



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Milena do Valle Tomaz

**Liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF após
condicionamento dentinário com agentes quelantes: análise ex vivo**

Rio de Janeiro

2023

Milena do Valle Tomaz

**Liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF após condicionamento dentinário
com agentes quelantes: análise ex vivo**

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Orientadoras: Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Prof.^a Dra. Justine Monteiro Monnerat Tinoco

Rio de Janeiro

2023

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBB

T655 Tomaz, Milena do Vale.
Liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF após condicionamento dentinário com agentes quelantes: análise *ex vivo* / Milena do Vale Tomaz. - 2023.
xx f.

Orientadoras: Luciana Moura Sassone.
Justine Monteiro Monnerat Tinoco.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. Fator transformador de crescimento beta (Odontologia). 2. Fatores de Crescimento do Endotélio Vascular. 3. Ácido etidrônico. 4. Quitosana 5. Ácido Edético. 6. Quelantes. I. Sassone, Luciana Moura. II. Tinoco, Justine Monteiro Monnerat. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

CDU
616.314

Bibliotecária: Diana Amado B. dos Santos CRB7/6171

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Milena do Valle Tomaz

**Liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF após condicionamento dentinário
com agentes quelantes: análise ex vivo**

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Endodontia.

Aprovada em 27 de fevereiro de 2023.

Orientadores: Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone
Faculdade de Odontologia – UERJ
Prof.^a Dra. Justine Monteiro Monnerat Tinoco
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Tauby Coutinho Filho
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Georgiana Amaral
Faculdade de Odontologia – UERJ

Prof. Dr. Henrique Eduardo Oliveira
Universidade Federal Fluminense

Prof. Dr. Jaime Noronha Dutra Filho
Universidade Federal Fluminense

Prof.^a Dra. Carolina Oliveira de Lima
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2023

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Ana Tomaz e José Tomaz, pelo amor e incentivo de uma vida inteira.

Aos meus irmãos, Hellen Talarico e Ítalo Tomaz, pelo carinho e apoio de sempre.

Ao meu marido, Ricardo Varela, por todos os momentos de compreensão, palavras de amor e carinho. Sem você não teria sido possível!

Em especial, ao meu filho Eduardo, meu bebê milagre.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Luciana Moura Sassone pela orientação ao longo dos últimos seis anos.

À Prof.^a Dra. Justine Monteiro Monnerat Tinoco pela paciência e carinho.

À Bárbara Coelho pela disponibilidade, comprometimento, paciência, e ajuda em todos os momentos. Sem você minha tese não teria saído do papel. Você é um exemplo de profissionalismo. Sou muito grata a você. Muito obrigada, por TUDO!

À minha amiga, Prof.^a Carolina Lima, pelo ombro amigo, risadas e dias inteiros de microtomografias. Você foi uma das melhores surpresas do Doutorado.

Ao meu amigo, Prof. Dr. Cláudio Malizia, pela amizade, carinho em todos esses anos de Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ). Um exemplo de pessoa e profissional. Você mudou meu jeito de ver e fazer endodontia.

Ao Prof. Dr. Raphael Hirata Jr. (*in memoriam*) pela amizade e ensinamentos. Conviver com você foi inspirador. Saudades dos seus conselhos, dos cafés, das balas, das folhas rabiscadas com suas ideias e explicações. Saudades de correr pelos corredores da microbiologia, entrar em estufas e morrer de medo de ficar presa lá dentro. O caminho sem você foi muito difícil. Um ser humano ímpar. Um mestre!

Ao Prof. Dr. Henrique Eduardo Oliveira por toda amizade e parceria de vinte anos. Obrigada por me ajudar sempre que precisei. Toda essa jornada começou com você. Obrigada por me apresentar ao Prof. Dr. Rafael Hirata.

Ao Prof. Dr. Marcos Colaço por abrir seu laboratório em meio a uma pandemia para me ajudar. Obrigada pelo acolhimento, atenção e ajuda.

Ao Doutorando Thiago Carvalho pela ajuda nas aquisições das imagens em microscopia.

Ao Prof. Dr. Paulo Zuquin e toda sua equipe da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) pela parceria. Em especial ao aluno Matheus por dividir conosco todo seu conhecimento e nos auxiliar nos experimentos em meio a defesa de tese e viagem.

À Prof.^a Dra. Thereza Cristina Barja Fidalgo e ao técnico Genilson Rodrigues da Silva por nos receberem no Laboratório de Farmacologia Celular e Molecular e auxiliarem na execução dos experimentos

À secretaria de pós-graduação em nome da Denise Muniz, Anelyse Lira e Pablo Lessa, da pela ajuda de sempre.

Agradeço aos membros da banca examinadora e ao avaliador prévio por aceitarem o convite e pelas contribuições.

Ao meu querido chefe Prof. Dr. Tauby Coutinho e meus amigos e parceiros de especialização Renato Krebs, Georgiana Amaral, Natasha Ajuz, Ana Flávia Barbosa e Karem Pinto por me ajudarem sempre que precisei me ausentar para estar no laboratório. Tenho muito orgulho em poder dizer que faço parte dessa equipe.

RESUMO

TOMAZ, Milena do Valle. **Liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF após condicionamento dentinário com agentes quelantes**: análise ex vivo. 2023. 48 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Os fatores de crescimento armazenados na dentina têm papel fundamental no processo de reparo do complexo dentinho pulpar. O objetivo do presente trabalho foi investigar, *ex vivo*, a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF, armazenados na dentina, após condicionamento com os agentes quelantes: EDTA, Quitosana e Ácido etidrônico (HEBP). A remoção da camada da *smear layer* e o grau de erosão dos túbulos dentinários também foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para confecção dos corpos de prova foram selecionados um total de setenta e dois dentes permanentes, unirradiculares, com canal único e sem cáries, fraturas, reabsorção e/ou tratamento endodôntico prévio. Os elementos dentários tiveram suas porções coronária e apical removidas para confecção de cilindros de dentina com oito mm de comprimento. O interior de cada cilindro foi preparado com broca de *Gates Glidden* número quatro para padronização do diâmetro interno em 1,0mm aproximadamente. Todos os corpos de prova foram irrigados inicialmente com 20 mL de 1,5% NaOCl durante 5 min e então distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=9 para cada grupo) com diferentes protocolos de irrigação final: 17% EDTA (20mL/5 min), 0,2% Quitosana (20 mL/5 min), 9% HEBP (20 mL/ 5min) e, solução salina (20 mL/5 min). Após irrigação, trinta e seis corpos de prova foram armazenados em microtubos tipo *Eppendorf* de 1,5mL contendo meio de cultura α -MEM, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina a 37°C por vinte e quatro horas. Após este período o sobrenadante contido em cada microtubo foi coletado e a liberação dos fatores de crescimento foi quantificada utilizando-se o teste imunoenzimático ELISA. Não foi realizada análise estatística destes dados, pois não foi detectada a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF nos grupos testados. Os demais trinta e seis corpos de prova foram cortados no sentido mesio-distal para realização de fotomicrografias dos terços cervical, médio e apical com objetivo de comparar a eficácia dos diferentes agentes quelantes na remoção da *smear layer* e grau de erosão dos túbulos dentinários utilizando-se análise por MEV. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn com um nível de significância $\alpha = 0,05$. A irrigação final com os agentes quelantes EDTA 17%, Quitosana 0,2% e HEBP 9% foi eficiente na remoção da camada de *smear layer* além de promover erosão dos túbulos dentinários, sem diferença significativa entre os grupos testados. Baseado na metodologia empregada e diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que: a) Não foi possível quantificar a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF com o Kit ELISA utilizado; b) Como todos agentes quelantes testados foram eficientes na remoção da camada de *smear layer* e promoveram algum grau de erosão dos túbulos dentinários, em todas as regiões analisadas, a Quitosana 0,2% pode ser um substituto natural ao EDTA 17%.

Palavras-chave: Fator de transformação de crescimento. Fator de crescimento vascular endotelial. Ácido etidrônico. Quitosana. EDTA. Agentes quelantes.

ABSTRACT

TOMAZ, Milena do Valle. **Release of growth factors TGF β 1 e VEGF into root canals with the chelating agents EDTA, Chitosan and Etidronic Acid:** ex vivo analysis. 2023. 48 f. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Growth factors sequestered in dentin play an important role in the repair process of the dentino pulp complex. The aim of this study was to investigate, *ex vivo*, the release of growth factors TGF β 1 e VEGF, sequestered in dentin, after conditioning with the chelating agents: EDTA, Chitosan and Etidronic Acid (HEBP). The smear layer removal and the dentin tubules erosion were also analysed. by SEM. A total of seventy two teeth met the following criteria: permanent teeth with single rooted teeth, without caries, fractures, resorption and/or previous endodontic treatment, were selected for the preparation of specimens. The crowns and the apical portion of teeth were removed and root segments were prepared to cylinder shape with 8 mm. The root segment was instrumented up to *Gates Glidden* size 4 to standardize the internal diameter at 1mm. Thirty six specimens were initially irrigated with 20 mL/5 min of NaOCL and then randomly assigned into four groups (n=9 for each group) with different final irrigation protocols: 17% EDTA (20mL/5 min); 0.2% Chitosan (20 mL/5 min); 9% HEBP (20 mL/ 5min); Saline (20 mL/5 min). After the final irrigation the specimens were kept in an 1,5mL Eppendorf microtubes containing α -MEM medium and 100 U/mL penicilin e 100 U/mL de estreptomicin at 37°C for twenty four hours. After that time the medium from thirty six *Eppendorf* tubes were collected and the growth factors release was quantified using an immunoenzymatic test ELISA. The data were not submitted to any statistical test because the release of growth factors TGF β 1 e VEGF was not detected in any tested group. Longitudinal grooves were made on the mesiodistal surfaces of another thirty six specimens using a low-speed diamond disk. Photomicrographs of the cervical, middle and apical thirds in order to compare the effectiveness of different chelating agents the smear layer removal and the degree of the dentinal tubules erosion, using electron microscopy (SEM). Data were submitted to the non- parametric tests Kruskal-Wallis and Dunn with a significance level of $\alpha = 0,05$. The final irrigation protocols with the chelating agents EDTA 17%, Chitosan 0,2% and HEBP 9% was efficient in removing the smear layer and promote some erosion in the dentine tubules, with no significant difference between the tested groups. Based in the methodology employed and according to the results of this study ita can be concluded that: a) it was not possible to quantify the release of growth factors TGF β 1 and VEGF with the ELISA kit used; b) As all the chelating agents tested were efficient in *smearlayer* removal and promote some degree of dentin tubules erosion, in all regions analysed, Chitosan 0,2% can be a natural substitute for EDTA 17%.

Keywords: Transforming growth factor- β 1. Vascular growth factor. Etidronic acid. Chitosan.

EDTA. Chelating agents.

SUMÁRIO

	CONSIDERAÇÕES INICIAIS	9
1	PROPOSIÇÃO	15
2	DESENVOLVIMENTO	16
2.1	TGF β1 and VEGF growth factors release after dentin conditioning: ex vivo analyses (Manuscrito)	16
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	40
	REFERÊNCIAS	41
	ANEXO A – Parecer Consubstanciado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	47
	ANEXO B – Autorização dos coautores para inserção do artigo nesta tese	48

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O tratamento de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar representa grande desafio para a terapia endodôntica (BANCHS; TROPE, 2004; CHAE; YANG; KIM, 2018; ZENG *et al.*, 2016). As paredes dentinárias delgadas e divergentes dificultam a desinfecção e a modelagem do Sistema de Canais Radiculares (SCR), tornam os dentes mais susceptíveis à fratura e aumentam a dificuldade em se estabelecer um anteparo para o material obturador (JUNG *et al.*, 2019; TROPE, 2010). O tratamento convencional preconizado nesses casos é a apicificação, definida como o processo de criação de uma barreira calcificada apical em dentes permanentes jovens com necrose pulpar (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2015b; SONGTRAKUL *et al.*, 2020). A técnica consiste na troca de medicação à base de hidróxido de cálcio, exigindo múltiplas visitas e um longo tempo de tratamento, ou a aplicação do Agregado Trióxido Mineral (MTA) como uma barreira apical artificial, permitindo a obturação do SCR em menos tempo (CHALA; ABOUQAL; RIDA, 2011; JO; B; EC, 2002; SONGTRAKUL *et al.*, 2020). No entanto, independente do material utilizado, a apicificação não tem a capacidade de restaurar a vitalidade do tecido pulpar danificado, tendo como consequências a não continuidade do desenvolvimento radicular nem o aumento em espessura das paredes SCR, permanecendo uma raiz frágil e susceptível à fratura (HARGREAVES; DIOGENES; TEIXEIRA, 2013; JO; B; EC, 2002; NICOLOSO *et al.*, 2019).

