp tissue engineering. **TISSUE ENGINEERING PART A**, [S. l.], v. 18, p. 176–184, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0222>

GOKER, Funda *et al.* Gene Delivery Therapeutics in the Treatment of Periodontitis and Peri-

- Implantitis: A State of the Art Review. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 14, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/ijms20143551>
- JIANG, X.; LIU, H.; PENG, C. Clinical and Radiographic Assessment of the Efficacy of a Collagen Membrane in Regenerative Clinical Trial. **Regenerative endodontics**, [S. l.], p. 1–7, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.04.011>
- KAMOCKI, K.; NÖR, J. E.; BOTTINO, M. C. Dental pulp stem cell responses to novel antibiotic-containing scaffolds for regenerative endodontics. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 48, n. 12, p. 1147–1156, 2015 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12414>
- KAMOCKI, Krzysztof; NÖR, Jacques E.; BOTTINO, Marco C. Effects of ciprofloxacin-containing antimicrobial scaffolds on dental pulp stem cell viability-In vitro studies. **Archives of oral biology**, [S. l.], v. 60, n. 8, p. 1131–1137, 2015 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.002>
- KLIMCZAK, Aleksandra; KOZLOWSKA, Urszula. Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells : Their Role in Tissue Homeostasis. **Stem cells international**, [S. l.], v. 2016, 2016.
- KOGAN, Paul *et al.* The Effects of Various Additives on Setting Properties of MTA. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 569–572, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.006>
- KOHOUT, George D. *et al.* Comparison of quick-set and mineral trioxide aggregate root-end fillings for the regeneration of apical tissues in dogs. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 41, n. 2, p. 248–252, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.005>
- KÜÇÜKKAYA, Selen *et al.* In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-Based Endodontic Cement as Root-End Filling Materials. **Scientifica**, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/9203932>
- KWON, Y.; LIM, E.; MIN, K. Effects of Epigallocatechin-gallate, an Antimicrobial Crosslinking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffold. **TISSUE ENGINEERING PART A**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. S193, 2015.

KWON, Young-Sun *et al.* Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. **Journal of endodontics**, United States, v. 43, n. 2, p. 289–296, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.017>

LAKMAL, Waruna; BDS, Dissanayaka; DDS, Chengfei Zhang. Scaffold-based and Scaffold-free Strategies in Dental Pulp Regeneration. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S81–S89, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.022>

LEAL, Fernanda *et al.* Similar sealability between bioceramic putty ready-to-use repair cement and white MTA. **Brazilian Dental Journal**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 362–366, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302051>

LEE, ESTHER J.; KASPER, F. KURTIS; MIKOS, A. G. Biomaterials for Tissue Engineering. **Annals of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 42, n. 2, p. 323–337, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10439-013-0859-6>

LEITE, Fábio R. M. *et al.* Prevalence of Treponema Species Detected in Endodontic Infections: Systematic Review and Meta-regression Analysis. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 579–587, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.01.020>

LI, Sandra *et al.* Virus entry inhibition by chlorite-oxidized oxyamylose versus induction of antiviral interferon by poly (I : C). **Biochemical pharmacology**, [S. l.], v. 76, p. 831–840, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.022>

LI, Yuting *et al.* Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. **The Scientific World Journal**, [S. l.], v. 2015, p. 1–10, 2015.

LIU, He *et al.* Bioactive Materials Biomaterial scaffolds for clinical procedures in endodontic regeneration. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 12, n. July 2021, p. 257–277, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.10.008>

MA, Lie *et al.* Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. **Biomaterials**, [S. l.], v. 25, p. 2997–3004, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.092>

MCINTYRE, Patrick W. *et al.* The antimicrobial properties, cytotoxicity, and differentiation

potential of double antibiotic intracanal medicaments loaded into hydrogel system. **Clinical oral investigations**, Germany, v. 23, n. 3, p. 1051–1059, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00784-018-2542-7>

MEDINA-FERNANDEZ, Ignacio; CELIZ, Adam D. Acellular biomaterial strategies for endodontic regeneration. **Biomaterials Science**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 506–509, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c8bm01296b>

MESCHI, Nastaran; PATEL, Biraj; RUPAREL, Nikita B. Material Pulp Cells and Tissue Interactions. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 46, n. 9, p. S150–S160, 2020. Disponível

em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.031>

MIRAN, Shayee; MITSIADIS, Thimios A.; PAGELLA, Pierfrancesco. Innovative Dental Stem Cell-Based Research Approaches: The Future of Dentistry. **Stem Cells International**, [S. l.], v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7231038>

MÖLLER, Åke J. R. *et al.* Apical periodontitis development and bacterial response to endodontic treatment. Experimental root canal infections in monkeys with selected bacterial strains. **European Journal of Oral Sciences**, [S. l.], v. 112, n. 3, p. 207–215, 2004.

Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.2004.00135.x>

MORADI, Saeed; LOMEE, Mahdi; GHARECHAHI, Maryam. Comparison of fluid filtration and bacterial leakage techniques for evaluation of microleakage in endodontics. **Dental Research Journal**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 109–114, 2015.

MOROTOMI, Takahiko; WASHIO, Ayako; KITAMURA, Chiaki. Current and future options for dental pulp therapy. **Japanese Dental Science Review**, [S. l.], v. 55, n. 1, p. 5–11, 2019.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.001>

MOUSSA, Dina G.; APARICIO, Conrado. Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin - pulp complex regeneration. [S. l.], n. July 2018, p. 58–75, 2019. Disponível em:

<https://doi.org/10.1002/term.2769>

NAIR, Uma *et al.* A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: An in vitro leakage study using *Enterococcus faecalis*. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, [S. l.], v. 112, n. 2, p. e74–e77, 2011.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.01.030>

NAKASHIMA, Misako; AKAMINE, Akifumi. The Application of Tissue Engineering to Regeneration of Pulp and Dentin in Endodontics. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 31, n. 10, p. 711–718, 2005.

NAUTA, Tessa D.; HINSBERGH, Victor W. M. Van; KOOLWIJK, Pieter. Hypoxic Signaling During Tissue Repair and Regenerative Medicine. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], p. 19791–19815, 2014. Disponível em:

<https://doi.org/10.3390/ijms151119791>

O'BRIEN, Fergal J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. **Materials Today**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 88–95, 2011. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X)
OSORIO, Rosa Maria. Cytotoxicity of endodontic materials. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 91–96, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80084-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80084-8)

OUZZANI, Mourad *et al.* Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. **Systematic Reviews**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 1–10, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>

PAGE, Matthew J. *et al.* The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. **The BMJ**, [S. l.], v. 372, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>

PALASUK, Jadesada *et al.* Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. **Journal of endodontics**, [S. l.], v. 40, n. 11, p. 1879–1884, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.017>

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M.; DUMMER, P. M. H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part I: vital pulp therapy. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 177–205, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12841>

PETRINO, Joseph A. *et al.* Challenges in Regenerative Endodontics : A Case Series. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 536–541, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.006>

POLAT, Günseli Güven; YILDIRIM, Ceren. The use of platelet rich plasma in the treatment of immature tooth with periapical lesion : a case report. **Restorative dentistry & endodontics**, [S. l.], v. 7658, p. 230–234, 2014.

RADDALL, Gavin; MELLO, Isabel; LEUNG, Brendan M. Biomaterials and Scaffold Design Strategies for Regenerative Endodontic Therapy. [S. l.], v. 7, n. November, p. 1–13, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00317>

REDL, H. *et al.* In vitro properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics. **Biomaterials**, [S. l.], v. 4, p. 29–32, 1983.

ROSA, V. *et al.* Dental Pulp Tissue Engineering in. **Journal of dental research**, [S. l.], v. 92, n. 11, p. 970–975, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034513505772>

SAOUD, Tarek Mohamed A. *et al.* Regeneration and repair in endodontics-a special issue of the regenerative endodontics-a new era in clinical endodontics. **Dentistry Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/dj4010003>

SARASWATHI, Devabhaktuni Disha *et al.* A Comparative Evaluation of Sealing Ability of Three Recent Root-End Filling Materials: An In Vitro Study. **Journal of Advanced Oral Research**, [S. l.], v. 6, n. 2, p. 33–39, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2229411220150206>

SHAMSY, Enass *et al.* Evaluation of the apical seal of mineral trioxide aggregate in the absence and presence of Smear Layer. **Journal of Contemporary Dental Practice**, [S. l.], v. 20, n. 3, p. 298–303, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2513>

SINGH, Harpreet *et al.* JBR Journal of Interdisciplinary Biodentine : A Promising Dentin substitute. [S. l.], v. 2, n. 5, p. 1–5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2376-032X>

SOUZA, N. J. A. *et al.* Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. **International Endodontic Journal**, [S. l.], v. 39, n. 1, p. 40–47, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.01045.x>

STASHENKO, P.; TELES, R.; D'SOUZA, R. PERIAPICAL INFLAMMATORY RESPONSES. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 498–521, 1998.

SURYA RAGHAVENDRA, Srinidhi *et al.* Bioceramics in Endodontics – a Review. **Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry**, [S. l.], v. 51, n. 0, p. 128–137, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17096/jiufd.63659>

TABARI, Mitra *et al.* Biocompatibility of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Different Accelerators: an Animal Study. **Journal of dentistry (Shiraz, Iran)**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 48–55, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.30476/DENTJODS.2019.77826.0>

TAMURA, H. *et al.* Biomedical applications of chitin hydrogel membranes and scaffolds. [S. l.], v. 84, p. 820–824, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.06.001>

TORABINEJAD, Mahmoud *et al.* Physical and chemical properties of a new root-end filling material. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 21, n. 7, p. 349–353, 1995 a. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80967-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80967-2)

TORABINEJAD, Mahmoud; TURMAN, Michael. Revitalization of Tooth with Necrotic Pulp and Open Apex by Using Platelet-rich Plasma : A Case Report. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 37, n. 2, p. 265–268, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.004>

TORABINEJAD, Mahmoud *et al.* Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 21, n. 3, p. 109–112, 1995 b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80433-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80433-4)

TRICCO, Andrea C. *et al.* PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): Checklist and explanation. **Annals of Internal Medicine**, [S. l.], v. 169, n. 7, p. 467–473, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.7326/M18-0850>

ULUSOY, A. T. *et al.* Evaluation of Blood Clot , Platelet-rich Plasma , Platelet-rich Fibrin , and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment : **Journal of Endodontics**, [S. l.], p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.02.002>

VERMA, P. *et al.* Effect of Residual Bacteria on the Outcome of Pulp Regeneration in Vivo. **Journal of Dental Research**, [S. l.], v. 96, n. 1, p. 100–106, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034516671499>

VISHWANAT, Lakshmi *et al.* Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. **Journal of Endodontics**, [S. l.], p. 1–7, 2017. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.023>

WALSH, Ryan M. *et al.* Evaluation of Compressive Strength of Hydraulic Silicate-based Root-end Filling Materials. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 40, n. 7, p. 969–972, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.11.018>

WAN, Mei-chen *et al.* Bioactive Materials Biomaterials from the sea : Future building blocks for biomedical applications. **Bioactive Materials**, [S. l.], v. 6, n. 12, p. 4255–4285, 2021.

Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.04.028>

WIGLER, Ronald *et al.* Revascularization : A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 39, n. 3, p. 319–326, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.014>

WILLYARD, C. The secrets of healing without scars. **Nature**, [S. l.], v. 563, 2018.

XU, Yuan *et al.* Scaffold for Tendon Tissue Engineering. **Tissue Engineering PART C**, [S. l.], v. 19, n. 12, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0328>

YELICK, P. C. GelMA-Encapsulated hDPSCs and HUVECs for Dental Pulp Regeneration. [S. l.], 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/0022034516682005>

ZHANG, Jun *et al.* Effects of bioactive cements incorporating zinc-bioglass nanoparticles on odontogenic and angiogenic potential of human dental pulp cells. **Journal of Biomaterials Applications**, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 954–964, 2015. Disponível em:

<https://doi.org/10.1177/0885328214550896>

ZHU, Qiang *et al.* Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. **Journal of Endodontics**, [S. l.], v. 26, n. 7, p. 404–406, 2000. Disponível em:

<https://doi.org/10.1097/00004770-200007000-00006>

Captions for the Figures

Figure 1 – Chemical composition, types, and forms of biomaterials used in scaffold composition.

Figure 2 – Search flowchart according to the PRISMA statement.

Figure 3 – Review authors' judgments about each risk of bias item for each included study. If the study reported the information requested, it was scored a "+"; if the information was not reported, the study was scored with a "-"; lastly, if the information was not clearly informed, the study was scored a "?".

Declaration of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Table 1. Antimicrobial/antibacterial and anti-inflammatory effects of evaluated scaffolds

Author/year	Country	Type of scaffold	Control (biomaterial)	Concentration off the drug	Microorganism	Test type of specimens	Effect	
							Antimicrobial	Anti-inflammatory
Afami et al., 2021	UK	Synthetic	BiogelxTM-S/RGD	Yes	<i>E. faecalis</i> <i>S. aureaus</i> <i>F. nucleatum</i>	Biofilm and agar diffusion assays/CFU	+	/
Alipour et al, 2021	Iran	Hybrid	Poli-ε-caprolactona/chrysin	—	<i>E. faecalis</i> <i>S. aureaus</i> <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	Agar diffusion assay	+	+
Alipour et al., 2021	Iran	Hybrid	Poli-ε-caprolactona/curcumin	—	<i>E. faecalis</i> <i>S. aureaus</i> <i>A. baumannii</i> <i>P. aeruginosa</i>	Agar diffusion assay	+	+
Aksel et al., 2020	USA	Natural	Fibrin/chitosan	Yes	<i>E. faecalis</i>	CFU/biofilm-infected dentin (BHI)	+	/
Bekhouche et al., 2020	France	Hybrid	Fibrin/PLA	Yes	<i>E. faecalis</i>	Agar diffusion assay/BHI agar plates	—	/
Bottino et al., 2013	USA	Synthetic	Polydioxanone	Yes	<i>P. gingivalis</i> <i>E. faecalis</i>	Biofilm and agar diffusion assays	—	/
Colombo et al., 2020	USA	Hybrid	Multi-domain peptides	—	—	Treated with H ₂ O ₂ to simulate hypoxia	/	+
Ducret et al., 2019	France	Natural	Fibrin/chitosan	—	<i>E. faecalis</i>	BHI agar plates/ CFU	+	/
EzEldeen M et al., 2021	Belgium	Hybrid	Fibrin	Yes	—	—	+	/
Kamocki et al., 2015	USA	Synthetic	Polydioxanone	Yes	<i>E. faecalis</i>	Agar diffusion assay/ BHI agar plates	+	/
Kwon et al., 2017	Korea	Hybrid	Collagen	Yes	<i>S. mutans</i> <i>F. nucleatum</i> <i>E. faecalis</i>	Disc diffusion / BHI	+	/
McIntyre et al., 2018	USA	Natural	Methylcellulose	Yes	<i>E. faecalis</i>	BHI/Biofilm infected dentin	+	/

Palasuk et al., 2014	USA	Synthetic	Polydioxanone	Yes	<i>P. intermedia</i>	Agar diffusion/ BHI agar plates	–	/
					<i>E. faecalis</i>			
					<i>P. gingivalis</i>			
					<i>F. nucleatum</i>			
Wu et al., 2021	China	Hybrid	Calcium Phosphate cement/chitosan /graphene oxide	Yes	<i>E.faecalis</i>	Agar diffusion assay/BHI agar plates/ Biofilm infected dentin/CFU	+	/

+ = scaffold showed antimicrobial or anti-inflammatory activity; – = scaffold had no antimicrobial or anti-inflammatory activity; / = not verified; PLA = poly-lactic acid; CFU= colony forming unit; BHI = brain heart infusion agar; H₂O₂: hydrogen peroxide.

Table 2. Cytotoxicity and cell viability/proliferation effects of the tested scaffolds allocated by type.

Author, Year	Country	Type of scaffold	Type of cells	Control	Biological analyses	Effect (%)
Afami et al., 2021	UK	Synthetic	DPSCs		Cell viability	40-60
Alipour et al. 2021	Iran	Hybrid	DPSCs	DPSCs	Cell viability	60-80
Alipour et al., 2021	Iran	Hybrid	hDPSC	hDPSC	Cell viability	40-60
Aksel et al., 2020	USA	Natural	hDPSC	DPSCs on monolayer	Cell viability	0-20
Bekhouche et al., 2020	France	Hybrid	hDPSC	Hydrogel fibrin	Cell viability	60-80
Bottino et al., 2013	USA	Synthetic	hDPSC	UHMWPE	Cell viability	80-100
Ducret et al., 2019	France	Natural	hDPSC	DP-MSCs/fibrina	Cell viability	60-80
EzEldeen M et al., 2021	Belgium	Hybrid	hDPSC		Cell viability	80-100
Kamocki et al., 2015	USA	Synthetic	hDPSC	Hydrogel fibrin, hydrogel SAP	Cell viability	60-80
Kwon et al., 2017	Korea	Hybrid	hDPSC	UHMWPE	Cell viability	60-80
McIntyre et al., 2018	USA	Natural	hDPSC	hDPSCs;GA	Cell viability	60-80
Palasuk et al., 2014	USA	Synthetic	hDPSC	DAP-Free Hydrogel, Ca(OH) ₂ past.	Cell viability	60-80
Wu et al., 2021	China	Hybrid	hDPSC	Phenol solution	Cell viability	80-100

hDPSC = human dental pulp stem cells; DPSCs = dental pulp stem cells; UHMWPE = Extracts of sterile ultra high molecular; GA = glutaraldehyde;

Values for cell viability:

+ = up to 20%

++ = from 20 to 40%

+++ = from 40 to 60%

++++ = from 60 to 80%

+++++ = from 80 to 100%

APPENDICES

LIST OF FIGURES

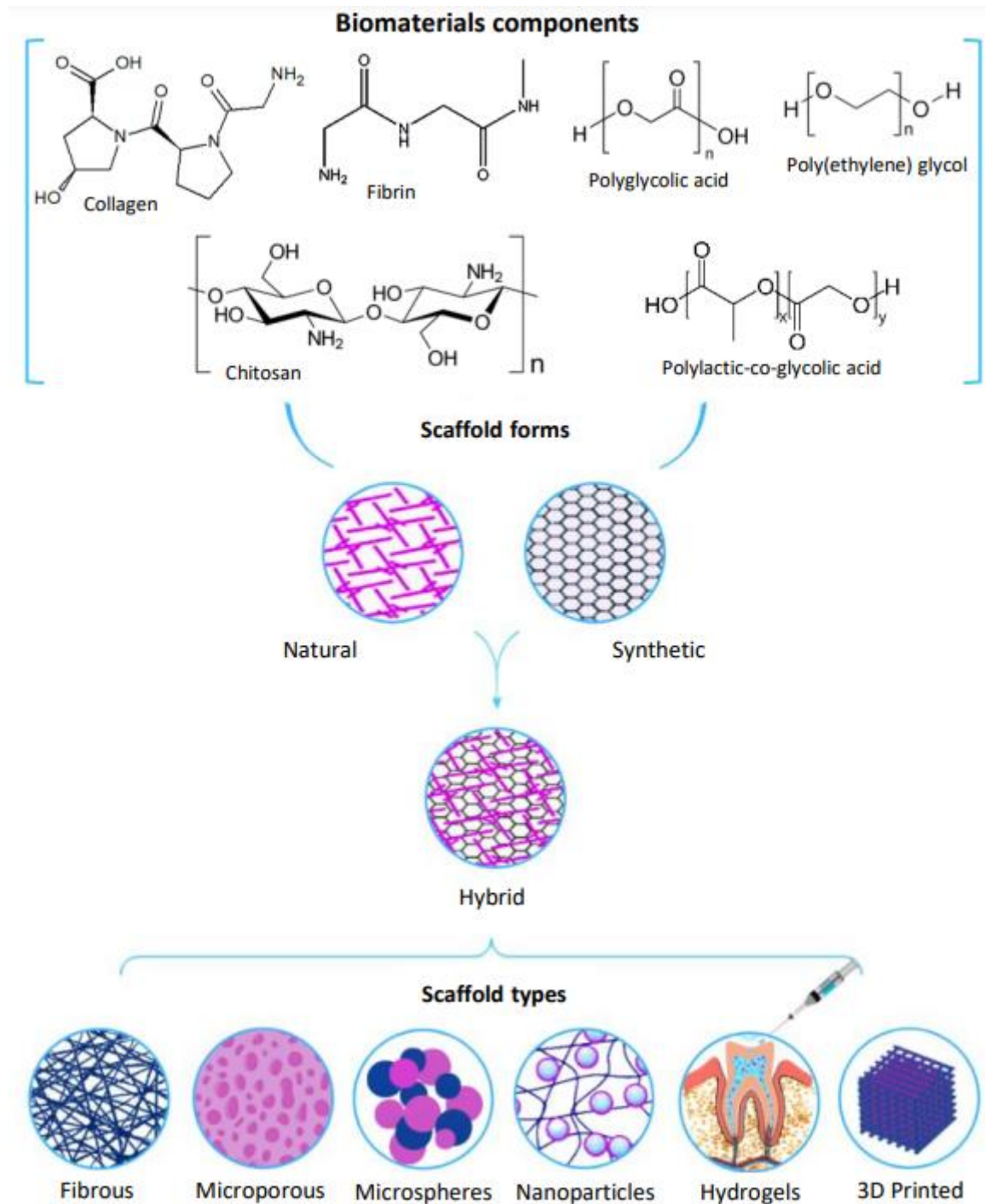
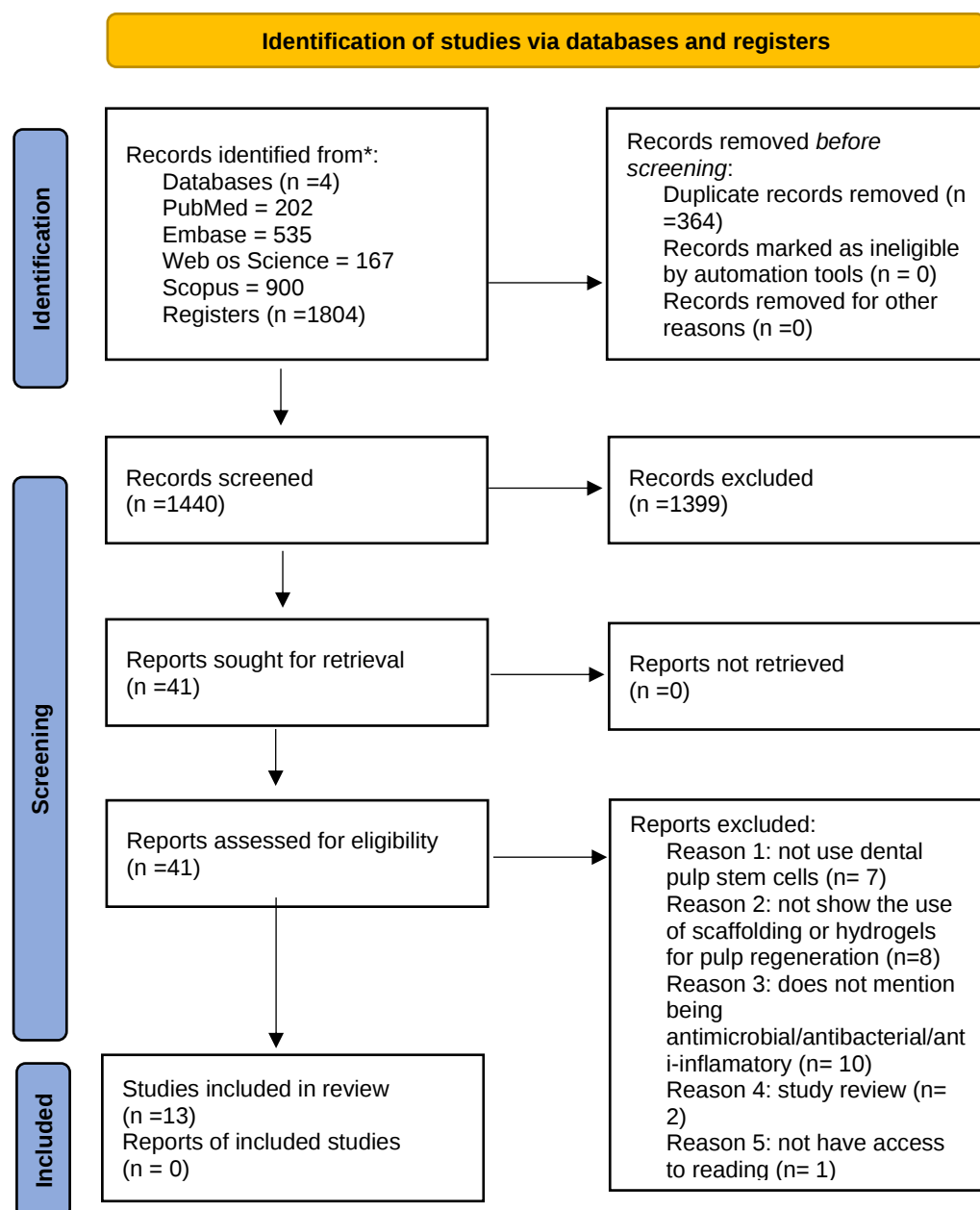


Figure 1 – Chemical composition, types, and forms of biomaterials used in scaffold composition.



*Consider, if feasible to do so, reporting the number of records identified from each database or register searched (rather than the total number across all databases/registers).

**If automation tools were used, indicate how many records were excluded by a human and how many were excluded by automation tools

Figure 2. Selection of studies for systematic review. PRISMA Flow Diagram 2020 [1].

	Blinding of outcome assessment	Incomplete outcome data	Use of reference standards	Information on the cell medium	Information on the cell passage	Other bias	OVERALL RISK OF BIAS
Afami et al., 2021	?	+	+	+	+	+	L
Aksel et al., 2020	?	-	?	+	+	?	H
Alipour(1) et al., 2021	?	+	+	+	+	+	L
Alipour(2) et al., 2021	?	+	+	+	+	+	L
Bekhouche et al., 2020	?	+	-	+	+	+	M
Bottino et al., 2013	?	+	+	+	+	+	L
Colombo et al., 2020	?	?	-	+	+	+	M
Ducret et al., 2019	?	?	-	-	+	?	H
EzEldeen et al., 2021	?	?	-	+	+	+	M
Kamocki et al., 2015	?	?	+	+	+	+	M
Kwon et al., 2017	?	?	-	+	+	+	M
McIntyre et al., 2018	?	?	-	+	-	+	H
Palasuk et al., 2014	?	?	+	+	+	+	M

Figure 3. Risk of bias graph: review authors judgements about each risk of bias item presented as percentages across all included studies.

Lista of tables

Tabela suplementar 1. Tabela suplementar de vocabulário controlado e palavras-chave da busca em cada base de dados

Database	Search terms
	# 5 Search #1 AND #2 AND #3 AND #4
	#4 Search “endodontic, regenerative” OR “endodontics, regenerative” OR “regenerative endodontic” OR “pulp dentin regeneration” OR “pulp vitality” OR “pulpa dental vitality” OR “tooth pulp vitality” OR “dental pulp regeneration” OR “endodontic regeneration” OR “dental tissue regeneration” OR “root canal regenerative” OR “endodontic revascularization” OR “regenerative endodontic treatment” OR “revascularization, endodontic” OR “revitalization, endodontic” OR “endodontic revitalization” OR “pulp capping, dental” OR “pulp capping” OR “capping, pulp” OR “cappings, pulp” OR “pulp cappings” OR “capping, dental pulp” OR “cappings, dental pulp” OR “dental pulp cappings” OR “pulp cappings, dental” OR “pulpitis” OR “inflammation, endodontic” OR “endodontic inflammation” OR “endodontic inflammations” OR “inflammations, endodontic” OR “dental pulp” OR “pulp-dentine complex” OR “acute dental pulpitis” OR “dental pulp inflammation” OR “endodontal infections” OR “endodontal inflammation” OR “endodontic infection” OR “pulp infection” OR “pulpal infection” OR “pulpal inflammation” OR “tooth pulp infection” OR “tooth pulp inflammation” OR “tooth pulpitis” OR “pulp, tooth” OR “dental pulpa” OR “tooth pulp” OR “tooth, pulp” OR “pulpal tissue” OR “tooth pulp” OR “pulp necrosis” OR “root canal infection”
PubMed	#3 Search “scaffold” OR “scaffolds” OR “scaffold, tissue” OR “scaffolds, tissue” OR “tissue scaffold” OR “tissue scaffolding” OR “scaffolding, tissue” OR “scaffoldings, tissue” OR “tissue scaffoldings” OR “natural scaffold” OR “natural scaffolds” OR “polymeric scaffolds” OR “bioceramic scaffolds” OR “nanoadhesive scaffolds” OR “adhesive scaffold” OR “scaffold biomimetic” OR “nanocomposite scaffold” OR “nanocellulose-based scaffolds” OR “nc-based scaffolds” OR “scaffolding approach” OR “based-scaffold” OR “based scaffold” OR “based scaffolds” OR “tissue scaffolds” OR “scaffold blood clot” OR “polysaccharides” OR “polysaccharide” OR “xanthan” OR “alginate” OR “dextran” OR “chitosan” OR “celulose” OR “extracellular matrix” OR “hyaluronic acid” OR “hyaluronan” OR “hyaluronate” OR “proteoglycans” OR “peptides” OR “proteins” OR “silk protein” OR “rhcollagen” OR “collagen” OR “gelatina” OR “fibrina” OR “polymer” OR “polymers natural” OR “biopolymers” OR “biopolymer” OR “polymers synthetic” OR “polylactic acid” OR “pla” OR “pla-peo-pla” OR “pla-peg-pla” OR “polyglycolic acid” OR “pga” OR “polylactide-co-glycolide” OR “plga “ OR “poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate” OR “poly-dto carbonate” OR “poly-1,8-octanediol-co-citrate” OR “peo-phb-peo” OR “gamma-pga” OR “gamma-polyglutamate” OR OR “polymethacrylic acids” OR “methacrylate” OR “calcium phosphates” OR ‘tricalcium phosphate” OR “biphasic calcium phosphate” OR ”poly-aspartamide” OR “poly-ethylene-glycol-glycolic-acid” OR “polymer-cyclodextrin” OR “poly-glycerol-dodecanoate” OR “polystyrenes” OR “polyurethanes” OR “interpenetrating polymer” OR “mineral trioxide aggregate” OR “mta” OR “mta,pcl” OR “mta cement” OR “theracal” OR “mta aggregate” OR “aggregate proroot” OR “proroot aggregate” OR “tricalcium silicate” OR “slow-release artificial tears” OR “fibrin sealant system” OR “sealant system, fibrina” OR “autologous fibrin tissue” OR “fibrin sealant” OR “sealant fibrina” OR “fibrin seal” OR “seal, fibrina” OR “polymeric electrospun nanofibers” OR “electrospun” OR “nanofibers” OR “biomineralization” OR “cell therapy” OR “therapy, cell” OR “biofilms” OR “active biomolecules” OR “cellulose pharmacology” OR “nanostructures chemistry” OR “nanofibrillated celulose” OR “nanocrystalline celulose” OR “biomimetic materials” OR “hydroxyapatite composite” OR “hydroxyapatite” OR “dental regeneration membranes” OR “dental tissue regeneration membrane” OR “hydrogel dental regeneration membrane” OR “puramatrix” OR “chitosan-enriched” OR “collagen synthesis” OR “tissue engineering” OR “fibrin hydrogel”
	#2 Search “anti-infection” OR “anti-infective” OR “anti-infective agentes” OR “agents, anti-infective” OR “anti infective agentes” OR “antiinfective agentes” OR “agents, antiinfective” OR “antiinfective agente” OR “antiinfective agente” OR “microbicides” OR “antimicrobial” OR “antimicrobial ability” OR “antimicrobial cationic peptides” OR “antimicrobial agentes” OR “agents, antimicrobial” OR “anti-microbial agentes” OR “agents, anti-microbial” OR “anti microbial agentes” OR “antimicrobial agente” OR “antimicrobial agente” OR “antimicrobial compound” OR “anti-bacterial agentes” OR “agents, anti-bacterial” OR “anti bacterial agentes”

