

EFEITO DA ASSOCIAÇÃO DO HIPOCLORITO DE SÓDIO A DIFERENTES AGENTES CONDICIONANTES NA LIBERAÇÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO TGF- β 1 DA DENTINA RADICULAR: UM ESTUDO IN VITRO

Palavras-Chave: Dentina, Regeneração, Endodontia, Fator beta 1 de crescimento

Larissa Schultze Possenti, FOP – UNICAMP

Ana Luisa Theodoro FOP - UNICAMP

Profa. Dra. Fernanda Miori Pascon

INTRODUÇÃO:

A necrose pulpar e a pulpite irreversível são condições clínicas frequentemente resultantes de lesões cariosas extensas ou traumas. O tratamento convencional nesses casos é a endodontia convencional (Iaculli et al., 2022). No entanto, dentes permanentes jovens com rizogênese incompleta representam um desafio, pois o ápice aberto dificulta a instrumentação (Galler et al., 2015), irrigação e obturação pelos métodos convencionais (Thibodeau e Trope, 2007). Nesse cenário, tem-se a necessidade de realizar tratamentos específicos, que priorizem o fechamento do ápice, para posteriormente realizar o tratamento endodôntico (Zeng et al., 2016; Schmalz et al., 2020).

Dentre esses tratamentos destaca-se a apicificação, que pode ser realizada com trocas sucessivas de hidróxido de cálcio ou com a confecção de um plug apical de agregado de trióxido mineral (MTA), reduzindo o número de sessões clínicas (Torabinejad et al., 2017). O tratamento visa o fechamento do ápice, mas não estimula o desenvolvimento radicular adicional, deixando as paredes dentinárias frágeis e suscetíveis a fraturas ao longo do tempo (Hargreaves et al., 2008; Mahajan, 2020).

Como alternativa a apicificação, os procedimentos endodônticos regenerativos têm ganhado destaque, por promoverem o espessamento das paredes radiculares e o desenvolvimento adicional da raiz. Esses procedimentos estimulam o influxo de células-tronco da papila apical (SCAPs), com o objetivo de restaurar a estrutura e a função do tecido pulpar original (Zeng et al., 2016; Xie et al., 2021; Sugiaman et al., 2022; Rosa et al., 2022). Para o sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos, é fundamental a presença de células indiferenciadas, fatores de crescimento e *scaffolds*, sendo o TGF- β 1 um dos principais fatores envolvidos na diferenciação celular e na formação de dentina (Niwa et al., 2018).

A desinfecção adequada do canal radicular é igualmente crucial, uma vez que citocinas pró-inflamatórias podem inibir as células-tronco. A Academia Americana de Endodontia (AAE) recomenda o uso de hipoclorito de sódio (NaOCl) 1,5% seguido de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) 17% como agente condicionante (American Association of Endodontists, 2021). Essa sequência combina a ação desinfetante do NaOCl com a capacidade do EDTA de reduzir a citotoxicidade e promover a liberação de fatores de crescimento (Martin et al., 2014; Kim et al., 2012). Outras soluções, como o ácido cítrico 10%, demonstraram menor citotoxicidade e boa capacidade de remoção da *smear layer* (Malheiros et al., 2005; Reis-Prado et al., 2023). Além disso a combinação de ácido cítrico com outras substâncias como cloreto férrico, a solução 10:3, (ácido cítrico 10% com cloreto férrico 3%) tem sido estudada por sua capacidade de promover maior desmineralização e preservar a matriz colágena dentinária (Rodrigues et al., 2017) o que pode favorecer a liberação de fatores de crescimento como o TGF- β 1 e por isso deve ser investigada.