O conceito da endodontia regenerativa foi introduzido por Ostby em 1961 através de estudos (NYGAARD-ÖSTBY; HJORTDAL, 1971; ÖSTBY, 1961) que tinham como um dos objetivos explicar a importância do coágulo sanguíneo, proveniente da indução do sangramento dos tecidos perirradiculares, no processo de regeneração e reparo dos tecidos pulpares após remoção total da polpa (KIM *et al.*, 2018; TORABINEJAD; ABU-TAHUN, 2010). Apesar dos estudos demonstrarem crescimento de tecido conjuntivo fibroso no interior do SCR foi somente a partir do estudo de Iwaya *et al.* (2001) que o termo “revascularização” para tratamento de dentes permanentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta passou a ser utilizado e aplicado clinicamente (KIM *et al.*, 2018; LAW, 2013). O estudo relatou o tratamento de um segundo pré-molar inferior direito de uma paciente de 13 anos que apresentava rizogênese incompleta e necrose pulpar, com lesão radiolúcida no periápice e periodontite apical associada à fístula. A técnica, realizada em várias etapas, consistiu,

basicamente, na abertura coronária e irrigação da porção cervical com hipoclorito de sódio 5% (NaOCl) associado a água oxigenada 3% (H₂O₂) e aplicação de pasta antibiótica (metronidazol e ciprofloxacino) até a total remissão de sinais e sintomas. Na sexta consulta uma pasta de hidróxido de cálcio [Ca (OH)₂] foi colocada no interior do SCR (em contato com um tecido vital, localizado apicalmente, que podia ser observado através do exame visual), acompanhada do selamento coronário definitivo. O controle radiográfico de trinta meses, após o início dos procedimentos, demonstrou haver completo fechamento apical e aumento da largura das paredes dentinárias, comprovando assim o sucesso do tratamento (IWAYA; IKAWA; KUBOTA, 2001). A partir daí outros relatos de caso utilizando a mesma técnica começaram a surgir e Banchs e Trope (2004) propuseram um protocolo clínico que passou a ser adotado pela Associação Americana de Endodontistas (AAE) nas “Considerações Clínicas para um procedimento regenerativo” em 2016.

A revascularização pulpar ou Tratamento Endodôntico Regenerativo (RET) é definida pela AAE como "procedimentos baseados na biologia projetados para substituir estruturas danificadas, incluindo estruturas de dentina e raízes, bem como células do complexo dentino pulpar" (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2015a, p. 2; DENIZ SUNGUR *et al.*, 2019). A técnica, sugerida e atualizada pela AAE em 2018, consiste basicamente na desinfecção do SCR com soluções irrigadoras adequadas e medicação intracanal (pasta antibiótica ou a base de hidróxido de cálcio), indução de sangramento da região periapical, barreira coronária com MTA e restauração do elemento dentário (ERAMO *et al.*, 2018). O objetivo é preencher o espaço do SCR com coágulo sanguíneo que servirá como uma rede de fibrina tridimensional, *scaffold*, contendo células sanguíneas, fatores de crescimento e citocinas iniciando assim a formação de um novo tecido (CHAE; YANG; KIM, 2018).

Os fatores de crescimento são substâncias biologicamente ativas, sintetizados pela maioria das células, que se ligam a receptores específicos na membrana de células-alvo provocando uma cascata bioquímica intracitoplasmática, interferindo, assim, em uma série de atividades celulares, como por exemplo: migração, proliferação, diferenciação e apoptose celular, incluindo as células estaminais (ATESCI *et al.*, 2020; WIDBILLER *et al.*, 2017).

Dentre os diversos fatores de crescimento armazenados na dentina, o fator de transformação do crescimento β 1 (TGF- β 1) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) são de especial interesse para a endodontia (MAZZONI *et al.*, 2012; SCHMALZ; WIDBILLER; GALLER, 2017).

O TGF- β 1 é a isoforma (super família TGF- β : TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3) mais abundante, responsável por regular uma grande quantidade de processos biológicos (produção de matriz extracelular, proliferação, sobrevivência, diferenciação dos odontoblastos, reconhecimento, apoptose e migração celular) importantes na regulação da resposta imunológica, angiogênese, cicatrização de lesões, desenvolvimento do organismo e metabolismo ósseo (CHAE; YANG; KIM, 2018; GOLDBERG; SMITH, 2004; SMITH *et al.*, 2016). Na endodontia, em casos de lesões inflamatórias periapicais, tem sido relacionado a modulação da resposta inflamatória e ao processo de reparo das mesmas, além de controlar o processo de cicatrização no complexo dentino pulpar (FERREIRA; PUPPIN-RONTANI; PASCON, 2020; GALLER *et al.*, 2015).

Já o fator de crescimento vascular endotelial VEGF-A ou simplesmente VEGF é o mais abundante dentre as sete isoformas encontradas (VEGF-A, B, C, D, E, F, fator de crescimento placentário (PIGF) (MATTUELLA; BENTO, 2007). Sintetizado por várias células (células endoteliais, tumorais, células musculares lisas macrófagos, linfócitos, monócitos, megacariócitos) é considerado um potente mitótico, capaz de regular a expressão de diversas enzimas envolvidas no aumento da permeabilidade vascular e no processo da angiogênese, fundamentais na cicatrização de feridas e no desenvolvimento tecidual (ATESCI *et al.*, 2020; GRAZUL-BILSKA *et al.*, 2003; MATSUSHITA *et al.*, 2000). A angiogênese é o mecanismo de crescimento de novos vasos sanguíneos, regulado por células estaminais (células com capacidade para darem origem às células especializadas que constituem os tecidos e órgãos do nosso corpo), a partir dos vasos já existentes. Na endodontia regenerativa a sobrevivência do novo tecido formado está estritamente ligada à formação de novos vasos nos sítios de intervenção, garantindo o suprimento adequado de oxigênio e nutrientes para os processos reparadores (JUN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2011).

Estes fatores de crescimento, assim como as citocinas e uma série de outras moléculas bioativas estão armazenados na dentina, de forma inativa, pois são secretados pelos odontoblastos durante a dentinogênese (DUNCAN; KOBAYASHI; SHIMIZU, 2018). Sempre que necessário estas substâncias podem ser reativadas e liberadas na resposta do complexo dentino pulpar, frente aos agentes agressores, desempenhando funções biológicas essenciais, como a sinalização intracelular, a diferenciação de células progenitoras, a proliferação celular e a mineralização (CHAE; YANG; KIM, 2018; FINKELMAN *et al.*, 1990; ZHANG *et al.*, 2011).

Diversos materiais dentários como os ácidos, adesivos fosfóricos, hidróxido de cálcio, MTA, agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), e ainda o ácido láctico, produzido pela fermentação bacteriana durante o desenvolvimento da cárie dental, são fatores capazes de promover a desmineralização dentinária liberando assim estas substâncias biologicamente ativas, que por sua vez, modificam a resposta imunológica, interferindo diretamente no recrutamento e diferenciação das células tronco envolvidas no processo de reparo tecidual (FERRACANE; COOPER; SMITH, 2013; GALLER *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2016).

O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é a substância quelante mais utilizada como irrigante final após a desinfecção do SCR devido sua capacidade de remover a *smear layer*, uma camada de esfregaço (fina, irregular, amorfa, composta de matéria orgânica e inorgânica: microorganismos, raspas de dentina, fragmentos de processos odontoblásticos) gerada a partir da fricção dos instrumentos endodônticos com as paredes dentinárias (RATIH; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020; SERPER; SEMRA, 2002). O EDTA reage e remove os íons cálcio presentes nos cristais de hidroxiapatita dentina provocando a desmineralização e o aumento da rugosidade das paredes dentinárias o que conseqüentemente altera a composição química da mesma (topografia e molhabilidade) resultando em uma superfície limpa e túbulos dentinários abertos, favorecendo assim o embricamento dos materiais de preenchimento, a liberação de fatores de crescimento responsáveis pelos mecanismos de reparo tecidual, além de melhorar a adesão das células tronco em casos de RET (AYOUB *et al.*, 2020; GALLER *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2016). Porém, estudos apontam alguns efeitos indesejáveis do EDTA: é um fraco agente antibacteriano (RATIH; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020; TORABINEJAD *et al.*, 2003), a utilização prolongada, superior a 5 minutos, pode levar a redução da microdureza dentinária resultando em fraturas radiculares (GANDOLFI *et al.*, 2019; TARTARI *et al.*, 2013), quando utilizado simultaneamente ao NaOCl, tem influência negativa nas propriedades antibacterianas e na capacidade de dissolução tecidual do mesmo devido a diminuição da quantidade de cloro livre disponível na mistura (ULUSOY; MANTI; ÇELIK, 2020; ZEHNDER *et al.*, 2005) e diminuição da capacidade de remover *smear layer* no terço apical, provavelmente devido à alta tensão superficial da região (HÜLSMANN; HECKENDORFF; LENNON, 2003; ULUSOY; MANTI; ÇELIK, 2020).

Outras substâncias químicas também capazes de promover a desmineralização da dentina, removendo *smear layer*, vêm sendo pesquisadas a fim de suprir as desvantagens da

utilização do EDTA, como a quitosana (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2015; RATIH; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020) e o ácido etidrônico (ARIAS-MOLIZ *et al.*, 2014; DENIZ SUNGUR *et al.*, 2019).

As pesquisas sobre a quitosana datam do século XIX (DODANE; VILIVALAM, 1998). Porém os estudos a respeito da sua aplicação como biomaterial só se intensificaram nos últimos 25 anos, sendo utilizada principalmente na veiculação de medicamentos e na engenharia de tecidos (DODANE; VILIVALAM, 1998; TAVARIA *et al.*, 2013). A quitosana é um polissacarídeo natural obtido a partir da desacetilação da quitina, que existe abundantemente na natureza como componente estrutural do exosqueleto de artrópodes (incluindo crustáceos e insetos), diatomáceas, algas e paredes celulares de alguns fungos (KIM *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2013). É biocompatível, biodegradável, não tóxica a células humanas, antioxidante, antimicrobiana (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2015; DUCRET *et al.*, 2019; JAISWAL *et al.*, 2017), podendo ser encontrada nas formas de flocos secos, pó fino e solução (SHRESTHA; KISHEN, 2016). Devido sua estrutura química, um polícatión linear com elevada densidade de carga, grupos reativos e inúmeras ligações de hidrogênio, suas propriedades mecânicas e biológicas podem ser facilmente modificadas permitindo assim ampla utilização em diferentes áreas como: biomedicina (suturas cirúrgicas, implantes dentários, reconstituição óssea, lentes de contato, liberação controlada da medicamentos, encapsulamento de materiais), agricultura (mecanismos defensivos e adubo para plantas), nas indústrias alimentícia (fibras dietéticas, redutor de colesterol, conservante, fungicida e bactericida, revestimento para frutos), farmacêutica (imunológico, antitumoral, hemostático e anticoagulante) e cosmética (esfoliante para a pele, tratamento do acne, hidratante capilar, creme dental) (DODANE; VILIVALAM, 1998; MORIN-CRINI *et al.*, 2019; MUXIKA *et al.*, 2017; TAVARIA *et al.*, 2013). As aplicações da quitosana na odontologia devem-se às suas propriedades bioadesivas e antimicrobianas, liberação prolongada de medicamentos na cavidade oral, eficácia no tratamento de doenças periodontais, redução da placa dentária, regeneração óssea e diminuição da inflamação e ainda como esponjas porosas que induzem a diferenciação e proliferação celular (BARRERAS *et al.*, 2016; BELLAMY *et al.*, 2016; BOYNUEĞRI *et al.*, 2009; VERKAİK *et al.*, 2011). Na endodontia está sendo incorporada, de forma experimental, aos cimentos endodônticos e às pastas de hidróxido de cálcio como medicação intracanal, promovendo liberação prolongada de íons cálcio (BALLAL *et al.*, 2019; LOYOLA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019; SHAIK; REDDY, 2017). A sua propriedade quelante de íons metálicos (Ca^{++} e Mg^{++}) vem orientando a sua utilização para a remoção de

smear layer (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2015; KRAMBLE *et al.*, 2017; PIMENTA *et al.*, 2012; RATHI; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020; SILVA *et al.*, 2013).