	OR “anti bacterial agentes” OR 'anti bacterial agente' OR 'antibacterial agents' OR 'antibacterial agente’ OR “antibacterial agente” OR “antibacterial activity” OR “antibiotic” OR “microbicidal agente” OR 'microbicidal agent' OR “microbicidal substance” OR “microbicide” OR “microbiological agent” OR “antibacterial effect” #1 Search “stem cell, mesenchymal” OR “stem cell, mesenchymal” OR “stem cells, mesenchymal” OR “mesenchymal stem cell” OR “mesenchymal stem cell” OR “mesenchymal stromal cells” OR “mesenchymal stromal cell” OR “stromal cell, mesenchymal” OR “stromal cells, mesenchymal” OR “multipotent mesenchymal stromal cells” OR “mesenchymal stromal cells, multipotente” OR “mesenchymal progenitor cells” OR “progenitor cell, mesenchymal” OR “shed” OR “sheds” OR “dpscs” OR “mscs” OR “dental pulp stem cells” OR “dental pulp stem cell” OR “dpSC” OR “stem cells from human exfoliated deciduous teeth” OR “stem cells from human exfoliated deciduous teeth” OR “dental pulp mesenchymal”
Embase	#5 Search #1 AND #2 AND #3 AND #4 #4 Search 'endodontic, regenerative' OR 'endodontics, regenerative' OR 'regenerative endodontic' OR 'pulp dentin regeneration' OR 'pulp vitality'/exp OR 'pulp vitality' OR 'pulpa dental vitality' OR 'tooth pulp vitality'/exp OR 'tooth pulp vitality' OR 'dental pulp regeneration' OR 'endodontic regeneration' OR 'dental tissue regeneration' OR 'root canal regenerative' OR 'endodontic revascularization' OR 'regenerative endodontic treatment' OR 'revascularization, endodontic' OR 'revitalization, endodontic' OR 'endodontic revitalization' OR 'pulp capping, dental' OR 'pulp capping'/exp OR 'pulp capping' OR 'capping, pulp' OR 'cappings, pulp' OR 'pulp cappings' OR 'capping, dental pulp' OR 'cappings, dental pulp' OR 'dental pulp cappings' OR 'pulp cappings, dental' OR 'pulpitis'/exp OR 'pulpitis' OR 'inflammation, endodontic' OR 'endodontic inflammation'/exp OR 'endodontic inflammation' OR 'endodontic inflammations' OR 'inflammations, endodontic' OR 'dental pulp'/exp OR 'dental pulp' OR 'pulp-dentine complex' OR 'acute dental pulpitis'/exp OR 'acute dental pulpitis' OR 'dental pulp inflammation'/exp OR 'dental pulp inflammation' OR 'endodontal infections'/exp OR 'endodontal infections' OR 'endodontal inflammation'/exp OR 'endodontal inflammation' OR 'endodontic infection'/exp OR 'endodontic infection' OR 'pulp infection'/exp OR 'pulp infection' OR 'pulpal infection'/exp OR 'pulpal infection' OR 'pulpal inflammation'/exp OR 'pulpal inflammation' OR 'tooth pulp infection'/exp OR 'tooth pulp infection' OR 'tooth pulp inflammation'/exp OR 'tooth pulp inflammation' OR 'tooth pulpitis'/exp OR 'tooth pulpitis' OR 'pulp, tooth'/exp OR 'pulp, tooth' OR 'dental pulpa'/exp OR 'dental pulpa' OR 'tooth pulpa'/exp OR 'tooth pulp' OR 'tooth, pulp'/exp OR 'tooth, pulp' OR 'pulpal tissue'/exp OR 'pulpal tissue' OR 'tooth pulp'/exp OR 'tooth pulp' OR 'pulp necrosis' OR 'root canal infection'/exp OR 'root canal infection' #3 Search 'scaffold'/exp OR scaffold OR scaffolds OR 'scaffold, tissue'/exp OR 'scaffold, tissue' OR 'scaffolds, tissue' OR 'tissue scaffold'/exp OR 'tissue scaffold' OR 'tissue scaffolding'/exp OR 'tissue scaffolding' OR 'scaffolding, tissue' OR 'scaffoldings, tissue' OR 'tissue scaffoldings' OR 'natural scaffold' OR 'natural scaffolds' OR 'polymeric scaffolds' OR 'bioceramic scaffolds' OR 'nanoadhesive scaffolds' OR 'adhesive scaffold' OR 'scaffold biomimetic' OR 'nanocomposite scaffold' OR 'nanocellulose-based scaffolds' OR 'nc-based scaffolds' OR 'scaffolding approach' OR 'based-scaffold' OR 'based scaffold' OR 'based-scaffolds' OR 'based scaffolds' OR 'tissue scaffolds'/exp OR 'tissue scaffolds' OR 'scaffold blood clot' OR 'polysaccharides'/exp OR polysaccharides OR 'polysaccharide'/exp OR polysaccharide OR 'xanthan'/exp OR xanthan OR 'alginate'/exp OR alginate OR 'dextran'/exp OR dextran OR 'chitosan'/exp OR chitosan OR 'cellulose'/exp OR cellulose OR 'extracellular matrix'/exp OR 'extracellular matrix' OR 'hyaluronic acid'/exp OR 'hyaluronic acid' OR 'hyaluronan'/exp OR hyaluronan OR 'hyaluronate'/exp OR hyaluronate OR 'proteoglycans'/exp OR proteoglycans OR 'peptides'/exp OR peptides OR 'proteins'/exp OR proteins OR 'silk protein'/exp OR 'silk protein' OR rhcollagen OR 'collagen'/exp OR collagen OR 'gelatin'/exp OR gelatin OR 'fibrin'/exp OR fibrin OR 'polymer'/exp OR polymer OR 'polymers natural' OR 'biopolymers'/exp OR biopolymers OR 'biopolymer'/exp OR biopolymer OR 'polymers synthetic' OR 'polylactic acid'/exp OR 'polylactic acid' OR pla OR 'pla-peo-pla' OR 'pla-peg-pla' OR 'polyglycolic acid'/exp OR 'polyglycolic acid' OR 'pga'/exp OR pga OR 'polylactide-co-glycolide'/exp OR 'polylactide-co-glycolide' OR 'plga'/exp OR plga OR 'poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate' OR 'poly-dto carbonate' OR 'poly-1,8-octanediol-co-citrate' OR 'peo-phb-peo' OR 'gamma-pga' OR 'gamma-polyglutamate' OR 'polymethacrylic acids'/exp OR 'polymethacrylic acids' OR 'methacrylate'/exp OR methacrylate OR 'calcium phosphates'/exp OR 'calcium phosphates' OR 'tricalcium phosphate'/exp OR 'tricalcium phosphate' OR 'biphasic calcium phosphate'/exp OR 'biphasic calcium phosphate' OR 'poly-aspartamide' OR 'poly-ethylene-glycol-co-glycolic-acid' OR 'polymer-cyclodextrin' OR 'poly-