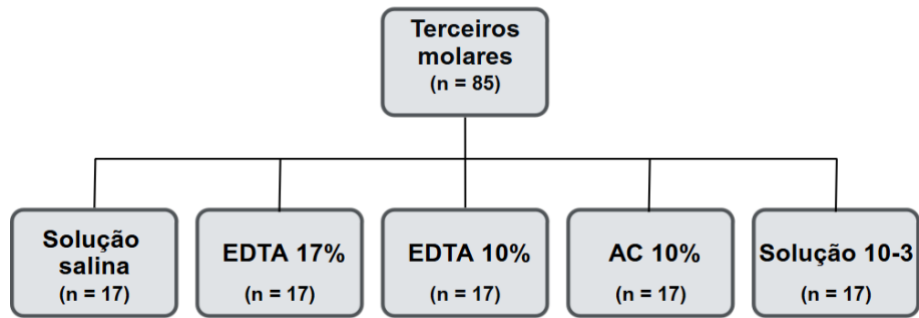
Portanto, o presente estudo tem como objetivo analisar o efeito da solução irrigadora NaOCl 1,5%, combinada a diferentes agentes condicionantes (EDTA 17%, EDTA 10%, ácido cítrico 10% e solução 10:3) na liberação do TGF- β 1 da dentina radicular.

METODOLOGIA:

Delineamento Experimental

Este estudo foi delineado e reportado de acordo com os itens das diretrizes *Preferred Reporting Items for Laboratory studies in Endodontology (PRILE)* (Nagendrababu et al., 2021). Foram selecionados 85 terceiros molares hígidos de pacientes jovens, com idade média entre 18 e 35 anos, sem reabsorções internas, calcificações, dilacerações ou alterações anatômicas e patológicas. Os dentes foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=17), de acordo com o agente condicionante: controle negativo (solução salina), EDTA 17%, EDTA 10%, ácido cítrico 10% e ácido cítrico 10% com 3% de cloreto férrico (solução 10:3) (Figura 1). O tamanho amostral foi previamente calculado com nível de significância de 0,05, tamanho de efeito de 0,35 e potência de 0,85, utilizando o programa G*Power v3.1 (Heinrich Heine, Universität Düsseldorf, Alemanha) (Hancerliogullari et al., 2021).

Figura 1. Esquema do delineamento experimental do estudo

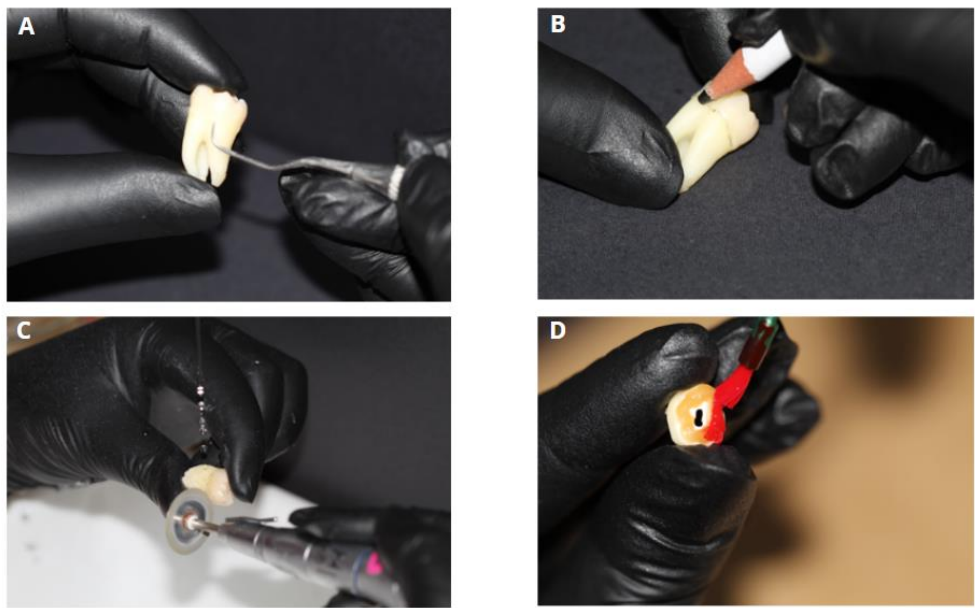


Fluxograma da divisão dos grupos de acordo com os grupos em estudo.

EDTA= ácido etilenodiaminotetracético; AC=Ácido cítrico.