O ácido etidrônico ou etidronato (1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate) (HEBP) é um bifosfanato ativo, administrado por via oral ou venosa, capaz de inibir a reabsorção e remodelação óssea por meio de diversos mecanismos celulares (são absorvidos pelos osteoclastos, quebram a formação do citoesqueleto necessário para a fixação destas células no osso e reduzem a secreção das enzimas lisossomiais) que levam a inibição dos osteoclastos sendo recomendado no tratamento de osteoporose e doença de Paget (MOORE; TANNER; SCHOENECKER, 2015; POVOROZNYUK *et al.*, 2018). Estudos demonstram que o HEBP é biocompatível e possui atividade quelante semelhante ao EDTA ou ácido cítrico, podendo ser utilizada conjuntamente com o NaOCl, sem interferir em suas propriedades químicas, como um único irrigante (solução NaOCl/HEBP), simplificando a etapa de irrigação do SCR e economizando tempo clínico, uma vez que uma única solução teria atividade antimicrobiana, capacidade de dissolver matéria orgânica, reduzir a formação da *smear layer*, além de ser menos agressivo a dentina (ARIAS-MOLIZ *et al.*, 2014; DENIZ SUNGUR *et al.*, 2019; PAQUÉ; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012). Apesar da administração sistêmica dos bifosfanatos, por longos períodos, estar associada a osteonecrose dos maxilares, não há relatos sobre este desfecho com o uso de HEBP.

Do ponto de vista clínico, uma solução quelante ideal para ser utilizada nos tratamentos endodônticos regenerativos seria aquela capaz de liberar uma maior quantidade de fatores de crescimento no interior do SCR, favorecendo assim o processo de reparo do complexo dentino pulpar. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar, *ex vivo*, a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF no interior do SCR, utilizando os diferentes agentes quelantes: EDTA, Quitosana e HEBP, seguindo o protocolo de irrigação para o tratamento endodôntico regenerativo sugerido pela AAE.

1 PROPOSIÇÃO

A presente tese apresentou como objetivos:

Investigar *ex vivo* a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF no interior do SCR após condicionamento com os agentes quelantes: EDTA, Quitosana e HEBP, utilizando o teste Imunoenzimático (ELISA).

Comparar a eficácia dos diferentes agentes quelantes na remoção da *smear layer* e erosão dos túbulos dentinários por meio de análise Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

2 DESENVOLVIMENTO

Nesta seção será apresentado o artigo proveniente da tese de doutorado.

2.1 TGF β 1 and VEGF growth factors release after dentin conditioning: ex vivo analyses

(Manuscrito)

Artigo será submetido ao periódico International Endodontic Journal classificado no Qualis da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), na Área de Avaliação de Odontologia, como A1.

Liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF após condicionamento dentinário com agentes quelantes: análise *ex vivo*

M. V. Tomaz¹, B.P. Coelho¹; J. M. M. Tinoco², M.V. Colaço³, T. R. Correia⁴, M. R. Almeida⁵, P. R. Z. Antas⁵, L. M. Sassone¹

¹ Departamento de Procedimentos Clínicos Integrados, Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil.

² Departamento de Endodontia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil.

³ Laboratório de Física Aplicada às Ciências Biomédicas e Ambientais, Instituto de Física, Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil.

⁴ Laboratório de processamento de polímeros IQ-UERJ, Instituto de Química, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil.

⁵ Departamento de Imunologia, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brasil.

Resumo

Objetivo: investigar, *ex vivo*, a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF, armazenados na dentina, após condicionamento com os agentes quelantes: EDTA, Quitosana e Ácido etidrônico (HEBP) e a remoção da camada da *smear layer* e o grau de erosão dos túbulos dentinários também foram analisados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). **Metodologia:** para confecção dos corpos de prova foram selecionados um total de setenta e dois dentes permanentes, unirradiculares, com canal único e sem cáries, fraturas, reabsorção e/ou tratamento endodôntico prévio. Os elementos dentários tiveram suas porções coronária e apical removidas para confecção de cilindros de dentina com oito mm de comprimento. O interior de cada cilindro foi preparado com broca de Gates Glidden número quatro para padronização do diâmetro interno em 1mm. Todos os corpos de prova foram irrigados inicialmente com 20 mL de 1,5% NaOCl durante 5 min e então distribuídos aleatoriamente em quatro grupos (n=9 para cada grupo) com diferentes protocolos de irrigação final: 17% EDTA (20mL/5 min), 0,2% Quitosana (20 mL/5 min), 9% HEBP (20 mL/5min) e, solução salina (20 mL/5 min). Após irrigação, trinta e seis corpos de prova foram armazenados em microtubos tipo Eppendorf de 1,5mL contendo meio de cultura α -MEM, 100 U/mL de penicilina e 100 U/mL de estreptomicina a 37°C por vinte e quatro horas. Após este período o sobrenadante contido em cada microtubo foi coletado e a liberação dos fatores de crescimento foi quantificada utilizando-se o teste imunoenzimático ELISA. Não foi realizada análise estatística destes dados, pois não foi detectada a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF nos grupos testados. Os demais trinta e seis corpos de prova foram cortados no sentido mesio-distal para realização de fotomicrografias dos terços cervical, médio e apical com objetivo de comparar a eficácia dos diferentes agentes quelantes na remoção da *smear layer* e grau de erosão dos túbulos dentinários utilizando-se análise por MEV. Os dados foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e Dunn com um nível de significância $\alpha = 0,05$. **Resultados:** A irrigação final com os agentes quelantes EDTA 17%, Quitosana 0,2% e HEBP 9% foi eficiente na remoção da camada de *smear layer* além de promover erosão dos túbulos dentinários, sem diferença significativa entre os grupos testados. **Conclusão:** 1) Não foi possível quantificar a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF com o Kit ELISA utilizado; 2) Como todos agentes quelantes testados foram

eficientes na remoção da camada de *smear layer* e promoveram algum grau de erosão dos túbulos dentinários, em todas as regiões analisadas, a Quitosana 0,2% pode ser um substituto natural ao EDTA 17%.

Palavras-chave: fator de transformação de crescimento; fator de crescimento vascular endotelialácido etidrônico; quitosana; EDTA; agentes quelantes.

Introdução

As paredes dentinárias delgadas e divergentes dos dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar dificultam a desinfecção e a modelagem do sistema de canais radiculares (SCR), tornam os dentes mais susceptíveis à fratura e aumentam a dificuldade em se estabelecer um anteparo para o material obturador (JUNG *et al.*, 2019; TROPE, 2010).

O tratamento convencional preconizado nesses casos é a apicificação, definida como o processo de criação de uma barreira calcificada apical em dentes permanentes jovens com necrose pulpar (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2015b; SONGTRAKUL *et al.*, 2020). A técnica consiste na troca de medicação à base de hidróxido de cálcio, exigindo múltiplas visitas e um longo tempo de tratamento, ou a aplicação do Agregado Trióxido Mineral (MTA) como uma barreira apical artificial, permitindo a obturação do SCR em menos tempo (CHALA; ABOUQAL; RIDA, 2011; JO; B; EC, 2002; SONGTRAKUL *et al.*, 2020). No entanto, independente do material utilizado, a apicificação não tem a capacidade de restaurar a vitalidade do tecido pulpar danificado, tendo como consequências a não continuidade do desenvolvimento radicular nem o aumento em espessura das paredes SCR, permanecendo uma raiz frágil e susceptível à fratura (HARGREAVES; DIOGENES; TEIXEIRA, 2013; JO; B; EC, 2002; NICOLOSO *et al.*, 2019).

O Tratamento Endodôntico Regenerativo (RET) é um conjunto de procedimentos baseados na tríade da engenharia de tecidos (*scaffold*, células tronco e fatores de crescimento) que têm por objetivo substituir estruturas danificadas, incluindo dentina, raízes e as células do complexo dentino pulpar (HARGREAVES; DIOGENES; TEIXEIRA, 2013; NICOLOSO *et al.*, 2019). A técnica proposta pela AAE consiste, basicamente, na desinfecção do SCR por meio de irrigação copiosa associada a medicações intracanaís, seguido da indução de sangramento dos tecidos periapicais (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2015a). O objetivo da técnica é preencher o espaço do SCR com coágulo sanguíneo que

servirá como uma rede de fibrina tridimensional, *scaffold*, contendo células sanguíneas, fatores de crescimento e citocinas que serão capazes de iniciar a formação de um novo tecido promovendo assim, a formação contínua das raízes (KIM *et al.*, 2018; LOVELACE *et al.*, 2011).

Os fatores de crescimento são substâncias biologicamente ativas, sintetizados pela maioria das células, que se ligam a receptores específicos na membrana de células-alvo provocando uma cascata bioquímica intracitoplasmática, interferindo, assim, em uma série de atividades celulares (ATESCI *et al.*, 2020; WIDBILLER *et al.*, 2017). Estes fatores, assim como as citocinas e uma série de outras moléculas bioativas, estão armazenados na dentina, de forma inativa, pois foram secretados pelos odontoblastos durante a dentinogênese (DUNCAN; KOBAYASHI; SHIMIZU, 2018; ZENG *et al.*, 2016). Sempre que necessário estas substâncias podem ser reativadas e liberadas na resposta do complexo dentino pulpar, frente aos agentes agressores, desempenhando funções biológicas essenciais, como a sinalização intracelular, a diferenciação de células progenitoras, a proliferação celular e a mineralização (CHAE; YANG; KIM, 2018; ZHANG *et al.*, 2011). O fator de transformação do crescimento $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) e o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) são de especial interesse para a endodontia regenerativa por estarem associados aos processos de reparo da dentina e da polpa regulando a migração de células inflamatórias para o sítio da lesão e promovendo a formação de novos vasos sanguíneos, respectivamente (MAZZONI *et al.*, 2012; SCHMALZ; WIDBILLER; GALLER, 2017).

Diversos materiais dentários como os ácidos, adesivos fosfóricos, hidróxido cálcio, MTA, agentes quelantes, como o EDTA, e ainda o ácido láctico, produzido pela fermentação bacteriana durante o desenvolvimento da cárie dental, são fatores capazes de promover a desmineralização dentinária liberando estas substâncias biologicamente ativas (FERRACANE; COOPER; SMITH, 2013; GALLER *et al.*, 2011; GONÇALVES *et al.*, 2016). O ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) é a substância quelante mais utilizada como irrigante final após a desinfecção do SCR devido sua atividade quelante capaz de remover a *smear layer* (RATIH; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020; SERPER; SEMRA, 2002). O EDTA reage e remove os íons cálcio presentes nos cristais de hidroxiapatita da dentina provocando a desmineralização e o aumento da rugosidade das paredes dentinárias, alterando a composição química da mesma, resultando em uma superfície limpa e túbulos dentinários abertos, favorecendo assim a adesão dos materiais de preenchimento, a liberação de fatores de crescimento responsáveis pelos mecanismos de reparo tecidual, além de

melhorar a adesão das células tronco em casos de RET (AYOUB *et al.*, 2020; GALLER *et al.*, 2011; ZENG *et al.*, 2016). Porém, estudos apontam alguns efeitos indesejáveis do EDTA: (1) é um fraco agente antibacteriano (RATIH; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020; TORABINEJAD *et al.*, 2003); (2) a utilização prolongada, superior a 5 minutos, pode levar a redução da microdureza dentinária resultando em fraturas radiculares (GANDOLFI *et al.*, 2019; TARTARI *et al.*, 2013); (3) quando utilizado simultaneamente ao NaOCl, tem influência negativa nas propriedades antibacterianas e na capacidade de dissolução tecidual do mesmo devido a diminuição da quantidade de cloro livre disponível na mistura (ULUSOY; MANTI; ÇELIK, 2020; ZEHNDER *et al.*, 2005); (4) diminuição da capacidade de remover *smear layer* no terço apical, provavelmente devido à alta tensão superficial da região (HÜLSMANN; HECKENDORFF; LENNON, 2003; ULUSOY; MANTI; ÇELIK, 2020).