	glycerol-dodecanoate' OR 'polystyrenes'/exp OR polystyrenes OR 'polyurethanes'/exp OR polyurethanes OR 'interpenetrating polymer' OR 'mineral trioxide aggregate'/exp OR 'mineral trioxide aggregate' OR mta OR 'mta,pcl' OR 'mta cement' OR theracal OR 'mta aggregate' OR 'aggregate proroot' OR 'proroot aggregate' OR 'tricalcium silicate'/exp OR 'tricalcium silicate' OR 'slow-release artificial tears' OR 'fibrin sealant system' OR 'sealant system, fibrin' OR 'autologous fibrin tissue' OR 'fibrin sealant'/exp OR 'fibrin sealant' OR 'sealant fibrin' OR 'fibrin seal'/exp OR 'fibrin seal' OR 'seal, fibrin' OR 'polymeric electrospun nanofibers' OR electrospun OR 'nanofibers'/exp OR nanofibers OR 'biomineralization'/exp OR biomineralization OR 'cell therapy'/exp OR 'cell therapy' OR 'therapy, cell'/exp OR 'therapy, cell' dressings' OR 'biofilms'/exp OR biofilms OR 'active biomolecules' OR 'cellulose pharmacology' OR 'nanostructures chemistry' OR 'nanofibrillated cellulose'/exp OR 'nanofibrillated cellulose' OR 'nanocrystalline cellulose'/exp OR 'nanocrystalline cellulose' OR 'biomimetic materials'/exp OR 'biomimetic materials' OR 'hydroxyapatite composite' OR 'hydroxyapatite'/exp OR hydroxyapatite OR 'dental regeneration membranes'/exp OR 'dental regeneration membranes' OR 'dental tissue regeneration membrane'/exp OR 'dental tissue regeneration membrane' OR 'hydrogel dental regeneration membrane'/exp OR 'hydrogel dental regeneration membrane' OR 'puramatrix'/exp OR puramatrix OR 'chitosan-enriched' OR 'collagen synthesis'/exp OR 'collagen synthesis' OR 'tissue engineering'/exp OR 'tissue engineering' OR 'fibrin hydrogel'
	#2 Search 'anti-infection' OR 'anti-infective' OR 'anti-infective agents'/exp OR 'anti-infective agents' OR 'agents, anti-infective' OR 'anti infective agents'/exp OR 'anti infective agents' OR 'antiinfective agents' OR 'agents, antiinfective' OR 'antiinfective agent'/exp OR 'antiinfective agent' OR microbicides OR 'antimicrobial'/exp OR antimicrobial OR 'antimicrobial ability'/exp OR 'antimicrobial ability' OR 'antimicrobial cationic peptides'/exp OR 'antimicrobial cationic peptides' OR 'antimicrobial agents' OR 'agents, antimicrobial' OR 'anti-microbial agents' OR 'agents, anti-microbial' OR 'anti microbial agents' OR 'antimicrobial agent'/exp OR 'antimicrobial agent' OR 'antimicrobial compound'/exp OR 'antimicrobial compound' OR 'anti-bacterial agents'/exp OR 'anti-bacterial agents' OR 'agents, anti-bacterial' OR 'anti bacterial agents'/exp OR 'anti bacterial agents' OR 'anti bacterial agente' OR 'antibacterial agents' OR 'antibacterial agent'/exp OR 'antibacterial agent' OR 'antibacterial activity'/exp OR 'antibacterial activity' OR 'antibiotic'/exp OR antibiotic OR 'microbicidal agent'/exp OR 'microbicidal agent' OR 'microbicidal substance'/exp OR 'microbicidal substance' OR 'microbicide'/exp OR microbicide OR 'microbiological agent'/exp OR 'microbiological agent' OR 'antibacterial effect'/exp OR 'antibacterial effect'
	#1 Search 'stem cell, mesenchymal'/exp OR 'stem cell, mesenchymal' OR 'stem cells, mesenchymal' OR 'mesenchymal stem cell'/exp OR 'mesenchymal stem cell' OR 'mesenchymal stromal cells'/exp OR 'mesenchymal stromal cells' OR 'mesenchymal stromal cell'/exp OR 'mesenchymal stromal cell' OR 'stromal cell, mesenchymal' OR 'stromal cells, mesenchymal' OR 'multipotent mesenchymal stromal cells' OR 'mesenchymal stromal cells, multipotent' OR 'mesenchymal progenitor cells' OR 'progenitor cell, mesenchymal' OR shed OR sheds OR dpSCs OR MSCs OR 'dental pulp stem cells'/exp OR 'dental pulp stem cells' OR 'dental pulp stem cell'/exp OR 'dental pulp stem cell' OR dpSC OR 'stem cells from human exfoliated deciduous teeth'/exp OR 'stem cells from human exfoliated deciduous teeth' OR 'dental pulp mesenchymal'
Scopus	#5 Search #1 AND #2 AND #3 AND #4
	#4 Search 'endodontic, regenerative' OR 'endodontics, regenerative' OR 'regenerative endodontic' OR 'pulp dentin regeneration' OR 'pulp vitality'/exp OR 'pulp vitality' OR 'pulpa dental vitality' OR 'tooth pulp vitality'/exp OR 'tooth pulp vitality' OR 'dental pulp regeneration' OR 'endodontic regeneration' OR 'dental tissue regeneration' OR 'root canal regenerative' OR 'endodontic revascularization' OR 'regenerative endodontic treatment' OR 'revascularization, endodontic' OR 'revitalization, endodontic' OR 'endodontic revitalization' OR 'pulp capping, dental' OR 'pulp capping'/exp OR 'pulp capping' OR 'capping, pulp' OR 'cappings, pulp' OR 'pulp cappings' OR 'capping, dental pulp' OR 'cappings, dental pulp' OR 'dental pulp cappings' OR 'pulp cappings, dental' OR 'pulpitis'/exp OR pulpitis OR 'inflammation, endodontic' OR 'endodontic inflammation'/exp OR 'endodontic inflammation' OR 'endodontic inflammations' OR 'inflammations, endodontic' OR 'dental pulp'/exp OR 'dental pulp' OR 'pulp-dentine complex' OR 'acute dental pulpitis'/exp OR 'acute dental pulpitis' OR 'dental pulp inflammation'/exp OR 'dental pulp inflammation' OR 'endodontal infections'/exp OR 'endodontal infections' OR 'endodontal inflammation'/exp OR 'endodontal inflammation' OR 'endodontic infection'/exp OR 'endodontic infection' OR 'pulp infection'/exp OR 'pulp infection' OR 'pulpal infection'/exp OR 'pulpal

	infection' OR 'pulpal inflammation'/exp OR 'pulpal inflammation' OR 'tooth pulp infection'/exp OR 'tooth pulp infection' OR 'tooth pulp inflammation'/exp OR 'tooth pulp inflammation' OR 'tooth pulpitis'/exp OR 'tooth pulpitis' OR 'pulp, tooth'/exp OR 'pulp, tooth' OR 'dental pulpa'/exp OR 'dental pulpa' OR 'tooth pulpa'/exp OR 'tooth pulp' OR 'tooth, pulp'/exp OR 'tooth, pulp' OR 'pulpal tissue'/exp OR 'pulpal tissue' OR 'tooth pulp'/exp OR 'tooth pulp' OR 'pulp necrosis' OR 'root canal infection'/exp OR 'root canal infection'
	#3 Search 'scaffold'/exp OR scaffold OR scaffolds OR 'scaffold, tissue'/exp OR 'scaffold, tissue' OR 'scaffolds, tissue' OR 'tissue scaffold'/exp OR 'tissue scaffold' OR 'tissue scaffolding'/exp OR 'tissue scaffolding' OR 'scaffolding, tissue' OR 'scaffoldings, tissue' OR 'tissue scaffoldings' OR 'natural scaffold' OR 'natural scaffolds' OR 'polymeric scaffolds' OR 'bioceramic scaffolds' OR 'nanoadhesive scaffolds' OR 'adhesive scaffold' OR 'scaffold biomimetic' OR 'nanocomposite scaffold' OR 'nanocellulose-based scaffolds' OR 'nc-based scaffolds' OR 'scaffolding approach' OR 'based-scaffold' OR 'based scaffold' OR 'based-scaffolds' OR 'based scaffolds' OR 'tissue scaffolds'/exp OR 'tissue scaffolds' OR 'scaffold blood clot' OR 'polysaccharides'/exp OR polysaccharides OR 'polysaccharide'/exp OR polysaccharide OR 'xanthan'/exp OR xanthan OR 'alginate'/exp OR alginate OR 'dextran'/exp OR dextran OR 'chitosan'/exp OR chitosan OR 'cellulose'/exp OR cellulose OR 'extracellular matrix'/exp OR 'extracellular matrix' OR 'hyaluronic acid'/exp OR 'hyaluronic acid' OR 'hyaluronan'/exp OR hyaluronan OR 'hyaluronate'/exp OR hyaluronate OR 'proteoglycans'/exp OR proteoglycans OR 'peptides'/exp OR peptides OR 'proteins'/exp OR proteins OR 'silk protein'/exp OR 'silk protein' OR rhcollagen OR 'collagen'/exp OR collagen OR 'gelatin'/exp OR gelatin OR 'fibrin'/exp OR fibrin OR 'polymer'/exp OR polymer OR 'polymers natural' OR 'biopolymers'/exp OR biopolymers OR 'biopolymer'/exp OR biopolymer OR 'polymers synthetic' OR 'polylactic acid'/exp OR 'polylactic acid' OR pla OR 'plapeo-pla' OR 'pla-peg-pla' OR 'polyglycolic acid'/exp OR 'polyglycolic acid' OR 'pga'/exp OR pga OR 'polylactide-co-glycolide'/exp OR 'polylactide-co-glycolide' OR 'plga'/exp OR plga OR 'poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate' OR 'poly-dto carbonate' OR 'poly-1,8-octanediol-co-citrate' OR 'peo-phb-peo' OR 'gamma-pga' OR 'gamma-polyglutamate' OR 'polymethacrylic acids'/exp OR 'polymethacrylic acids' OR 'methacrylate'/exp OR methacrylate OR 'calcium phosphates'/exp OR 'calcium phosphates' OR 'tricalcium phosphate'/exp OR 'tricalcium phosphate' OR 'biphasic calcium phosphate'/exp OR 'biphasic calcium phosphate' OR 'poly-aspartamide' OR 'poly-ethylene-glycol-co-glycolic-acid' OR 'polymer-cyclodextrin' OR 'poly-glycerol-dodecanoate' OR 'polystyrenes'/exp OR polystyrenes OR 'polyurethanes'/exp OR polyurethanes OR 'interpenetrating polymer' OR 'mineral trioxide aggregate'/exp OR 'mineral trioxide aggregate' OR mta OR 'mta,pcl' OR 'mta cement' OR theracal OR 'mta aggregate' OR 'aggregate proroot' OR 'proroot aggregate' OR 'tricalcium silicate'/exp OR 'tricalcium silicate' OR 'slow-release artificial tears' OR 'fibrin sealant system' OR 'sealant system, fibrin' OR 'autologous fibrin tissue' OR 'fibrin sealant'/exp OR 'fibrin sealant' OR 'sealant fibrin' OR 'fibrin seal'/exp OR 'fibrin seal' OR 'seal, fibrin' OR 'polymeric electrospun nanofibers' OR electrospun OR 'nanofibers'/exp OR nanofibers OR 'biomineralization'/exp OR biomineralization OR 'cell therapy'/exp OR 'cell therapy' OR 'therapy, cell'/exp OR 'therapy, cell' dressings' OR 'biofilms'/exp OR biofilms OR 'active biomolecules' OR 'cellulose pharmacology' OR 'nanostructures chemistry' OR 'nanofibrillated cellulose'/exp OR 'nanofibrillated cellulose' OR 'nanocrystalline cellulose'/exp OR 'nanocrystalline cellulose' OR 'biomimetic materials'/exp OR 'biomimetic materials' OR 'hydroxyapatite composite' OR 'hydroxyapatite'/exp OR hydroxyapatite OR 'dental regeneration membranes'/exp OR 'dental regeneration membranes' OR 'dental tissue regeneration membrane'/exp OR 'dental tissue regeneration membrane' OR 'hydrogel dental regeneration membrane'/exp OR 'hydrogel dental regeneration membrane' OR 'puramatrix'/exp OR puramatrix OR 'chitosan-enriched' OR 'collagen synthesis'/exp OR 'collagen synthesis' OR 'tissue engineering'/exp OR 'tissue engineering' OR 'fibrin hydrogel'
	#2 Search 'anti-infection' OR 'anti-infective' OR 'anti-infective agents'/exp OR 'anti-infective agents' OR 'agents, anti-infective' OR 'anti infective agents'/exp OR 'anti infective agents' OR 'antiinfective agents' OR 'agents, antiinfective' OR 'antiinfective agent'/exp OR 'antiinfective agent' OR microbicides OR 'antimicrobial'/exp OR antimicrobial OR 'antimicrobial ability'/exp OR 'antimicrobial ability' OR 'antimicrobial cationic peptides'/exp OR 'antimicrobial cationic peptides' OR 'antimicrobial agents' OR 'agents, antimicrobial' OR 'anti-microbial agents' OR 'agents, anti-microbial' OR 'anti microbial agents' OR 'antimicrobial agent'/exp OR 'antimicrobial agent' OR 'antimicrobial compound'/exp OR 'antimicrobial compound' OR 'anti-bacterial agents'/exp OR 'anti-bacterial agents' OR 'agents, anti-bacterial' OR 'anti bacterial agents'/exp OR 'anti bacterial agents' OR 'anti bacterial agente' OR 'antibacterial agents' OR

