



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

**GIOVANNA HIROMI KITAMURA**

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO COÁGULO SANGUÍNEO  
FORMADO PÓS-PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO  
EM DENTES IMATUROS SUBMETIDOS A DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO – UM ESTUDO EM EX-VIVO**

PIRACICABA  
2021

**GIOVANNA HIROMI KITAMURA**

**ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO COÁGULO SANGUÍNEO  
FORMADO PÓS-PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO  
EM DENTES IMATUROS SUBMETIDOS A DIFERENTES  
PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO – UM ESTUDO EM EX-VIVO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba da  
Universidade Estadual de Campinas como parte dos  
requisitos exigidos para obtenção do título de  
Cirurgião Dentista.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Adriana de Jesus Soares

Coorientador: Walbert de Andrade Vieira

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DO  
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO APRESENTADO  
PELA ALUNA GIOVANNA HIROMI KITAMURA E  
ORIENTADO PELA Prof.<sup>a</sup> DR.<sup>a</sup> ADRIANA DE JESUS  
SOARES.

PIRACICABA

2021

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

K546a Kitamura, Giovanna Hiromi, 1995-  
Análise ultraestrutural do coágulo sanguíneo formado pós-procedimento endodôntico regenerativo em dentes imaturos submetidos a diferentes protocolos de irrigação um estudo em ex-vivo / Giovanna Hiromi Kitamura. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2021.

Orientador: Adriana de Jesus Soares.

Coorientador: Walbert de Andrade Vieira.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Células sanguíneas. 2. Endodontia regenerativa. 3. Regeneração (Biologia). I. Soares, Adriana de Jesus, 1970-. II. Vieira, Walbert de Andrade, 1994-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações adicionais, complementares

**Palavras-chave em inglês:**

Blood cells

Regenerative endodontics

Regeneration (Biology)

**Titulação:** Cirurgião-Dentista

**Data de entrega do trabalho definitivo:** 17-05-2021

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais e irmãos que deram todo o suporte necessário para que eu alcançasse a formação profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 100679/2020-0.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana de Jesus Soares, expresso minha imensa gratidão pela orientação neste trabalho, dedicação e oportunidade de conhecimento.

Ao meu coorientador Walbert de Andrade Vieira, por toda a paciência, assistência e aprendizado que me proporcionou.

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP-UNICAMP), na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto e do diretor associado Prof. Dr. Flávio Henrique Baggio Aguiar.

À minha família, sou eternamente grata por sempre terem me apoiado e incentivado a estudar a profissão que escolhi.

Às minhas companheiras de república, que me transformaram como pessoa e me ajudaram a evoluir durante toda a jornada acadêmica.

## RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar in vitro as características do coágulo sanguíneo formado pós-procedimento endodôntico regenerativo em dentes imaturos submetidos a diferentes protocolos de irrigação. Quinze dentes bovinos unirradiculares foram preparados para simular ápices abertos e divididos aleatoriamente em três grupos de acordo com os seguintes protocolos: (1) Soro fisiológico (GC); (2) Hipoclorito de sódio 1,5% + SF + EDTA 17% (G1); (3) EDTA 17% + SF (G2). O sangue humano foi coletado de um voluntário saudável e colocado no interior do canal radicular. As raízes foram mantidas em uma câmara umidificadora durante 15 minutos até a formação do coágulo. As características e densidade da rede de fibrina dos coágulos, bem como características morfológicas dos eritrócitos e plaquetas foram observadas usando um microscópio eletrônico de varredura. As densidades de fibrina em todos os grupos de irrigação foram avaliadas usando o software ImageJ, e comparadas estatisticamente usando o teste de Kruskal-Wallis, com significância de 5%. As principais alterações morfológicas observadas foram eritrócitos bicôncavos, achatados, muitos com bordas irregulares, com formação de rouleaux e pouca presença de plaquetas ativas. A análise estatística revelou diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre a densidade de fibras presentes no G1, quando comparado aos grupos GC e G2. Em relação ao diâmetro das fibras, não foi observada diferença significativa entre os grupos ( $p < 0,05$ ). Pôde-se concluir através do presente estudo que todos os protocolos de irrigação ocasionam alterações na morfologia do coágulo sanguíneo, principalmente em relação ao número de fibras e morfologias das hemácias.