Sendo assim, outras substâncias químicas também capazes de promover a desmineralização da dentina, removendo *smear layer* e conseqüentemente liberando os fatores de crescimento dentro do SCR, veem sendo pesquisadas a fim de suprir as desvantagens da utilização do EDTA, como a quitosana (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2015; RATIH; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020) e o ácido etidrônico (ARIAS-MOLIZ *et al.*, 2014; DENIZ SUNGUR *et al.*, 2019).

A quitosana é um polissacarídeo natural obtido a partir da desacetilação da quitina (KIM *et al.*, 2008; SILVA *et al.*, 2013). É biocompatível, biodegradável, não tóxica a células humanas, antioxidante, antimicrobiana (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2015; DUCRET *et al.*, 2019; JAISWAL *et al.*, 2017), podendo ser encontrada nas formas de flocos secos, pó fino e solução (SHRESTHA; KISHEN, 2016). Na endodontia está sendo incorporada, de forma experimental, aos cimentos endodônticos e às pastas de hidróxido de cálcio como medicação intracanal, promovendo liberação prolongada de íons cálcio (BALLAL *et al.*, 2019; LOYOLA-RODRÍGUEZ *et al.*, 2019; SHAIK; REDDY, 2017). A sua propriedade quelante de íons metálicos (Ca^{++} e Mg^{++}) vem orientando a sua utilização para a remoção de *smear layer* (DEL CARPIO-PEROCHENA *et al.*, 2015; KRAMBLE *et al.*, 2017; RATIH; ENGGARDIPTA; KARTIKANINGTYAS, 2020).

O ácido etidrônico ou etidronato (1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate ou HEBP) é um bifosfanato ativo capaz de inibir a reabsorção e remodelação óssea por meio de diversos mecanismos celulares que levam a inibição dos osteoclastos (MOORE; TANNER; SCHOENECKER, 2015; POVOROZNYUK *et al.*, 2018). Estudos demonstram que o HEBP é biocompatível e possui atividade quelante semelhante ao EDTA ou ácido cítrico, podendo

ser utilizada conjuntamente com o NaOCl, sem interferir em suas propriedades químicas, como um único irrigante (solução NaOCl/HEBP), simplificando a etapa de irrigação do SCR e economizando tempo clínico, uma vez que uma única solução teria atividade antimicrobiana, capacidade de dissolver matéria orgânica, reduzir a formação da *smear layer*, além de ser menos agressivo a dentina (ARIAS-MOLIZ *et al.*, 2014; DENIZ SUNGUR *et al.*, 2019; PAQUÉ; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012).

Do ponto de vista clínico, uma solução quelante ideal para ser utilizada nos tratamentos endodônticos regenerativos seria aquela capaz de liberar uma maior quantidade de fatores de crescimento no interior do SCR, favorecendo assim o processo de reparo do complexo dentino pulpar. Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi investigar, *ex vivo*, a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF no interior do SCR, utilizando os diferentes agentes quelantes: EDTA, Quitosana e HEBP, seguindo o protocolo de irrigação para o tratamento endodôntico regenerativo sugerido pela AAE, utilizando um corpo de prova que mais se assemelha a realidade clínica.

As hipóteses nulas testadas foram: (1) não há diferença na liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF no interior do SCR quando utilizados os agentes quelantes EDTA, Quitosana e HEBP; (2) não há diferença na remoção da camada da *smear layer* e erosão dos túbulos dentinários quando utilizados os agentes quelantes EDTA, Quitosana e HEBP

Material e Métodos

Cálculo amostral

A metodologia para preparo dos corpos de prova foi baseada em Chae, Yang e Kim (2018) e Zeng *et al.* (2016). O tamanho da amostra para quantificação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF pelo Teste ELISA e a comparação da eficácia dos diferentes agentes quelantes na remoção da *smear layer* e grau de erosão dos túbulos dentinários por meio de análise microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi calculado utilizando-se o programa estatístico Software R a partir da função `power.anova.test`. Sendo assim, baseado no erro tipo I em 5% e poder em 99% o tamanho da amostra necessário para observar diferença estatística foi de 9 corpos de prova por grupo (n=9) para cada experimento.

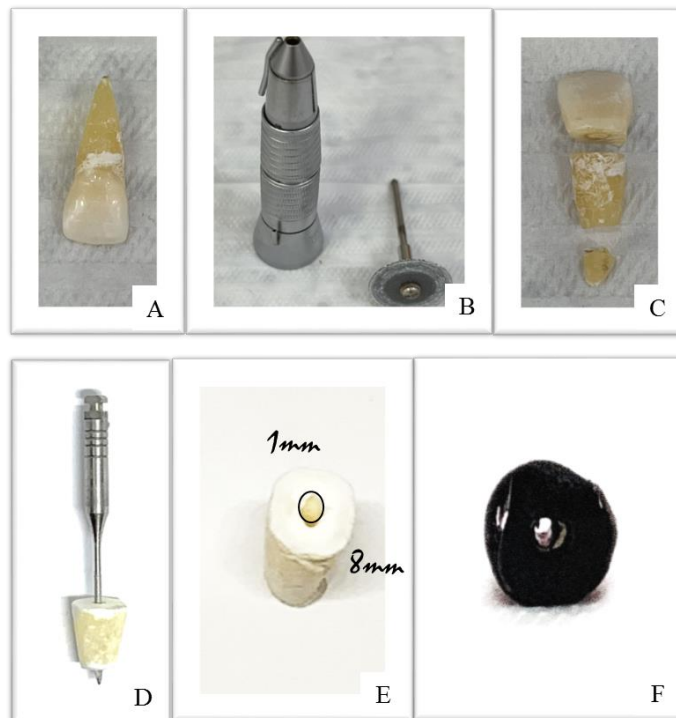
Seleção e preparo das amostras

O presente estudo foi submetido e aprovado (número do parecer 4.626.836) pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Hospital Universitário Pedro Ernesto/ Universidade do Estado do Rio de Janeiro (HUPE/UERJ). Setenta e dois dentes unirradiculares extraídos por motivo alheios a pesquisa foram obtidos através de doação dos pacientes, das Disciplinas de Periodontia e Cirurgia da Faculdade de Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (FO-UERJ). Os elementos dentários foram extraídos por motivos de doença periodontal ou por motivos ortodônticos. Imediatamente após a extração os dentes foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline (PBS)*, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) e os tecidos periodontais remanescentes foram removidos da superfície radicular com auxílio de uma lâmina de bisturi de aço carbono estéril (NR15C, Labor Import, Osasco, SP). Após a limpeza total foram realizadas duas tomadas radiográficas, nos sentidos vestibulo-lingual e méso-distal, para cada elemento dentário, a fim de serem selecionados apenas elementos que obedeceram aos seguintes critérios: dentes permanentes, sem cáries, canal único, sem fraturas, sem reabsorção e/ou tratamento endodôntico prévio (Figura, legenda A). Com o auxílio de um disco de carborundum, acoplado a um micromotor e peça de mão (Figura, legenda B), a porção coronal e o ápice, de cada elemento dentário foram removidos (Figura, legenda C) para a obtenção de cilindros de dentina com 8 mm de comprimento medidos em régua endodôntica (Dentsply Sirona, Pensilvânia, EUA). Em seguida, os cilindros foram preparados com brocas *Gates Glidden* nº 4 de 28 mm (Dentsply Sirona) para ampliação e padronização do diâmetro interno em 1 mm (Figura, legenda D). Os corpos de prova foram padronizados em cilindros de 8mm de comprimento e 1 mm de diâmetro interno (Figura, legenda E).

As superfícies radiculares externas foram recobertas por esmalte de unhas na cor preta (Figura, legenda F) (Impala, Guarulhos, SP, Brasil) para que as soluções irrigadoras utilizadas entrassem em contato somente com as paredes internas do SCR. Posteriormente, os corpos de prova foram irrigados com 20 ml de solução salina por cinco minutos seguidos de três minutos com água deionizada para remoção de possíveis debris provenientes do processo de padronização. Por fim, foram secos com pontas de papel absorvente calibre oitenta *Cell Pack* (DentsplySirona, Vila Gertrudes, São Paulo, SP, Brasil) e armazenados em um microtubo tipo *Eppendorf* (Eppendorf Tubes 3810X, Eppendorf, Alto da Lapa, SP, Brasil) até o momento da utilização. Do total dos 72 corpos de prova confeccionados e irrigados, trinta e seis (n=9 por

grupo) foram utilizados para quantificação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF pelo Teste Imunoenzimático (ELISA) e os outros trinta e seis (n= 9 por grupo) foram utilizados para comparar a eficácia dos diferentes agentes quelantes na remoção da *smear layer* e grau de erosão dos túbulos dentinários por meio de análise microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura - Preparo das amostras



Legenda: (A) dente selecionado; (B) disco de cardorundum acoplado a peça de mão; (C) coroa e ápice cortados; (D) instrumentação interna com broca de gates glidden; (E) corpos de provas padronizados em 8mm de comprimento e 1 mm diâmetro interno; (F) superfícies externas recobertas com esmalte de unhas.

Fonte: A autora, 2023.

Determinação da concentração das soluções irrigadoras

As soluções NaOCl a 1,5% e EDTA 17% foram adquiridas na forma pronta para uso e as soluções Quitosana 0,2% e HEBP 9% foram preparadas como a seguir:

HEBP - 9g de HEBP em pó pesado em balança de precisão eletrônica (Bioprecisa, Curitiba, Paraná, Brasil) foram adicionados a 100 ml de água deionizada. A mistura foi colocada em agitador magnético até obtenção solução homogênea (TARTARI *et al.*, 2013).

Quitosana - 0,2g de quitosana em pó pesado em balança de precisão eletrônica foram adicionados a 100 mL de ácido acético 1%. A mistura foi colocada em agitador magnético por 2 horas, até obtenção de solução homogênea (PIMENTA *et al.*, 2012).

Irrigação dos corpos de prova

Inicialmente, uma fina camada de aproximadamente 0,3 mm de cera utilidade *Newwax* (TECHNEW Comércio e Indústria LTDA, Rio de Janeiro, Brasil) foi aplicada na região apical de cada corpo de prova para simular o ligamento periodontal.

Os corpos de prova foram então posicionados em mini torno acadêmico (Belo Horizonte, MG, Brasil) para irrigação inicial e aspiração de 20mL de NaOCl 1,5% (M2M) durante cinco minutos, utilizando uma seringa hipodérmica de 5ml e agulha Endo-Eze de calibre 30 (Ultradent Products Inc; South Jordan, UT, EUA) posicionada 1mm aquém do ápice, e sugador endodôntico (SSplus, Maringá, PR, Brasil).

O tempo necessário para executar cada irrigação/aspiração foi registrado com um cronômetro digital permanecendo consistente entre todos os grupos. Posteriormente, os corpos de prova foram distribuídos em três grupos experimentais (EDTA 17%, Quitosana 0,2%, HEBP 9%) e um grupo controle (Solução salina 0,9% (NaCl)).

Após o período de irrigação final os corpos de prova foram irrigados com 20ml, durante cinco minutos, de água deionizada, para remoção total das soluções irrigadoras e em seguida foram secos com pontas de papel absorvente calibre oitenta *Cell Pack* (DentsplySirona, Vila Gertrudes, São Paulo, SP, Brasil).

Após a secagem, os corpos de prova foram separados, aleatoriamente, em dois grandes grupos. Trinta e seis foram utilizados para a análise por ELISA e o restante para a análise por MEV, conforme descrito a seguir.

Quantificação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF pelo Teste Imunoenzimático (ELISA)

Os trinta e seis corpos de prova foram armazenados em microtubos tipo Eppendorf de 1,5mL (Eppendorf Tubes 3810X, Eppendorf, Alto da Lapa, SP, Brasil) contendo 1mL do meio de cultura α - MEM (Sigma-Aldrich) suplementado com 100 U/mL de penicilina (LGC Biotecnologia, Cotia, São Paulo, Brasil) e 100 U/mL de estreptomicina (LGC Biotecnologia) em 37°C por vinte e quatro horas. Após este período, a solução contida em cada microtubo (Eppendorf,) foi coletada e a quantificação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF, liberados no meio, foi medida utilizando-se um teste imunoenzimático do tipo ELISA (R&D systems, Minneapolis MN, EUA), de acordo com as orientações do fabricante.