	'antibacterial agent'/exp OR 'antibacterial agent' OR 'antibacterial activity'/exp OR 'antibacterial activity' OR 'antibiotic'/exp OR antibiotic OR 'microbicidal agent'/exp OR 'microbicidal agent' OR 'microbicidal substance'/exp OR 'microbicidal substance' OR 'microbicide'/exp OR microbicide OR 'microbiological agent'/exp OR 'microbiological agent' OR 'antibacterial effect'/exp OR 'antibacterial effect' #1 Search stem cell, mesenchymal'/exp OR 'stem cell, mesenchymal' OR 'stem cells, mesenchymal' OR 'mesenchymal stem cell'/exp OR 'mesenchymal stem cell' OR 'mesenchymal stromal cells'/exp OR 'mesenchymal stromal cells' OR 'mesenchymal stromal cell'/exp OR 'mesenchymal stromal cell' OR 'stromal cell, mesenchymal' OR 'stromal cells, mesenchymal' OR 'multipotent mesenchymal stromal cells' OR 'mesenchymal stromal cells, multipotent' 'mesenchymal progenitor cells' OR 'progenitor cell, mesenchymal' OR shed OR sheds OR dpscs OR mscs OR 'dental pulp stem cells'/exp OR 'dental pulp stem cells' OR 'dental pulp stem cell'/exp OR 'dental pulp stem cell' OR dpssc OR 'stem cells from human exfoliated deciduous teeth'/exp OR 'stem cells from human exfoliated deciduous teeth' OR 'dental pulp mesenchymal'
Web of Science	#5 Search #1 AND #2 AND #3 AND #4 #4 Search TS= ((endodontic, regenerative) OR (endodontics, regenerative) OR (regenerative endodontic) OR (pulp dentin regeneration) OR (pulp vitality) OR (pulpa dental vitality) OR (tooth pulp vitality) OR (dental pulp regeneration) OR (endodontic regeneration) OR (dental tissue regeneration) OR (root canal regenerative) OR (endodontic revascularization) OR (regenerative endodontic treatment) OR (revascularization, endodontic) OR (revitalization, endodontic) OR (endodontic revitalization) OR (pulp capping, dental) OR (pulp capping) OR (capping, pulp) OR (cappings, pulp) OR (pulp cappings) OR (capping, dental pulp) OR (cappings, dental pulp) OR (dental pulp cappings) OR (pulp cappings, dental) OR (pulpitis) OR (inflammation, endodontic) OR (endodontic inflammation) OR (endodontic inflammations) OR (inflammations, endodontic) OR (dental pulp) OR (pulp-dentine complex) OR (acute dental pulpitis) OR (dental pulp inflammation) OR (endodontal infections) OR (endodontal inflammation) OR (endodontic infection) OR (pulp infection) OR (pulpal infection) OR (pulpal inflammation) OR (tooth pulp infection) OR (tooth pulp inflammation) OR (tooth pulpitis) OR (pulp, tooth) OR (dental pulpa) OR (tooth pulp) OR (tooth, pulp) OR (pulpal tissue) OR (tooth pulp) OR (pulp necrosis) OR (root canal infection)) #3 Search TS= ((scaffold) OR (scaffolds) OR (scaffold, tissue) OR (scaffolds, tissue) OR (tissue scaffold) OR (tissue scaffolding) OR (scaffolding, tissue) OR (scaffoldings, tissue) OR (tissue scaffoldings) OR (natural scaffold) OR (natural scaffolds) OR (polymeric scaffolds) OR (bioceramic scaffolds) OR (nanoadhesive scaffolds) OR (adhesive scaffold) OR (scaffold biomimetic) OR (nanocomposite scaffold) OR (nanocellulose-based scaffolds) OR (nc-based scaffolds) OR (scaffolding approach) OR (based-scaffold) OR (based scaffold) OR (based scaffolds) OR (tissue scaffolds) OR (scaffold blood clot) OR (polysaccharides) OR (polysaccharide) OR (xanthan) OR (alginate) OR (dextran) OR (chitosan) OR (celulose) OR (extracellular matrix) OR (hyaluronic acid) OR (hyaluronan) OR (hyaluronate) OR (proteoglycans) OR (peptides) OR (proteins) OR (silk protein) OR (rhcollagen) OR (collagen) OR (gelatina) OR (fibrina) OR (polymer) OR (polymers natural) OR (biopolymers) OR (biopolymer) OR (polymers synthetic) OR (polylactic acid) OR (pla) OR (pla-peo-pla) OR (pla-peg-pla) OR (polyglycolic acid) OR (pga) OR (polylactide-co-glycolide) OR (plga) OR (poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) OR (poly-dto carbonate) OR (poly-1,8-octanediol-co-citrate) OR (peo-phb-peo) OR (gamma-pga) OR (gamma-polyglutamate) OR (polymethacrylic acids) OR (methacrylate) OR (calcium phosphates) OR (tricalcium phosphate) OR (biphasic calcium phosphate) OR (poly-aspartamide) OR (poly-ethylene-glycol-co-glycolic-acid) OR (polymer-cyclodextrin) OR (poly-glycerol-dodecanoate) OR (polystyrenes) OR (polyurethanes) OR (interpenetrating polymer) OR (mineral trioxide aggregate) OR (mta) OR (mta,pcl) OR (mta cement) OR (theracal) OR (mta aggregate) OR (aggregate proroot) OR (proroot aggregate) OR (tricalcium silicate) OR (slow-release artificial tears) OR (fibrin sealant system) OR (sealant system, fibrina) OR (autologous fibrin tissue) OR (fibrin sealant) OR (sealant fibrina) OR (fibrin seal) OR (seal, fibrina) OR (polymeric electrospun nanofibers) OR (electrospun) OR (nanofibers) OR (biomineralization) OR (cell therapy) OR (therapy, cell) OR (biofilms) OR (active biomolecules) OR (cellulose pharmacology) OR (nanostructures chemistry) OR (nanofibrillated celulose) OR (nanocrystalline celulose) OR (biomimetic materials) OR (hydroxyapatite composite) OR (hydroxyapatite) OR (dental regeneration membranes) OR (dental tissue regeneration membrane) OR (hydrogel dental regeneration membrane) OR (puramatrix) OR (chitosan-enriched) OR (collagen synthesis) OR (tissue engineering) OR (fibrin hydrogel))

	#2 Search TS= ((anti-infection) OR (anti-infective) OR (anti-infective agentes) OR (agents, anti-infective) OR (anti infective agentes) OR (antiinfective agentes) OR (agents, antiinfective) OR (antiinfective agente) OR (antiinfective agente) OR (microbicides) OR (antimicrobial) OR (antimicrobial ability) OR (antimicrobial cationic peptides) OR (antimicrobial agentes) OR (agents, antimicrobial) OR (anti-microbial agentes) OR (agents, anti-microbial) OR (anti microbial agentes) OR (antimicrobial agente) OR (antimicrobial agente) OR (antimicrobial compound) OR (anti-bacterial agentes) OR (agents, anti-bacterial) OR (anti bacterial agentes) OR (anti bacterial agentes) OR (anti bacterial agente) OR (antibacterial agentes) OR (antibacterial agente) OR (antibacterial agente) OR (antibacterial activity) OR (antibiotic) OR (microbicidal agente) OR (microbicidal agente) OR (microbicidal substance) OR (microbicide) OR (microbiological agente) OR (antibacterial effect))
	#1 Search TS= ((stem cell, mesenchymal) OR (stem cell, mesenchymal) OR (stem cells, mesenchymal) OR (mesenchymal stem cell) OR (mesenchymal stem cell) OR (mesenchymal stromal cells) OR (mesenchymal stromal cell) OR (stromal cell, mesenchymal) OR (stromal cells, mesenchymal) OR (multipotent mesenchymal stromal cells) OR (mesenchymal stromal cells, multipotente) OR (mesenchymal progenitor cells) OR (progenitor cell, mesenchymal) OR (shed) OR (sheds) OR (dpSCs) OR (MSCs) OR (dental pulp stem cells) OR (dental pulp stem cell) OR (dpSC) OR (stem cells from human exfoliated deciduous teeth) OR (stem cells from human exfoliated deciduous teeth) OR (dental pulp mesenchymal))

5 Considerações Finais

Considerando a escassez de estudos sobre o tema, que utilizem o desenho de inclusão do presente trabalho para avaliar desfechos em relação aos *scaffolds* carregados com fármacos ou moléculas bioativas e, seus possíveis efeitos antimicrobianos/anti-inflamatórios sobre as células-tronco pulpares não foi possível estabelecer um grupo como padrão de testes entre eles, o que impossibilitou uma meta-análise.

Entretanto, levando em conta essa limitação, e apesar do uso de drogas ou moléculas bioativas com propriedades antimicrobianas incorporados ao *scaffold* estruturas naturais à base de fibrina e colágeno, bem como *scaffolds* híbridos sem carregamento de fármacos mostraram-se ser os biomateriais mais eficazes e assim, demonstraram reduzir o crescimento bacteriano de acordo com a dosagem quando usada, e preservaram a viabilidade celular das células-tronco da polpa dentária humana em doses mínimas. Específicos *scaffolds* demonstram um grande potencial para continuarem a ser estudados.

A introdução de biomateriais que têm sido usados com sucesso na engenharia tecidual para endodontia regenerativa pode ser promissora, enquanto a combinação de biomateriais complexos também pode pavimentar o caminho para fornecer uma fonte potencial de *scaffolds*. E com o rápido desenvolvimento da tecnologia 3D, bioimpressão e nanotecnologia, a fabricação precisa desses biomateriais com estrutura e propriedades desejadas, pode se tornar cada vez mais frequente, estimulando assim o progresso e desenvolvimento de estratégias que facilitem a transição das pesquisas endodônticas regenerativas dos laboratórios para as clínicas.