Preparo da Amostra

Foi realizada a limpeza dos dentes com curetas periodontais para remoção dos tecidos ósseo e periodontal **(figura A)**, e os dentes foram armazenados em soro fisiológico a 0,9%, a 4°C. Em uma máquina de corte (Isomet 1000, Buehler, Lake Bluff, IL) com disco de diamante em baixa velocidade e sob refrigeração, os dentes foram seccionados perpendicularmente ao longo eixo (sentido mesiodistal) na junção cemento-esmalte **(figura B e C)**. As coroas foram descartadas e as raízes seccionadas na região de bifurcação. As extensões longitudinais dos espécimes radiculares foram medidas com paquímetro digital (Mitutoyo, Suzano, SP, Brasil). As raízes foram planificadas com lixas de carbeto de silício 600 e água para expor a polpa nas vistas oclusal e apical. A polpa restante foi removida com pinça endodôntica e os espécimes foram submetidos a banho ultrassônico (Ultrasonic Cleaner, Cristófoli Biosafety, Campo Mourão, PR, Brasil) com solução salina por 5 minutos, seguido de lavagem com água deionizada por 3 minutos para remoção da smear layer. As faces oclusal, apical e as paredes externas foram impermeabilizadas com verniz ácido-resistente (Risque, Brasil), **(figura D)** para garantir o contato das soluções apenas com as paredes pulpares do terço cervical (Ferreira et al., 2020; Theodoro, 2024).



A: limpeza dos dentes com curetas periodontais; B: delimitação cimento esmalte; C: Corte com disco diamantado; D: impermeabilização com verniz ácido-resistente.

Tratamento da Dentina Radicular

Os espécimes obtidos foram irrigados com NaOCl 2,5% por 5 minutos. Em seguida, os *slices* foram divididos nos cinco grupos experimentais, de acordo com os agentes condicionantes: solução salina, EDTA 10%, EDTA 17%, ácido cítrico 10% e ácido cítrico 10% com 3% de cloreto férrico (solução 10:3). Após a irrigação, os espécimes foram transferidos para placas de 48 poços e tratados com 220 µL da solução condicionante de cada grupo por 10 minutos. Todas as soluções utilizadas nos espécimes após a irrigação foram cuidadosamente coletadas, armazenadas e congeladas para posterior análise e quantificação do TGF-β1.

Quantificação da Liberação do Fator Transformador de Crescimento-β1 (TGF-β1)

As soluções condicionantes de cada grupo foram descongeladas e analisadas segundo as instruções do fabricante (DuoSet® Human TGF-β1, ELISA Kit, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Foi realizada uma curva padrão de calibração a partir de 1000 pg/mL do fator de crescimento, com seis diluições em série. Os complexos de anticorpo e Avidina-Biotina-peroxidase também foram preparados, ambos em diluição de 1/100. As amostras foram distribuídas em uma placa de 96 poços (100 µL por poço), com três tempos de incubação. As leituras das absorbâncias foram feitas em um leitor de microplacas (Espectrofotômetro de Microplacas de Alto Desempenho Eon™, com Software Gen5, BioTek, Winooski, VT, EUA), a 450 nm, até 30 minutos após a adição da Solução de Parada TMB para Substrato (tetrametilbenzidina), encerrando a reação e determinando a concentração de TGF-β1 (Ferreira et al., 2020; Theodoro, 2024).

Análise dos Resultados

Os dados serão submetidos aos testes de normalidade e homoscedasticidade. De acordo com os resultados dessas análises, serão aplicados testes estatísticos apropriados: testes paramétricos (ANOVA) ou não paramétricos (Mann-Whitney), considerando-se um nível de significância de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

A análise estatística está em andamento, e os resultados serão apresentados com o relatório final.

BIBLIOGRAFIA

AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure Revised November 2022. Disponível em: https://www.aae.org/specialty/wpcontent/uploads/sites/2/2023/04/ConsiderationsForRegEndo_AsOfNov2022-4

Dos Reis-Prado AH, Abreu LG, Fagundes RR, et al. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid on regenerative endodontics: A systematic review. Int Endod J. 2022;55(6):579-612.

Galler KM. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. Int Endod J. 2015 Oct;49(10):926-36.