Comparação da eficácia dos diferentes agentes quelantes na remoção da *smear layer* e grau de erosão dos túbulos dentinários por meio de análise microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A remoção da camada de *smear layer* pelos agentes quelantes e o grau de erosão dos túbulos dentinários, em 36 corpos de prova, foram observados por MEV JEOL JSM6510-LV (JEOL, Jabaquara, SP, Brasil) em detector de elétrons secundários (SEI).

Para tal, foram realizadas marcações em lados opostos das superfícies externas (mesial e distal) de cada corpo de prova. Os sulcos longitudinais foram confeccionados com um disco de carborundum cinza (22 x 0,6mm, Dentorium, Nova Iorque, EUA) acoplado a um micromotor e peça de mão (KaVo, Birebach, Göppingen, Alemanha). Nesta fase, tomou-se cuidado em relação a profundidade do sulco realizado, para que o disco de carborundum não entrasse em contato com o interior do SCR, evitando assim a deposição de resíduos dentinários sobre a superfície a ser analisada. Para completar o processo de clivagem foi utilizado um cinzel bizelado (S.S White Duflex, Rio de Janeiro, RJ, Brazil). Para a análise em MEV, foi escolhida a hemissecação com menos irregularidades e que melhor representou a extensão total do SCR. A parte escolhida foi então fixada em *stubs* de latão com auxílio de pinça clínica e fita dupla face de carbono e transferida para a câmara de um equipamento de secagem, despressurização e recobrimento de amostras (Leica EM SCD 500, Leica Microsystems, Brasil) com deposição de íons metálicos. O íon metálico utilizado foi o ouro, a fim de melhorar o nível de emissão de elétrons e assim, facilitar a construção da imagem.

As amostras foram visualizadas utilizando aceleração de voltagem de 20kV com a magnificação 500x e uma área de 50 μm . As fotomicrografias foram obtidas dos terços cervical (S1), médio (S2) e apical (S3) de cada. No total foram obtidas cento e oito fotomicrografias.

Finalizado a etapa de MEV, as imagens das fotomicrografias foram armazenadas em *pendrive*, até o momento da avaliação que foi realizada por dois examinadores independentes, que foram devidamente treinados e calibrados.

Critério de avaliação das fotomicrografias

As 108 fotomicrografias, armazenadas em *pendrive*, identificadas apenas pelo número do corpo de prova e região a ser avaliada, além de uma ficha para a marcação dos seus escores foram entregues aos dois examinadores calibrados e cegos quanto a alocação dos espécimes nos grupos experimentais. Também foram entregues aos examinadores os gabaritos demonstrativos de cada escore a partir das imagens das fotomicrografias das amostras deste estudo. Os critérios de escolha dos escores foram claramente explicados e os examinadores foram orientados que, em caso de dúvida entre um e outro escore, deveria se optar pelo mais alto. Os escores adotados estão de acordo com o sistema de critérios estabelecidos por Torabinejad *et al.* (2003) com modificações como descrito a seguir:

Escores para presença ou ausência da camada de *smear layer*:

1 Pouca ou nenhuma *smear layer*. Sem presença *smear layer* na superfície do SCR; todos os túbulos dentinários limpos e abertos;

2 *Smear layer* moderada. Sem presença *smear layer* na superfície do SCR; porém há presença de debris nos túbulos dentinários;

3 Bastante *smear layer*. *Smear layer* cobrindo toda superfície do SCR e túbulos dentinários.

Escores para o grau de erosão dos túbulos dentinários:

1 Sem erosão. Todos os túbulos estão normais na aparência e tamanho;

2 Erosão moderada. A dentina peritubular apresenta sinais de erosão;

3 Bastante erosão. Dentina peritubular destruída e túbulos conectados uns com os outros.

Os escores atribuídos pelos examinadores a cada fotomicrografia foram anotados em planilhas de *Excel* e encaminhados para análise estatística. Duas situações foram analisadas: se houve diferença estatística entre os grupos experimentais (A, B, C e D) e se houve diferença estatística entre as regiões analisadas (S1, S2, S3).

Análise Estatística

Para a quantificação dos fatores de crescimento pelo teste ELISA os dados foram submetidos aos testes de normalidade *Shapiro Wilk* e analisados por meio dos testes de *One Way Anova*. As análises foram realizadas com um nível de significância $\alpha = 0,05$. O pacote estatístico Minitab20 foi utilizado em todas as análises.

Para a análise em MEV os dados obtidos foram submetidos ao teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, considerando os terços cervical (S1), médio (S2) e apical (S3), separadamente. As comparações entre as médias da soma dos postos foram realizadas através do teste de *Dunn*. As análises foram realizadas com um nível de significância $\alpha = 0,05$. O pacote estatístico *Prism 9* (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA) foi utilizado em todas as análises.

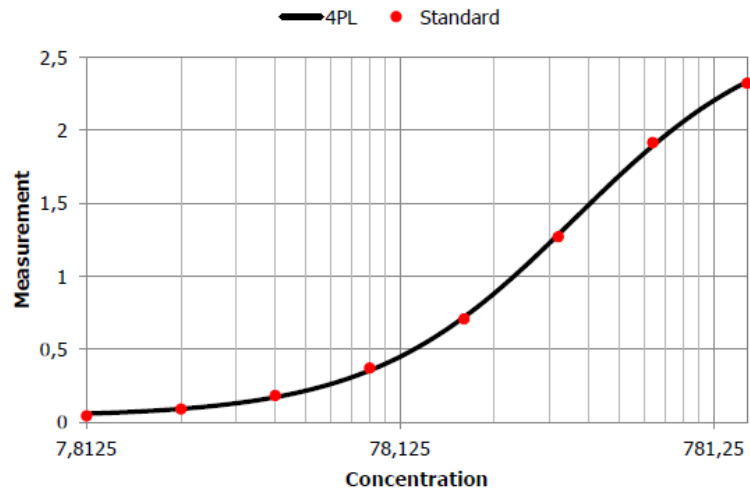
O teste estatístico empregado para avaliação da concordância entre os dois examinadores foi coeficiente *Kappa* (GraphPad by Dotmatics, Boston, MA, EUA), o qual é utilizado para casos de dois ou mais examinadores no estudo e dados categóricos. Observou-se que o nível de concordância entre os examinadores foi de 0,896, evidenciando uma concordância quase excelente.

Resultados

Análise da liberação de fatores de crescimento por meio do Teste Imunoenzimático ELISA

Não foi detectada a presença dos fatores de crescimento TGF- β 1 e VEGF nos grupos testados. Os sobrenadantes, coletados de cada microtubo, estão fora do intervalo do ajuste da curva e/ou do intervalo dos padrões. As curvas padrão indicadas pelo fabricante variaram entre 7,8125 a 1000 pg/mL (Figuras 1 e 2).

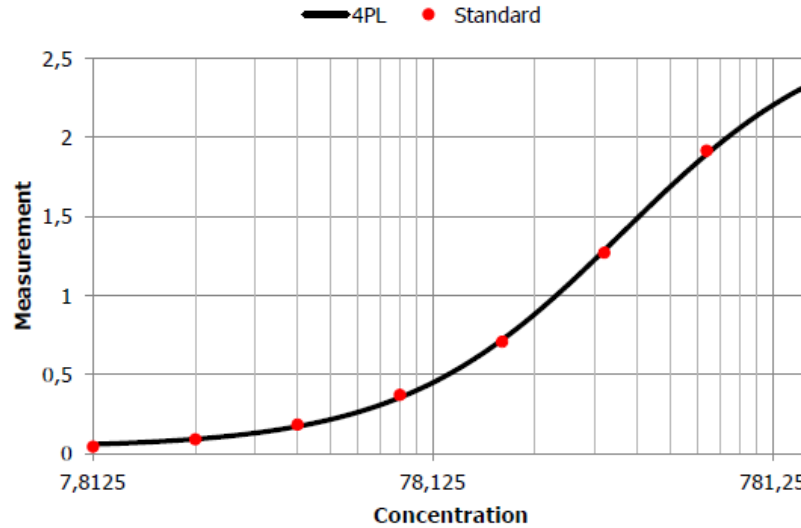
Figura 1- Curva padrão dosagem sobrenadante TGF- β 1
 ELISA VEGF - SOBRENADANTE -26102022



Calibrator	Well	Conc.	Raw	Backfit	Recovery %
● Standard1	A1	1000	2,32	978,8	97,88
● Standard2	B1	500	1,92	515,5	103,1
● Standard3	C1	250	1,27	245,7	98,28
● Standard4	D1	125	0,708	123	98,38
● Standard5	E1	62,5	0,371	65,33	104,5
● Standard6	F1	31,25	0,183	33,39	106,8
● Standard7	G1	15,63	0,091	15,58	99,69
● Standard8	H1	7,813	0,043	3,158	40,42

Figura 2 - Curva padrão dosagem sobrenadante VEGF

ELISA VEGF - SOBRENADANTE -26102022



Calibrator	Well	Conc.	Raw	Backfit	Recovery %
● Standard1	A1	1000	2,32	978,8	97,88
● Standard2	B1	500	1,92	515,5	103,1
● Standard3	C1	250	1,27	245,7	98,28
● Standard4	D1	125	0,708	123	98,38
● Standard5	E1	62,5	0,371	65,33	104,5
● Standard6	F1	31,25	0,183	33,39	106,8
● Standard7	G1	15,63	0,091	15,58	99,69
● Standard8	H1	7,813	0,043	3,158	40,42

Análise da remoção da camada de *smear layer* e da erosão dos túbulos dentinários

Como pode ser observado na tabela 1, independente do terço radicular analisado, o EDTA 17% e a Quitosana 0,2% apresentaram capacidades semelhantes na remoção da camada de *smear layer* ($p>0,05$). No entanto, o EDTA 17% foi melhor na remoção da camada de *smear layer* quando comparado ao HEBP 9% e ao NaCl 0,9% ($p<0,05$), assim como a Quitosana 0,2% demonstrou melhor remoção da camada de *smear layer* quando comparada ao NaCl 0,9%. Não houve diferença estatística entre Quitosana 0,2% e HEBP 9%.

Considerando os valores estatísticos da Tabela 1, pode-se inferir que os grupos EDTA 17% e Quitosana 0,2% apresentaram menor presença de *smear layer* nos três terços radiculares.

Em relação à erosão dos túbulos dentinários, os resultados do teste de *Dunn* para os três terços radiculares (S1, S2 e S3) são apresentados na Tabela 2. Com base nos valores estatísticos da Tabela 2, observa-se que os grupos EDTA 17% e Quitosana 0,2% produziram um grau maior de erosão dos túbulos dentinários. Quando comparados ao ácido etidrônico e NaCl, sem diferença estatística entre os últimos.

Tabela 1 – Comparações múltiplas entre as médias da soma dos postos para todos os grupos em relação a remoção da camada da *smear layer*

Comparações	Diferença entre a média da soma dos postos	Valor de p	Significância
S1			
EDTA 17% vs. Quitosana 0,2%	-2,778	> 0,05	*ns
EDTA 17% vs. HEBP 9%	-12,39	0,0487	*s
EDTA 17% vs. NaCl	-21,72	< 0,0001	*s
Quitosana 0,2% vs. HEBP 9%	-9,611	0,2401	*ns
Quitosana 0,2% vs. NaCl	-18,94	0,0003	*s
HEBP 9% vs. NaCl	-9,333	0,2768	*ns
S2			
EDTA 17% vs. Quitosana 0,2%	-2,778	0,9999	*ns
EDTA 17% vs. HEBP%	-14,72	0,0088	*s
EDTA 17% vs. NaCl	-22,50	< 0,0001	*s
Quitosana 0,2% vs. HEBP 9%	-11,94	0,0592	*ns
Quitosana 0,2% vs. NaCl	-19,72	0,0001	*s
HEBP 9% vs. NaCl	-7,778	0,5575	*ns
S3			
EDTA 17% vs. Quitosana 0,2%	-7,333	0,6831	*ns
EDTA 17% vs. HEBP 9%	-16,33	0,0026	*s
EDTA 17% vs. NaCl	-22,56	< 0,0001	*s
Quitosana 0,2% vs. HEBP 9%	-9,000	0,3139	*ns
Quitosana 0,2% vs. NaCl	-15,22	0,0062	*s
HEBP 9% vs. NaCl	-6,222	> 0,9999	*ns

Legenda: *ns – não significante; *s - significante ao nível de 5%

Fonte: A autora, 2023.