Referências

- A. Saberi, Eshagh et al. Cytotoxic effects of mineral trioxide aggregate, calcium enriched mixture cement, Biodentine and octacalcium phosphate on human gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects*, v. 10, n. 2, p. 75–80, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.15171/joddd.2016.012>
- Aksel, H., Mahjour, F., Bosaid, F., Calamak, S., & Azim, A. A. (2020). Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Antibiotic-loaded Chitosan Hydrogels as a Potential Scaffold in Regenerative Endodontic Treatment. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.09.007>
- Albuquerque, M. T. P., Valera, M. C., Nakashima, M., & Bottino, M. C. (2014). Tissue-engineering-based Strategies for Regenerative Endodontics. *Journal of Dental Research*, 1(10). <https://doi.org/10.1177/0022034514549809>
- Alipour, M., Fadakar, S., Aghazadeh, M., Salehi, R., Samadi Kafil, H., Roshangar, L., Mousavi, E., & Aghazadeh, Z. (2021). Synthesis, characterization, and evaluation of curcumin-loaded endodontic reparative material. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(9). <https://doi.org/10.1002/jbt.22854>
- Alipour, M., Pouya, B., Aghazadeh, Z., Samadikafil, H., Ghorbani, M., Alizadeh, S., Aghazadeh, M., & Dalir Abdolahinia, E. (2021). The Antimicrobial, Antioxidative, and Anti-Inflammatory Effects of Polycaprolactone/Gelatin Scaffolds Containing Chrysin for Regenerative Endodontic Purposes. *Stem Cells International*, 2021. <https://doi.org/10.1155/2021/3828777>
- Ana, Ika Dewi et al. Bioceramics for Clinical Application in Regenerative Dentistry. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, v. 1077, p. 309–316, 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0947-2_16
- Antunes, H. S. et al. Sealing ability of two root-end filling materials in a bacterial nutrient leakage model. *International endodontic journal*, [S. l.], v. 49, n. 10, p. 960–965, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12543>
- ASGARY, Saeed; EGHBAL, Mohammad Jafar; EHSANI, Sara. Periradicular Regeneration after Endodontic Surgery with Calcium-enriched Mixture Cement in Dogs. *Journal of Endodontics*, [S. l.], v. 36, n. 5, p. 837–841, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.03.005>
- Bakota, E. L., Sensoy, O., Ozgur, B., & Sayar, M. (2013). Self-Assembling Multidomain Peptide Fibers with Aromatic Cores. *Biomacromolecules*.
- Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? *Journal of Endodontics*, 30(4), 196–200. <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00003>

Becerra, P., Ricucci, D., Loghin, S., Gibbs, J. L., & Lin, L. M. (2014). Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *Journal of Endodontics*, 40(1), 133–139. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.017>

Bekhouche, M., Bolon, M., Charriaud, F., Lamrayah, M., Da Costa, D., Primard, C., Costantini, A., Pasdeloup, M., Gobert, S., Mallein-Gerin, F., Verrier, B., Ducret, M., & Farges, J.-C. (2020). Development of an antibacterial nanocomposite hydrogel for human dental pulp engineering. *Journal of Materials Chemistry. B*. <https://doi.org/10.1039/d0tb00989j>

Bottino, M. C., Kamocki, K., Yassen, G. H., Platt, J. A., Vail, M. M., Ehrlich, Y., Spolnik, K. J., & Gregory, R. L. (2013). Bioactive nanofibrous scaffolds for regenerative endodontics. *Journal of Dental Research*, 92(11), 963–969. <https://doi.org/10.1177/0022034513505770>

CAMILLERI, Josette. Mineral trioxide aggregate: present and future developments. *Endodontic Topics*, [S. l.], v. 32, n. 1, p. 31–46, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/etp.12073>

Castellan, C. S., Bedran-russo, A. K., Karol, S., & Pereira, P. N. R. (2011). Long-term stability of dentin matrix following treatment with various natural collagen cross-linkers. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 4(7), 1343–1350. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.05.003>

CHEN, Ian et al. Healing after root-end microsurgery by using mineral trioxide aggregate and a new calcium silicate-based bioceramic material as root-end filling materials in dogs. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 3, p. 389–399, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.11.005>

CHEVALIER, J.; GREMILLARD, L. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. *Journal of the European Ceramic Society*, [S. l.], v. 29, n. 7, p. 1245–1255, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2008.08.025>

Colombo, J. S., Jia, S., & D'Souza, R. N. (2020). Modeling Hypoxia Induced Factors to Treat Pulpal Inflammation and Drive Regeneration. *Journal of Endodontics*, 46(9), S19–S25. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2020.06.039>

Colombo, J. S., Moore, A. N., Hartgerink, J. D., & Souza, R. N. D. (2014). Dental Pulp Regeneration. *Journal of Endodontics*, 40(4), S6–S12. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.01.019>

Cuevas-Suárez, C. E., de Oliveira da Rosa, W. L., Vitti, R. P., da Silva, A. F., & Piva, E. (2020). Bonding Strength of Universal Adhesives to Indirect Substrates: A Meta-Analysis of in Vitro Studies. *Journal of Prosthodontics*, 29(4), 298–308. <https://doi.org/10.1111/jopr.13147>

DA ROSA, Wellington L. O. et al. Current trends and future perspectives of dental pulp capping materials: A systematic review. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*, v. 106, n. 3, p. 1358–1368, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33934>

Darby, I. A., & Hewitson, T. D. (2016). Hypoxia in tissue repair and fibrosis. *Cell and Tissue Research*. <https://doi.org/10.1007/s00441-016-2461-3>

DE-DEUS, G. et al. Cytocompatibility of the ready-to-use bioceramic putty repair cement iRoot BP Plus with primary human osteoblasts. *International Endodontic Journal*, v. 45, n. 6, p. 508–513, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2011.02003.x>

Dianat, O., Mashhadi Abas, F., Paymanpour, P., Eghbal, M. J., Haddadpour, S., & Bahrololumi, N. (2017). Endodontic repair in immature dogs' teeth with apical periodontitis: blood clot vs plasma rich in growth factors scaffold. *Dental Traumatology*, 33(2), 84–90. <https://doi.org/10.1111/edt.12306>

Ducret, M., Fabre, H., & Farges, J. (2015). Production of Human Dental Pulp Cells with a Medicinal. 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.017>

Ducret, M., Fabre, H., Celle, A., & Mallein-gerin, F. (2017). Current challenges in human tooth revitalization. 28, 159–168. <https://doi.org/10.3233/BME-171637>

Ducret, M., Montembault, A., Josse, J., Padeloup, M., Celle, A., Benchrih, R., Mallein-Gerin, F., Alliot-Licht, B., David, L., & Farges, J. C. (2019). Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. *Dental Materials*, 35(4), 523–533. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2019.01.018>

DUTTA, Arindam; SAUNDERS, William P. Calcium silicate materials in endodontics. *Dental Update*, v. 41, n. 8, p. 708–722, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.12968/denu.2014.41.8.708>

EDREES, Hadeel Y. et al. Induction of Osteogenic Differentiation of. *Materials*, v. 12, p. 2311, 2019.

Eramo, S., Natali, A., Pinna, R., & Milia, E. (2018). Dental pulp regeneration via cell homing. *International Endodontic Journal*, 51, 405–419. <https://doi.org/10.1111/iej.12868>

ESCOBAR-GARCÍA, Diana María et al. Cytotoxicity and Initial Biocompatibility of Endodontic Biomaterials (MTA and Biodentine TM) Used as Root-End Filling Materials. *BioMed Research International*, v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/7926961>

EzEldeen, M., Toprakhisar, B., Murgia, D., Smisdom, N., Deschaume, O., Bartic, C., Van Oosterwyck, H., Pereira, R. V. S., Opdenakker, G., Lambrechts, I.,

Bronckaers, A., Jacobs, R., & Patterson, J. (2021). Chlorite oxidized oxyamylose differentially influences the microstructure of fibrin and self assembling peptide hydrogels as well as dental pulp stem cell behavior. *Scientific Reports*, 11(1), 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-84405-4>

Farges, J., Bellanger, A., Ducret, M., Bleicher, F., & Carrouel, F. (2015). Human odontoblast-like cells produce nitric oxide with antibacterial activity upon TLR2 activation. *Frontiers in Physiology*, 6(June), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00185>

Ferroni, L., Gardin, C., Sivoilella, S., Brunello, G., & Berengo, M. (2015). A Hyaluronan-Based Scaffold for the in Vitro Construction of Dental Pulp-Like Tissue. *International Journal of Molecular Sciences*, 16, 4666–4681. <https://doi.org/10.3390/ijms16034666>

FISCHER, E. J.; ARENS, D. E.; MILLER, C. H. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as compared with zinc-free amalgam, intermediate restorative material, and Super-EBA as a root-end filling material. *Journal of endodontics*, v. 24, n. 3, p. 176–179, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80178-7](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80178-7)

Galler, K. M., Hartgerink, J. D., Cavender, A. C., Schmalz, G., & Souza, R. N. D. (2012). A Customized Self-Assembling Peptide Hydrogel for dental pulp tissue engineering. *TISSUE ENGINEERING PART A*, 18, 176–184. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0222>

Kamocki, K., Nör, J. E., & Bottino, M. C. (2015). Dental pulp stem cell responses to novel antibiotic-containing scaffolds for regenerative endodontics. *International Endodontic Journal*, 48(12), 1147–1156. <https://doi.org/10.1111/iej.12414>

Kamocki, Krzysztof, Nör, J. E., & Bottino, M. C. (2015). Effects of ciprofloxacin-containing antimicrobial scaffolds on dental pulp stem cell viability-In vitro studies. *Archives of Oral Biology*, 60(8), 1131–1137. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2015.05.002>

Klimczak, A., & Kozłowska, U. (2016). Mesenchymal Stromal Cells and Tissue-Specific Progenitor Cells: Their Role in Tissue Homeostasis. *Stem Cells International*, 2016.