- Hancerliogullari D, Erdemir A, Kisa U. The effect of different irrigation solutions and activation techniques on the expression of growth factors from dentine of extracted premolar teeth. *Int Endod J*. 2021;54(10):1915-1924.
- Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod*. 2008 Jul;34(7 Suppl):S51-6.
- Iaculli F, Rodríguez-Lozano FJ, Briseño-Marroquín B, Wolf TG, Spagnuolo G, Rengo S. Vital pulp therapy of permanent teeth with reversible or irreversible pulpitis: An overview of the literature. *J Clin Med*. 2022 Jul 11;11(14):4016.
- Kim SG, Zhou J, Solomon C, Zheng Y, Suzuki T, Chen M, Song S, Jiang N, Cho S, Mao JJ. Effects of growth factors on dental stem/progenitor cells. *Dent Clin North Am*. 2012 Jul;56(3):563-75.
- Li X, Ma W, Chen X, Zhao J, Nakata T, Tanaka K, Takahashi K, Nishitani Y, Yoshiyama M. Bonding to NaOCl-treated dentin: effect of pretreatment with sodium toluene sulfinic acid. *J Adhes Dent*. 2012 Apr;14(2):129-36.
- Mahajah T, Kochhar R, Kumari M. Apexification using MTA: A challenging approach. *IJSRP*. 2020.
- Marshall GW, Saeki K, Gansky SA, Marshall SJ. AFM study of citric acid-ferric chloride etching characteristics of dentin. *Am J Dent*. 1999 Dec;12(6):271-6.
- Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, Diogenes A. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod*. 2014 Jan;40(1):51-5.
- Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod*. 2005 Oct;31(10):746-8.
- Nagendrababu V, Murray PE, Ordinola-Zapata R, et al. PRILE 2021 guidelines for reporting laboratory studies in Endodontology: A consensus-based development. *Int Endod J*. 2021;54(9):1482-1490.
- Niwa T, Yamakoshi Y, Yamazaki H, Karakida T, Chiba R, Hu JC, Nagano T, Yamamoto R, Simmer JP, Margolis HC, Gomi K. The dynamics of TGF- β in dental pulp, odontoblasts and dentin. *Sci Rep*. 2018 Mar;8(1):4450.
- Rodrigues RV, Giannini M, Pascon FM, Panwar P, Brömme D, Manso AP, Carvalho RM. Effect of conditioning solutions containing ferric chloride on dentin bond strength and collagen degradation. *Dent Mater*. 2017 Oct;33(10):1093-102.
- Rosa V, Sriram G, McDonald N, Cavalcanti BN. A critical analysis of research methods and biological experimental models to study pulp regeneration. *Int Endod J*. 2022 Apr;55 Suppl 2(Suppl 2):446-455.
- Schmalz G, Widbiller M, Galler KM. Clinical perspectives of pulp regeneration. *J Endod*. 2020 Sep;46(9S):S161-S174.
- Sugiaman VK, Djuanda R, Pranata N, Naliani S, Demolsky WL, Jeffrey. Tissue engineering with stem cell from human exfoliated deciduous teeth (SHED) and collagen matrix, regulated by growth factor in regenerating the dental pulp. *Polymers (Basel)*. 2022 Sep 6;14(18):3712.
- Theodoro AL. (2024). Efetividade de agentes condicionantes e tempos de exposição na liberação do fator de crescimento TGF- β 1 da dentina radicular (Tese de mestrado). Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba, Brasil.
- Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent*. 2007 Jan-Feb;29(1):47-50.
- Torabinejad M, Nosrat A, Verma P, Udochukwu O. Regenerative endodontic treatment or mineral trioxide aggregate apical plug in teeth with necrotic pulps and open apices: A systematic review and meta-analysis. *J Endod*. 2017 Nov;43(11):1806-1820.
- Xie Z, Shen Z, Zhan P, Yang J, Huang Q, Huang S, Chen L, Lin Z. Functional dental pulp regeneration: Basic research and clinical translation. *Int J Mol Sci*. 2021 Aug 20;22(16):8991.
- Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu HP, Alzebdeh D, Badi MA, Kim JR, Ling J, Yang M. Release of growth factors into root canal by irrigations in regenerative endodontics. *J Endod*. 2016 Dec;42(12):1760-66.