Tabela 2 – Comparações múltiplas entre a média da soma dos postos para todos os grupos

Comparações	Diferença entre a média da soma dos postos	Valor de p	Significância
S1			
EDTA 17% vs. Quitosana 0,2%	0,000	>0,9999	*ns
EDTA 17% vs. HEBP 9%	10,17	0,0912	*ns
EDTA 17% vs. NaCl	12,06	0,0240	*s
Quitosana 0,2% vs. HEBP 9%	10,17	0,0912	*ns
Quitosana 0,2% vs. NaCl	12,06	0,0240	*s
HEBP 9% vs. NaCl	1,889	>0,9999	*ns
S2			
EDTA 17% vs. Quitosana 0,2%	-2,222	>0,9999	*ns
EDTA 17% vs. HEBP 9%	14,89	0,0076	*s
EDTA 17% vs. NaCl	17,56	0,0009	*s
Quitosana 0,2% vs. HEPB 9%	17,11	0,0013	*s
Quitosana 0,2% vs. NaCl	19,78	0,0001	*s
HEBP 9% vs. NaCl	2,667	>0,9999	*ns
S3			
EDTA 17% vs. Quitosana 0,2%	-2,222	>0,9999	*ns
EDTA 17% vs. HEBP 9%	13,56	0,0158	*s
EDTA 17% vs. NaCl	17,11	0,0009	*s
Quitosana 0,2% vs. HEPB 9%	15,78	0,0028	*s
Quitosana 0,2% vs. NaCl	19,33	0,0001	*s
HEBP 9% vs. NaCl	3,556	>0,9999	*ns

Legenda: *ns – não significante; *s - significante ao nível de 5%.

Fonte: A autora, 2023.

Discussão

No presente estudo, não foi detectada a liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF, pelo método Imunoenzimático (ELISA), após condicionamento dentinário com agentes quelantes: EDTA 17%, Quitosana 0,2%, HEBP 9%.

O grupo controle, o qual continha salina como solução, apresentou um resultado inferior a todos os materiais experimentais.

Ferreira, Puppini-Rontani e Pascon (2020) apresentaram resultados similares aos do presente estudo e também não identificaram a presença do VEGF nas amostras testadas além de valores muito menores de TGF β 1, quando comparado a outros estudos semelhantes. Estes resultados foram atribuídos a: a) superfícies externas cobertas por verniz, diminuindo assim a área em contato com os agentes quelantes (somente a parte interna dos corpos de prova foi sensibilizada); b) os corpos de prova foram confeccionados a partir do terço cervical das

raízes dos elementos dentários, em que a polpa dental foi removida. Tal fato é relevante, pois o VEGF está mais presente na região apical e tecido pulpar (está associado à angiogênese).

De forma divergente, o estudo de Chae, Yang e Kim (2018) investigaram, com metodologia semelhante ao nosso por meio do teste ELISA, a liberação de TGF- β 1 no interior do SCR após utilização dos quelantes EDTA 17%, ácido cítrico 10%, ácido fosfórico 10% e 37% e solução salina. Em todos os grupos houve liberação do fator de crescimento pesquisado. Zeng *et al.* (2016) investigaram a liberação de vários fatores de crescimento no interior do SCR, em um corpo de prova também semelhante à prática clínica e protocolo de irrigação também recomendado pela AAE. Do total de 41 fatores de crescimento pesquisados, por meio do teste ELISA, 11 foram detectados. O TGF- β 1 foi detectado em todos os grupos testados. Galler *et al.* (2015) avaliaram a influência das soluções irrigadoras, utilizadas no tratamento endodôntico, na liberação dos fatores de crescimento presentes na dentina, por meio do teste ELISA. Para tal, discos de dentina ficaram submersos nas soluções testadas (EDTA e ácido cítrico em diferentes concentrações) durante 5, 10 e 20 minutos. Os resultados demonstraram que o condicionamento da dentina com EDTA 10%, pH 7, durante 20 minutos foi responsável por uma maior liberação do TGF- β 1 e VEGF. Este último em menor quantidade quando comparado ao TGF- β 1. Os autores afirmaram ainda que a quantidade dos fatores de crescimento liberados no meio está diretamente relacionada ao tempo de exposição as soluções irrigadoras). Deniz Sungur *et al.* (2019) quantificaram, por meio do teste ELISA, a liberação de TGF- β 1 também utilizando discos de dentina após imersão dos mesmos em 1ml/5min de 17% EDTA, 1% IP6, 9% HEDP e água destilada. Os autores concluíram que IP6 e HEDP foram tão eficazes na liberação do fator de crescimento quanto o EDTA.

Algumas diferenças metodológicas podem justificar os resultados conflitantes, como por exemplo, o Kit ELISA utilizado ter um valor mínimo de detecção padrão de 15,6pg/mL. Ou ainda, devido ao pouco tempo em que a solução quelante esteve em contato com as paredes do SCR. Como já descrito, nosso experimento foi desenvolvido a fim de simular a prática clínica. Sendo assim, nossos corpos de prova não ficaram submersos nas soluções quelantes testadas. A sensibilização do interior do SCR foi realizada com irrigação e aspiração simultânea, como fazemos na rotina diária, o que pode ter contribuído para uma mínima liberação dos fatores de crescimento e por isto não foi detectada pelo teste utilizado. Além disto, a parte externa dos corpos de prova foi coberta por esmalte de unha, diminuindo a área que esteve em contato com as soluções.

Quanto à avaliação por meio de análise por MEV nossos resultados demonstraram que mesmo sem diferença significativa o EDTA 17% e a Quitosana 0,2% foram agentes quelantes que mais removeram a camada de *smear layer* e promoveram maior erosão dos túbulos dentinários, em todas as regiões analisadas, dos corpos de prova confeccionados.

Resultados semelhantes foram relatados pelos estudos pioneiros de Silva *et al.* (2012) que analisaram o efeito da solução de quitosana na dentina. Mesmo em baixa concentração (0,2%), a quitosana em contato com as paredes do SCR por somente 3 minutos foi capaz de remover a camada de *smear layer* causando pouco efeito erosivo na dentina. Em outro estudo, Silva *et al.* (2013) compararam, com auxílio de MEV, a capacidade de remoção da camada de *smear layer* dos agentes quelantes: EDTA 15%, quitosana 0,2%, ácido cítrico 10% e ácido acético 1%. Os resultados demonstraram que todas as substâncias testadas foram capazes de remover a camada da *smear layer* sem diferença significativa. Ratih, Enggardipta e Kartikaningtyas (2020) também concluíram que 5 ml da solução de nanopartículas de quitosana a 0,2%, durante 3 minutos em contato com as paredes do SCR removeu a camada de *smear layer* de forma semelhante ao EDTA 17%. Em relação ao HEBP, os estudos sugerem sua utilização em conjunto NaOCl na instrumentação do SCR, por se tratar de um quelante fraco e não interferir nas propriedades do mesmo (DE-DEUS *et al.*, 2008; PAQUÉ; RECHENBERG; ZEHNDER, 2012).

Porém, estes resultados estão em desacordo, por exemplo, com estudos de Pimenta *et al.* (2012) que não relataram alteração nos túbulos dentinários quando utilizada 50µL de quitosana 0,2% por 5 minutos na superfície dos corpos de prova.

A diferença nos resultados pode ser explicada pelo tempo de aplicação e volume das soluções utilizadas, já que tais fatores podem influenciar negativamente a atividade de um agente quelante (SCELZA *et al.*, 2004; SERPER; SEMRA, 2002; TARTARI *et al.*, 2013). Nosso experimento utilizou 20 ml de todas as soluções quelantes testadas, durante 5 minutos, pois este é o protocolo preconizado pela AAE, para os casos de RET (AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS, 2015a).

Em relação às regiões analisadas (S1, S2, S3) não houve diferença significativa entre os grupos testados, ou seja, a remoção da camada da *smear layer* e erosão dos túbulos dentinários ocorreram de forma semelhante nos três terços analisados. A semelhança nos resultados pode ser explicada devido diâmetro interno padronizado em 1mm em toda extensão dos corpos de prova para que estes se assemelhassem a prática clínica (dentes permanentes, imaturos, com ápice aberto). Além disto, a porção mais apical dos elementos dentários foi

removida. Assim, durante o ato da irrigação a solução quelante percorreu todo o SCR de forma igual. Desta forma, no mesmo período de tempo, o volume do agente quelante foi o mesmo em todas as três regiões analisadas.

O uso do MEV é um método de pesquisa bastante utilizado na Endodontia por permitir um exame morfológico detalhado da superfície dentinária preparada, como por exemplo: a capacidade dos agentes quelantes em remover a camada de *smear layer*, a abertura dos canais dentinários a presença ou ausência de erosão peritubular e intratubular do SCR (SARKEES; AL-MAARRAWI, 2020; SCELZA *et al.*, 2004; TORABINEJAD *et al.*, 2003). Porém, levando-se em consideração as limitações atribuídas a este tipo de análise, já relatadas na literatura como avaliação somente de uma pequena área analisada, falta de padronização nas ampliações das imagens e, a não calibragem dos avaliadores (DE-DEUS; REIS; PACIORNIK, 2011; PALARETI *et al.*, 2016), algumas precauções foram tomadas a fim de minimizar tais interferências, tais como: as imagens foram realizadas em toda a extensão dos corpos de prova em áreas pré-determinadas e denominadas S1, S2 e S3; as análises foram realizadas com ampliação de 500x permitindo assim visualização de uma maior área a ser analisada, reduzindo a tendência dos examinadores na escolha da região; foi realizada a calibragem dos avaliadores pelo índice KAPPA.

Sendo assim, se as soluções apresentaram um efeito quelante semelhante e propriedades biológicas satisfatórias consequentemente a solução menos concentrada e mais abundante na natureza deveria ser a escolhida, até mesmo devido a questões ambientais e econômicas. A quitina, precursor da quitosana, é a substância mais abundante na natureza depois da celulose e o custo de produção é consideravelmente baixo (KRAMBLE *et al.*, 2017; SARKEES; AL-MAARRAWI, 2020) tornando a sua utilização ecologicamente atraente.

A metodologia *ex vivo* utilizada no presente estudo permitiu uma análise superficial da dentina, sendo necessário estudos em maiores profundidades, bem como estudos biológicos adicionais.

Conclusão

Baseado na metodologia empregada e diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- a) o protocolo de irrigação utilizado não foi eficiente na liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF em quantidade suficiente para ser detectado pelo Kit ELISA utilizado;
- b) a Quitosana 0,2% pode ser um substituto natural ao EDTA 17%.

Conflito de interesse

Os autores declararam explicitamente que não há conflitos de interesse relacionados com este artigo.

Referências

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. **Clinical Considerations for a Regenerative Procedure**. Chicago, p. 1–6, 2015a.

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. Glossary of Endodontic Terms 2016. Chicago, v. 9, p. 43, 2015b.

ARIAS-MOLIZ, M. T. *et al.* Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite / etidronic acid irrigant solution. n. 13, p. 9–12, 2014.

ATESCI, A. A. *et al.* Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 46, n. 2, p. 200–208, 2020.

AYOUB, S. *et al.* The Effects of Intracanal Irrigants and Medicaments on Dental-Derived Stem Cells Fate in Regenerative Endodontics: An update. **Stem Cell Reviews and Reports**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 650-660, 2020.

BALLAL, N. V. *et al.* Safety assessment of an etidronate in a sodium hypochlorite solution: randomized double-blind trial. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 52, n. 9, p. 1274–1282, 2019.

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

CHALA, S.; ABOUQAL, R.; RIDA, S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: Systematic review and meta-analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 112, n. 4, p. e36–e42, 2011.

DE-DEUS, G. *et al.* Longitudinal Co-site Optical Microscopy Study on the Chelating Ability of Etidronate and EDTA Using a Comparative Single-tooth Model. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 34, n. 1, p. 71–75, 2008.

DE-DEUS, G.; REIS, C.; PACIORNIK, S. Critical appraisal of published smear layer-removal studies: Methodological issues. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 112, n. 4, p. 531–543, 2011.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. *et al.* Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. **Restorative Dentistry & Endodontics**, Seoul, v. 40, n. 3, p. 195, 2015.