KOGAN, Paul et al. The Effects of Various Additives on Setting Properties of MTA. *Journal of Endodontics*, v. 32, n. 6, p. 569–572, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2005.08.006>

KOHOUT, George D. et al. Comparison of quick-set and mineral trioxide aggregate root-end fillings for the regeneration of apical tissues in dogs. *Journal of Endodontics*, v. 41, n. 2, p. 248–252, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.10.005>

KÜÇÜKKAYA, Selen et al. In Vitro Cytotoxicity of Calcium Silicate-Based Endodontic Cement as Root-End Filling Materials. Scientifica , v. 2016, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2016/9203932>

Kwon, Y., Lim, E., & Min, K. (2015). Effects of Epigallocatechin-gallate, an Antimicrobial Crosslinking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffold. TISSUE ENGINEERING PART A, 21(1), S193.

Kwon, Y.-S., Kim, H.-J., Hwang, Y.-C., Rosa, V., Yu, M.-K., & Min, K.-S. (2017). Effects of Epigallocatechin Gallate, an Antibacterial Cross-linking Agent, on Proliferation and Differentiation of Human Dental Pulp Cells Cultured in Collagen Scaffolds. Journal of Endodontics, 43(2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.10.017>

LEAL, Fernanda et al. Similar sealability between bioceramic putty ready-to-use repair cement and white MTA. Brazilian Dental Journal, v. 24, n. 4, p. 362–366, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0103-6440201302051>

Li, S., Martens, E., Dillen, C., Steen, P. E. Van Den, & Opdenakker, G. (2008). Virus entry inhibition by chlorite-oxidized oxyamylose versus induction of antiviral interferon by poly (I: C). Biochemical Pharmacology, 76, 831–840. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.07.022>

Li, Y., Meng, H., Liu, Y., & Lee, B. P. (2015). Fibrin Gel as an Injectable Biodegradable Scaffold and Cell Carrier for Tissue Engineering. The Scientific World Journal, 2015, 1–10.

Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J., & Shen, J. (2004). Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. Biomaterials, 25, 2997–3004. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.09.092>

McIntyre, P. W., Wu, J. L., Kolte, R., Zhang, R., Gregory, R. L., Bruzzaniti, A., & Yassen, G. H. (2019). The antimicrobial properties, cytotoxicity, and differentiation potential of double antibiotic intracanal medicaments loaded into hydrogel system. Clinical Oral Investigations, 23(3), 1051–1059. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2542-7>

Medina-Fernandez, I., & Celiz, A. D. (2019). Acellular biomaterial strategies for endodontic regeneration. Biomaterials Science, 7(2), 506–509. <https://doi.org/10.1039/c8bm01296b>

MORADI, Saeed; LOMEE, Mahdi; GHARECHAH, Maryam. Comparison of fluid filtration and bacterial leakage techniques for evaluation of microleakage in endodontics. Dental Research Journal, v. 12, n. 2, p. 109–114, 2015.

Moussa, D. G., & Aparicio, C. (2019). Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin - pulp complex regeneration. July 2018, 58–75. <https://doi.org/10.1002/term.2769>

NAIR, Uma et al. A comparative evaluation of the sealing ability of 2 root-end filling materials: An in vitro leakage study using *Enterococcus faecalis*. Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology, v. 112, n. 2, p. e74–e77, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.01.030>

Nakashima, M., & Akamine, A. (2005). The Application of Tissue Engineering to Regeneration of Pulp and Dentin in Endodontics. Journal of Endodontics, 31(10), 711–718.

Nauta, T. D., Hinsbergh, V. W. M. Van, & Koolwijk, P. (2014). Hypoxic Signaling During Tissue Repair and Regenerative Medicine. International Journal of Molecular Sciences, 15(11), 19791–19815. <https://doi.org/10.3390/ijms151119791>

OSORIO, Rosa Maria. Cytotoxicity of endodontic materials. Journal of Endodontics, v. 24, n. 2, p. 91–96, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(98\)80084-8](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(98)80084-8)

Ouzzani, M., Hammady, H., Fedorowicz, Z., & Elmagarmid, A. (2016). Rayyan-a web and mobile app for systematic reviews. Systematic Reviews, 5(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13643-016-0384-4>

Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. The BMJ, 372. <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>

Palasuk, J., Kamocki, K., Hippenmeyer, L., Platt, J. A., Spolnik, K. J., Gregory, R. L., & Bottino, M. C. (2014). Bimix antimicrobial scaffolds for regenerative endodontics. Journal of Endodontics, 40(11), 1879–1884. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2014.07.017>

PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M.; DUMMER, P. M. H. Mineral trioxide aggregate and other bioactive endodontic cements: an updated overview – part I: vital pulp therapy. International Endodontic Journal, v. 51, n. 2, p. 177–205, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/iej.12841>

Petrino, J. A., Boda, K. K., Shambarger, S., Bowles, W. R., & Mcclanahan, S. B. (2010). Challenges in Regenerative Endodontics: A Case Series. Journal of Endodontics, 36(3), 536–541. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.006>

Polat, G. G., & Yildirim, C. (2014). The use of platelet rich plasma in the treatment of immature tooth with periapical lesion : a case report. *Restorative Dentistry & Endodontics*, 7658, 230–234.

Raddall, G., Mello, I., & Leung, B. M. (2019). Biomaterials and Scaffold Design Strategies for Regenerative Endodontic Therapy. 7(November), 1–13. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00317>

Redl, H., Schlag, G., Stanek, G., & Hirschl, A. (1983). In vitro properties of mixtures of fibrin seal and antibiotics. *Biomaterials*, 4, 29–32.

Rosa, V., Zhang, Z., Grande, R. H. M., & Nor, J. E. (2013). Dental Pulp Tissue Engineering in. *Journal of Dental Research*, 92(11), 970–975. <https://doi.org/10.1177/0022034513505772>

Saoud, T. M. A., Ricucci, D., Lin, L. M., & Gaengler, P. (2016). Regeneration and repair in endodontics-a special issue of the regenerative endodontics-a new era in clinical endodontics. *Dentistry Journal*, 4(1). <https://doi.org/10.3390/dj4010003>

SARASWATHI, Devabhaktuni Disha et al. A Comparative Evaluation of Sealing Ability of Three Recent Root-End Filling Materials: An In Vitro Study. *Journal of Advanced Oral Research*, v. 6, n. 2, p. 33–39, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/2229411220150206>

SHAMSY, Enass et al. Evaluation of the apical seal of mineral trioxide aggregate in the absence and presence of Smear Layer. *Journal of Contemporary Dental Practice*, v. 20, n. 3, p. 298–303, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.5005/jp-journals-10024-2513>

SINGH, Harpreet et al. JBR Journal of Interdisciplinary Biodentine : A Promising Dentin substitute. v. 2, n. 5, p. 1–5, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.4172/2376-032X>

SOUZA, N. J. A. et al. Cytotoxicity of materials used in perforation repair tested using the V79 fibroblast cell line and the granulocyte-macrophage progenitor cells. *International Endodontic Journal*, v. 39, n. 1, p. 40–47, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2005.01045.x>

Stashenko, P., Teles, R., & D'Souza, R. (1998). PERIAPICAL INFLAMMATORY RESPONSES. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, 9(4), 498–521.

SURYA RAGHAVENDRA, Srinidhi et al. Bioceramics in Endodontics – a Review. *Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry*, v. 51, n. 0, p. 128–137, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.17096/jiufd.63659>

TABARI, Mitra et al. Biocompatibility of Mineral Trioxide Aggregate Mixed with Different Accelerators: an Animal Study. *Journal of dentistry (Shiraz, Iran)*, v. 21,

n. 1, p. 48–55, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.30476/DENTJODS.2019.77826.0>

Torabinejad, M., & Turman, M. (2011). Revitalization of Tooth with Necrotic Pulp and Open Apex by Using Platelet-rich Plasma: A Case Report. *Journal of Endodontics*, 37(2), 265–268. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.004>

TORABINEJAD, Mahmoud et al. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *Journal of Endodontics* v. 21, n. 7, p. 349–353, 1995 a. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80967-2](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80967-2)

TORABINEJAD, Mahmoud et al. Bacterial leakage of mineral trioxide aggregate as a root-end filling material. *Journal of Endodontics*, v. 21, n. 3, p. 109–112, 1995 b. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(06\)80433-4](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(06)80433-4)

Tricco, A. C., Lillie, E., Zarin, W., O'Brien, K. K., Colquhoun, H., Levac, D., Moher, D., Peters, M. D. J., Horsley, T., Weeks, L., Hempel, S., Akl, E. A., Chang, C., McGowan, J., Stewart, L., Hartling, L., Aldcroft, A., Wilson, M. G., Garritty, C., ... Straus, S. E. (2018). PRISMA extension for scoping reviews (PRISMA-ScR): Checklist and explanation. *Annals of Internal Medicine*, 169(7), 467–473. <https://doi.org/10.7326/M18-0850>

Ulusoy, A. T., Turedi, I., Cimen, M., & Zafer, C. C. (2019). Evaluation of Blood Clot , Platelet-rich Plasma , Platelet-rich Fibrin , and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: *Journal of Endodontics*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2019.02.002>

Verma, P., Nosrat, A., Kim, J. R., Price, J. B., Wang, P., Bair, E., Xu, H. H., & Fouad, A. F. (2017). Effect of Residual Bacteria on the Outcome of Pulp Regeneration in Vivo. *Journal of Dental Research*, 96(1), 100–106. <https://doi.org/10.1177/0022034516671499>

Vishwanat, L., Duong, R., Takimoto, K., Phillips, L., Espitia, C. O., Diogenes, A., Ruparel, S. B., Kolodrubetz, D., & Ruparel, N. B. (2017). Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. *Journal of Endodontics*, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2017.01.023>

WALSH, Ryan M. et al. Evaluation of Compressive Strength of Hydraulic Silicate-based Root-end Filling Materials. *Journal of Endodontics*, v. 40, n. 7, p. 969–972, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.11.018>

Wigler, R., Kaufman, A. Y., Lin, S., Steinbock, N., Hazan-molina, H., & Torneck, C. D. (2013). Revascularization : A Treatment for Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Incomplete Root Development. *Journal of Endodontics*, 39(3), 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.014>

Willyard, C. (2018). The secrets of healing without scars. *Nature*, 563.

Xu, Y., Wu, J., Wang, H., Li, H., Di, N., & Song, L. (2013). Scaffold for Tendon Tissue Engineering. *Tissue Engineering PART C*, 19(12).
<https://doi.org/10.1089/ten.tec.2012.0328>

ZHU, Qiang et al. Adhesion of human osteoblasts on root-end filling materials. *Journal of Endodontics*, v. 26, n. 7, p. 404–406, 2000. Disponível em:
<https://doi.org/10.1097/00004770-200007000-00006>