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

DUCRET, M. *et al.* Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. **Dental Materials**, Washington, v. 35, n. 4, p. 523–533, 2019.

DUNCAN, H. F.; KOBAYASHI, Y.; SHIMIZU, E. Growth Factors and Cell Homing in Dental Tissue Regeneration. **Current Oral Health Reports**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 276–285, 2018.

FERRACANE, J. L.; COOPER, R.; SMITH, A. J. Dentin Matrix Component Solubilization by Solutions at pH Relevant to Self-etching Dental Adhesives. **Journal of adhesive dentistry**, New Malden, v. 15, n. 5, p. 407–412, 2013.

FERREIRA, L. N.; PUPPIN-RONTANI, R. M.; PASCON, F. M. Effect of Intracanal Medicaments and Irrigants on the Release of Transforming Growth Factor Beta 1 and Vascular Endothelial Growth Factor from Cervical Root Dentin. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 46, n. 11, p. 1616–1622, 2020.

GALLER, K. M. *et al.* Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 37, n. 11, p. 1536–1541, 2011.

GALLER, K. M. *et al.* Influence of Root Canal Disinfectants on Growth Factor Release from Dentin. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 41, n. 3, p. 363–368, 2015, 2015.

GANDOLFI, M. G. *et al.* Demineralization, collagen modification and remineralization degree of human dentin after EDTA and citric acid treatments. **Materials**, Basel, v. 12, n. 1, p. 25, 2019.

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

HARGREAVES, K. M.; DIOGENES, A.; TEIXEIRA, F. B. Treatment options: Biological basis of regenerative endodontic procedures. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 39, n. 3 Suppl., p. S30–S43, 2013.

- HÜLSMANN, M.; HECKENDORFF, M.; LENNON, Á. Chelating agents in root canal treatment: Mode of action and indications for their use. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 810–830, 2003.
- JAISWAL, N. *et al.* Evaluation of antibacterial efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilm: An in vitro study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. e1066–e1074, 2017.
- JO, A.; B, F.; EC, M. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. **Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 18, n. 11, p. 134–137, 2002.
- JUNG, C. *et al.* Pulp-dentin regeneration: current approaches and challenges. *Journal of Tissue Engineering*, [s.l.], v. 10, 2019. doi: 10.1177/2041731418819263.
- KIM, I. Y. *et al.* Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, v. 26, n. 1, p. 1–21, 2008.
- KIM, S. G. *et al.* Regenerative endodontics: a comprehensive review. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 51, n. 12, p. 1367–1388, 2018.
- KRAMBLE, A. B. *et al.* No Title Scanning electron microscopic evaluation of efficacy of 17% Ethylenediaminetetraacetic acid and chitosan for smear layer removal with ultrasonics: An In vitro study. **Contemporary clinical dentistry**, [s.l.], v. 8, p. 621–626, 2017.
- LOVELACE, T. W. *et al.* Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 37, n. 2, p. 133–138, 2011.
- LOYOLA-RODRÍGUEZ, J. P. *et al.* Antimicrobial activity of endodontic sealers and medications containing chitosan and silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials**, [s.l.], v. 17, n. 3, 2019. doi: 10.1177/2280800019851771.
- MAZZONI, A. *et al.* A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. **Endodontic Topics**, Oxford, n. 1, p. 19–40, 2012.
- MOORE, S. N.; TANNER, S. B.; SCHOENECKER, J. G. Bisphosphonates: from softening water to treating PXE. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 14, n. 9, p. 1354–1355, 2015.
- NICOLOSO, G. F. *et al.* Pulp revascularization or apexification for the treatment of immature necrotic permanent teeth: Systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 43, n. 5, p. 305–313, 2019.
- PAQUÉ, F.; RECHENBERG, D.; ZEHNDER, M. Reduction of Hard-tissue Debris Accumulation during Rotary Root Canal Instrumentation by Etidronic Acid in a Sodium Hypochlorite Irrigant. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 38, n. 5, p. 692–695, 2012.

PALARETI, G. *et al.* Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. **International Journal Laboratory Hematology**, Oxford, v. 38, ed. 1, p. 42-49, 2016.

PIMENTA, J. A. *et al.* Chitosan: Effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 212–217, 2012.

POVOROZNYUK, V. V. *et al.* Etidronic acid and its calcium- comprising complexes in the treatment of experimental osteoporosis in estrogen- deficient rats. **Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen**, [s.l.], n. 25, p. 7–12, 2018.

RATIH, D. N.; ENGGARDIPTA, R. A.; KARTIKANINGTYAS, A. T. The Effect of Chitosan Nanoparticle as A Final Irrigation Solution on The Smear Layer Removal, Microhardness and Surface Roughness of Root Canal Dentin. **The Open Dentistry Journal**, Hilsersum, v. 14, n. 1, p. 19–26, 2020.

SARKEES, M.; AL-MAARRAWI, K. Chitosan: A Natural Substitute of EDTA Solution for Final Irrigation in Endodontics Treatment. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, Mumbai, v. 23, n. 5, p. 697–703, 2020.

SCELZA, M. F. Z. *et al.* Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 98, n. 4, p. 499–503, 2004.

SCHMALZ, G.; WIDBILLER, M.; GALLER, K. M. Signaling Molecules and Pulp Regeneration. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 43, n. 9, p. S7–S11, 2017.

SERPER, A.; SEMRA, C. The Demineralizing Effects of EDTA at Different. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 28, n. 7, p. 501–502, 2002.

SHAIK, J. A.; REDDY, R. K. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. **Contemporary clinical dentistry**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 11–19, 2017.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 42, n. 10, p. 1417–1426, 2016.

SILVA, P. V. *et al.* Chitosan: A new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 332–338, 2013.

SILVA, P. V. *et al.* Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 357–361, 2012.

SONGTRAKUL, K. *et al.* Modified Apexification Procedure for Immature Permanent Teeth with a Necrotic Pulp/Apical Periodontitis: A Case Series. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 116–123, 2020.

TARTARI, T. *et al.* Etidronate from medicine to endodontics: Effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 21, n. 5, p. 409–415, 2013.

TORABINEJAD, M. *et al.* A New Solution for the Removal of the Smear Layer. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 29, n. 3, p. 170-175, 2003.

TROPE, M. Treatment of the Immature Tooth with a Non-Vital Pulp and Apical Periodontitis. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 54, n. 2, p. 313–324, 2010.

ULUSOY; MANTI, A.; ÇELİK, B. Nanohardness reduction and root dentine erosion after final irrigation with ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acids. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 53, n. 11, p. 1549–1558, 2020.

WIDBILLER, M. *et al.* Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 879–888, 2017.

ZEHNDER, M. *et al.* Chelation in root canal therapy reconsidered. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 31, n. 11, p. 817–820, 2005.

ZENG, Q. *et al.* Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 42, n. 12, p. 1760–1766, 2016.

ZHANG, R. *et al.* Angiogenic Activity of Dentin Matrix Components. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 26–30, 2011.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Baseado na metodologia empregada e diante dos resultados obtidos neste estudo, pode-se concluir que:

- a) o protocolo de irrigação utilizado não foi eficiente na liberação dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF em quantidade suficiente para ser detectado pelo Kit ELISA utilizado;
- b) a Quitosana 0,2% pode ser um substituto natural ao EDTA 17% em relação a remoção a camada da *smear layer*.

REFERÊNCIAS

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. **Clinical Considerations for a Regenerative Procedure**. Chicago, p. 1–6, 2015a.

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTISTS. Glossary of Endodontic Terms 2016. Chicago, v. 9, p. 43, 2015b.

ARIAS-MOLIZ, M. T. *et al.* Antimicrobial activity of a sodium hypochlorite / etidronic acid irrigant solution. n. 13, p. 9–12, 2014.

ATESCI, A. A. *et al.* Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 46, n. 2, p. 200–208, 2020.

AYOUB, S. *et al.* The Effects of Intracanal Irrigants and Medicaments on Dental-Derived Stem Cells Fate in Regenerative Endodontics: An update. **Stem Cell Reviews and Reports**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 650-660, 2020.

BALLAL, N. V. *et al.* Safety assessment of an etidronate in a sodium hypochlorite solution: randomized double-blind trial. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 52, n. 9, p. 1274–1282, 2019.

BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 30, n. 4, p. 196–200, 2004.

BARRERAS, U. S. *et al.* Chitosan nanoparticles enhance the antibacterial activity of chlorhexidine in collagen membranes used for periapical guided tissue regeneration. **Materials Science and Engineering C**, Lausanne, v. 58, p. 1182–1187, 2016.

BELLAMY, C. *et al.* Effects of a Bioactive Scaffold Containing a Sustained Transforming Growth Factor- β 1-releasing Nanoparticle System on the Migration and Differentiation of Stem Cells from the Apical Papilla. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 42, n. 9, p. 1385–1392, 2016.

BOYNUEĞRI, D. *et al.* Clinical and radiographic evaluations of chitosan gel in periodontal intraosseous defects: A pilot study. **Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials**, Hoboken, v. 90 B, n. 1, p. 461–466, 2009.

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

CHALA, S.; ABOUQAL, R.; RIDA, S. Apexification of immature teeth with calcium hydroxide or mineral trioxide aggregate: Systematic review and meta-analysis. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 112, n. 4, p. e36–e42, 2011.

DE-DEUS, G. *et al.* Longitudinal Co-site Optical Microscopy Study on the Chelating Ability of Etidronate and EDTA Using a Comparative Single-tooth Model. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 34, n. 1, p. 71–75, 2008.

DE-DEUS, G.; REIS, C.; PACIORNIK, S. Critical appraisal of published smear layer-removal studies: Methodological issues. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 112, n. 4, p. 531–543, 2011.

DEL CARPIO-PEROCHENA, A. *et al.* Chelating and antibacterial properties of chitosan nanoparticles on dentin. **Restorative Dentistry & Endodontics**, Seoul, v. 40, n. 3, p. 195, 2015.

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

DODANE, V.; VILIVALAM, V. D. Pharmaceutical applications of chitosan. **Pharmaceutical Science and Technology Today**, Oxford, v. 1, n. 6, p. 246–253, 1998.

DUCRET, M. *et al.* Design and characterization of a chitosan-enriched fibrin hydrogel for human dental pulp regeneration. **Dental Materials**, Washington, v. 35, n. 4, p. 523–533, 2019.

DUNCAN, H. F.; KOBAYASHI, Y.; SHIMIZU, E. Growth Factors and Cell Homing in Dental Tissue Regeneration. **Current Oral Health Reports**, [s.l.], v. 5, n. 4, p. 276–285, 2018.

ERAMO, S. *et al.* Dental pulp regeneration via cell homing. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 51, n. 4, p. 405–419, 2018.

FERRACANE, J. L.; COOPER, R.; SMITH, A. J. Dentin Matrix Component Solubilization by Solutions at pH Relevant to Self-etching Dental Adhesives. **Journal of adhesive dentistry**, New Malden, v. 15, n. 5, p. 407–412, 2013.

FERREIRA, L. N.; PUPPIN-RONTANI, R. M.; PASCON, F. M. Effect of Intracanal Medicaments and Irrigants on the Release of Transforming Growth Factor Beta 1 and Vascular Endothelial Growth Factor from Cervical Root Dentin. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 46, n. 11, p. 1616–1622, 2020.

FINKELMAN, R. D. *et al.* Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. **Journal of bone and mineral research**, New York, v. 5, n. 7, p. 717-723, 1990.

GALLER, K. M. *et al.* Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 37, n. 11, p. 1536–1541, 2011.

GALLER, K. M. *et al.* Influence of Root Canal Disinfectants on Growth Factor Release from Dentin. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 41, n. 3, p. 363-368, 2015, 2015.

GANDOLFI, M. G. *et al.* Demineralization, collagen modification and remineralization degree of human dentin after EDTA and citric acid treatments. **Materials**, Basel, v. 12, n. 1, p. 25, 2019.

GOLDBERG, M.; SMITH, A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp: a biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in oral Biology and Medicine*, Boca Raton, v. 15, n. 1, p. 13-27, 2004.

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

GRAZUL-BILSKA, A. T. *et al.* Wound healing: The role of growth factors. **Drugs of Today**, Barcelona, v. 39, n. 10, p. 787–800, 2003.

HARGREAVES, K. M.; DIOGENES, A.; TEIXEIRA, F. B. Treatment options: Biological basis of regenerative endodontic procedures. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 39, n. 3 Suppl., p. S30–S43, 2013.

HÜLSMANN, M.; HECKENDORFF, M.; LENNON, Á. Chelating agents in root canal treatment: Mode of action and indications for their use. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 36, n. 12, p. 810–830, 2003.

IWAYA, S.; IKAWA, M.; KUBOTA, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. **Dental traumatology**, Copenhagen, v. 17, n. 4, p. 185–187, 2001.

JAISWAL, N. *et al.* Evaluation of antibacterial efficacy of Chitosan, Chlorhexidine, Propolis and Sodium hypochlorite on *Enterococcus faecalis* biofilm: An in vitro study. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, [s.l.], v. 9, n. 9, p. e1066–e1074, 2017.

JO, A.; B, F.; EC, M. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. **Dental Traumatology**, Copenhagen, v. 18, n. 11, p. 134–137, 2002.

JUN, H. *et al.* Effects of concentrated growth factors on the angiogenic properties of dental pulp cells and endothelial cells: an in vitro study. **Brazilian Oral Research**, São Paulo, v. 32, p. 1–9, 2018.

JUNG, C. *et al.* Pulp-dentin regeneration: current approaches and challenges. *Journal of Tissue Engineering*, [s.l.], v. 10, 2019. doi: 10.1177/2041731418819263.

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

KRAMBLE, A. B. *et al.* No Title Scanning electron microscopic evaluation of efficacy of 17% Ethylenediaminetetraacetic acid and chitosan for smear layer removal with ultrasonics: An In vitro study. **Contemporary clinical dentistry**, [s.l.], v. 8, p. 621–626, 2017.

LAW, A. S. Considerations for regeneration procedures. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 39, n. 3 Suppl., p. S44–S56, 2013.

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

LOYOLA-RODRÍGUEZ, J. P. *et al.* Antimicrobial activity of endodontic sealers and medications containing chitosan and silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials**, [s.l.], v. 17, n. 3, 2019. doi: 10.1177/2280800019851771.

MATSUSHITA, K. *et al.* The role of vascular endothelial growth factor in human dental pulp cells: induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *Journal of Dental Research*, v. 79, n. 8, p. 1596-1603, 2000.

MATTUELLA, L. G.; BENTO, L. W. Vascular Endothelial Growth Factor and Its Relationship with the Dental Pulp. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 33, n. 5, p. 524-530, 2007.

MAZZONI, A. *et al.* A review of the nature, role, and function of dentin non-collagenous proteins. Part II: enzymes, serum proteins, and growth factors. **Endodontic Topics**, Oxford, n. 1, p. 19–40, 2012.

MOORE, S. N.; TANNER, S. B.; SCHOENECKER, J. G. Bisphosphonates: from softening water to treating PXE. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 14, n. 9, p. 1354–1355, 2015.

MORIN-CRINI, N. *et al.* Applications of chitosan in food, pharmaceuticals, medicine, cosmetics, agriculture, textiles, pulp and paper, biotechnology, and environmental chemistry. **Environmental Chemistry Letters**, [s.l.], v. 17, n. 4, p. 1667–1692, 2019.

MUXIKA, A. *et al.* Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Guildford, v. 105, p. 1358–1368, 2017.

NICOLOSO, G. F. *et al.* Pulp revascularization or apexification for the treatment of immature necrotic permanent teeth: Systematic review and meta- analysis. **Journal of Clinical Pediatric Dentistry**, Birmingham, v. 43, n. 5, p. 305–313, 2019.

NYGAARD-ÖSTBY, B.; HJORTDAL, O. Tissue formation in the root canal following pulp removal. **European Journal of Oral Sciences**, [s.l.], v. 79, n. 3, p. 333–349, 1971.

ÖSTBY, B. N. The role of the blood clot in endodontic therapy an experimental histologic study. **Acta Odontologica Scandinavica**, Oslo, v. 19, n. 3–4, p. 323–353, 1961.

PALARETI, G. *et al.* Comparison between different D-Dimer cutoff values to assess the individual risk of recurrent venous thromboembolism: Analysis of results obtained in the DULCIS study. **International Journal Laboratory Hematology**, Oxford, v. 38, ed. 1, p. 42-49, 2016.

PAQUÉ, F.; RECHENBERG, D.; ZEHNDER, M. Reduction of Hard-tissue Debris Accumulation during Rotary Root Canal Instrumentation by Etidronic Acid in a Sodium Hypochlorite Irrigant. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 38, n. 5, p. 692–695, 2012.

PIMENTA, J. A. *et al.* Chitosan: Effect of a new chelating agent on the microhardness of root dentin. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 3, p. 212–217, 2012.

POVOROZNYUK, V. V. *et al.* Etidronic acid and its calcium- comprising complexes in the treatment of experimental osteoporosis in estrogen- deficient rats. **Journal für Mineralstoffwechsel & Muskuloskelettale Erkrankungen**, [s.l.], n. 25, p. 7–12, 2018.

RATIH, D. N.; ENGGARDIPTA, R. A.; KARTIKANINGTYAS, A. T. The Effect of Chitosan Nanoparticle as A Final Irrigation Solution on The Smear Layer Removal, Microhardness and Surface Roughness of Root Canal Dentin. **The Open Dentistry Journal**, Hiltersum, v. 14, n. 1, p. 19–26, 2020.

SARKEES, M.; AL-MAARRAWI, K. Chitosan: A Natural Substitute of EDTA Solution for Final Irrigation in Endodontics Treatment. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, Mumbai, v. 23, n. 5, p. 697–703, 2020.

SCELZA, M. F. Z. *et al.* Effect of three different time periods of irrigation with EDTA-T, EDTA, and citric acid on smear layer removal. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology**, St. Louis, v. 98, n. 4, p. 499–503, 2004.

SCHMALZ, G.; WIDBILLER, M.; GALLER, K. M. Signaling Molecules and Pulp Regeneration. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 43, n. 9, p. S7–S11, 2017.

SERPER, A.; SEMRA, C. The Demineralizing Effects of EDTA at Different. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 28, n. 7, p. 501–502, 2002.

SHAIK, J. A.; REDDY, R. K. Prevention and Treatment of White Spot Lesions in Orthodontic Patients. **Contemporary clinical dentistry**, [s.l.], v. 8, n. 1, p. 11–19, 2017.

SHRESTHA, A.; KISHEN, A. Antibacterial Nanoparticles in Endodontics: A Review. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 42, n. 10, p. 1417–1426, 2016.

SILVA, P. V. *et al.* Chitosan: A new solution for removal of smear layer after root canal instrumentation. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 46, n. 4, p. 332–338, 2013.

SILVA, P. V. *et al.* Time-dependent effects of chitosan on dentin structures. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 23, n. 4, p. 357–361, 2012.

SMITH, A. J. *et al.* Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 42, n. 1, p. 47–56, 2016.

SONGTRAKUL, K. *et al.* Modified Apexification Procedure for Immature Permanent Teeth with a Necrotic Pulp/Apical Periodontitis: A Case Series. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 46, n. 1, p. 116–123, 2020.

TARTARI, T. *et al.* Etidronate from medicine to endodontics: Effects of different irrigation regimes on root dentin roughness. **Journal of Applied Oral Science**, Bauru, v. 21, n. 5, p. 409–415, 2013.

TAVARIA, F. K. *et al.* A quitosana como biomaterial odontológico: Estado da arte. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 110–120, 2013.

TORABINEJAD, M. *et al.* A New Solution for the Removal of the Smear Layer. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 29, n. 3, p. 170-175, 2003.

TORABINEJAD, M.; ABU-TAHUN, I. Management of teeth with necrotic pulps and open apices. **Endodontic Topics**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 105–130, 2010.

TROPE, M. Treatment of the Immature Tooth with a Non-Vital Pulp and Apical Periodontitis. **Dental Clinics of North America**, Philadelphia, v. 54, n. 2, p. 313–324, 2010.

ULUSOY; MANTI, A.; ÇELIK, B. Nanohardness reduction and root dentine erosion after final irrigation with ethylenediaminetetraacetic, etidronic and peracetic acids. **International Endodontic Journal**, Oxford, v. 53, n. 11, p. 1549–1558, 2020.

VERKAIK, M. J. *et al.* Efficacy of natural antimicrobials in toothpaste formulations against oral biofilms in vitro. **Journal of Dentistry**, Guildford, v. 39, n. 3, p. 218–224, 2011.

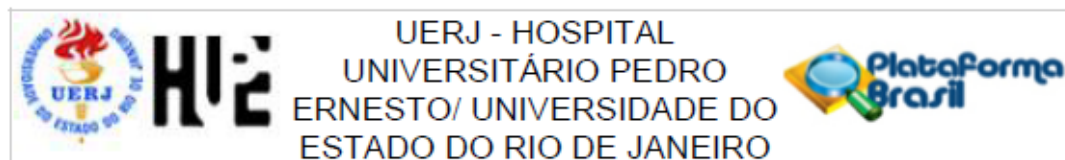
WIDBILLER, M. *et al.* Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. **Clinical Oral Investigations**, Berlin, v. 21, n. 3, p. 879–888, 2017.

ZEHNDER, M. *et al.* Chelation in root canal therapy reconsidered. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 31, n. 11, p. 817–820, 2005.

ZENG, Q. *et al.* Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 42, n. 12, p. 1760–1766, 2016.

ZHANG, R. *et al.* Angiogenic Activity of Dentin Matrix Components. **Journal of Endodontics**, Baltimore, v. 37, n. 1, p. 26–30, 2011.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Liberação do fator de crescimento TGF β 1 e VEGF pelos quelantes EDTA, quitosana e ácido etidrônico: análise in vitro

Pesquisador: MILENA DO VALLE TOMAZ

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42329720.2.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da UERJ

Patrocinador Principal: Capes Coordenação Aperf Pessoal Nível Superior

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.626.836

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo registrado do protocolo "Nome do Arquivo: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO__1650468" e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. O objetivo do trabalho é investigar, in vitro, a liberação dos fatores de crescimento TGF 1 e VEGF utilizando diferentes agentes quelantes: EDTA, quitosana e ácido etidrônico (HEBP). Serão selecionados dezesseis dentes unirradulares recém extraídos para confecção dos corpos de prova. As coroas serão removidas, os remanescentes radiculares serão padronizados em dimensões de 8mm de comprimento e 1mm de diâmetro interno e as superfícies radiculares externas serão seladas com verniz de unhas na cor preta. Em seguida, serão distribuídos aleatoriamente em cinco grupos com diferentes protocolos de irrigação (n=4): (A) 1.5% NaOCl (20 mL/5 min) e 17% EDTA (20 mL/5 min); (B) 1.5% NaOCl (20 mL/5 min) e 0.2% quitosana (20 mL/5 min); (C) 1.5% NaOCl (20 mL/5 min) e 9% HEBP (20 mL/5 min); (D) Solução salina (20 mL/5 min). Após irrigação final os mesmos serão secos com pontas de papel absorventes e armazenados em um microtubo eppendorf contendo 1 mL -MEM suplementado com 100 U/mL penicilina e incubados a 37C em atmosfera umidificada 95% durante 07 dias e 28 dias. Após

Endereço: Av. 28 de setembro, nº77 - CePeM - Centro de Pesquisa Clínica Multiusuário - 2º andar/sala nº 28 - prédio
Bairro: Vila Isabel **CEP:** 20.551-030
UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO
Telefone: (21)2868-8253 **E-mail:** cep@hupe.uerj.br

ANEXO B – Autorização dos coautores para inserção do artigo nesta tese

AUTORIZAÇÃO

Autorizo que o trabalho intitulado, **Liberção dos fatores de crescimento TGF β 1 e VEGF após condicionamento dentinário com agentes quelantes: análise *ex vivo***, no qual sou coautor, seja usado na tese de doutorado da aluna Milena do Valle Tomaz.

Bárbara de Paula Coelho Barbara de Paula Coelho

Justine Monteiro Monnerat Tinoco Justine M. Tinoco

Luciana Moura Sassone Luciana Moura Sassone

Marcos Vinícius Colaço Gonçalves Marcos Vinícius Colaço Gonçalves

Matheus Rogério Almeida Matheus Rogério Almeida

Thiago Ramos Correia Thiago Ramos Correia

Paulo Renato Zuquim Antas Paulo Renato Zuquim Antas