**Palavras-chave:** Células sanguíneas. Endodontia regenerativa. Regeneração.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate in vitro the characteristics of the blood clot formed after a regenerative endodontic procedure in immature teeth submitted to different types of irrigation. Fifteen single-rooted bovine teeth were prepared to simulate open apices randomly divided into three groups according to the following protocols: (1) Saline solution (SS); (2) Sodium hypochlorite 1.5% + SS + EDTA 17%; (3) 17% EDTA + SS. Human blood was collected from a healthy volunteer and placed inside the root canal. The roots were kept in a humidifier for 15 minutes until the formation of the clot. The characteristics and density of the clots' fibrin as well as the morphological characteristics of the erythrocytes and platelets were observed using a scanning electron microscope. Fibrin densities in all irrigation groups were analyzed using the ImageJ software (National Institutes of Health, Bethesda, MD). The statistical analysis was performed by using the Kruskal-Wallis test with a 5% significance. The main morphological changes were flat and biconcave erythrocytes, many with irregular edges, rouleaux formation and few presences of active platelets. The statistical analysis revealed a significant difference ( $p < 0.05$ ) between the density of fibers present in G1 and the groups GC and G2. Regarding the fiber diameter there was no difference between groups ( $p < 0.05$ ). It was possible to conclude that all the irrigation protocols cause changes in the blood clot morphology, mainly in relation to the number of fibers and red blood cell morphologies.

**Key words:** Blood cells. Regeneration. Regenerative endodontics.

## SUMÁRIO

|                                                                                      |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1 INTRODUÇÃO                                                                         | 9  |
| 2 REVISÃO DA LITERATURA                                                              | 11 |
| 2.1 Trauma dental como etiologia para necrose pulpar de dentes imaturos              | 11 |
| 2.2 Considerações sobre terapia endodôntica regenerativa                             | 12 |
| 2.3 Soluções irrigadoras utilizadas na terapia endodôntica regenerativa              | 14 |
| 3 PROPOSIÇÃO                                                                         | 17 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS                                                                 | 18 |
| 4.1 Submissão ao comitê de ética                                                     | 18 |
| 4.2 Seleção e preparo dos espécimes                                                  | 18 |
| 4.3 Grupos experimentais e protocolos de irrigação                                   | 19 |
| 4.4 Coleta do sangue                                                                 | 20 |
| 4.5 Formação do coágulo                                                              | 20 |
| 4.6 Preparação do espécime para análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) | 20 |
| 4.7 Análise de densidade da rede de fibrina e do diâmetro das fibras                 | 21 |
| 4.8 Análise morfológica das plaquetas, eritrócitos e da estrutura de membranas       | 23 |
| 4.9 Análise Estatística                                                              | 24 |
| 5 RESULTADOS                                                                         | 25 |
| 5.1 Análise descritiva da morfologia do coágulo                                      | 25 |
| 5.2 Análise estatística dos dados                                                    | 26 |
| 6 DISCUSSÃO                                                                          | 28 |
| 7 CONCLUSÃO                                                                          | 30 |
| REFERÊNCIAS                                                                          | 31 |
| APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO                              | 37 |
| ANEXOS                                                                               | 39 |
| Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio                         | 39 |
| Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa                                                | 40 |
| Anexo 3 – Iniciação Científica                                                       | 41 |



## 1 INTRODUÇÃO

A necrose de dentes permanentes imaturos é recorrente na prática clínica e pode ser ocasionada, principalmente, por cárie e injúrias traumáticas. O tratamento desses dentes representa um desafio para os profissionais, principalmente pela presença de paredes finas e dificuldade em garantir uma obturação de qualidade. Diversas modalidades de tratamento foram propostas para promover o fechamento do ápice, entre elas estão a apicificação por meio de trocas sucessivas de medicação intracanal ou a colocação de um plug apical com MTA (Chandler, 2009; Desai, 2009). Todavia, esses tratamentos apresentam sérias limitações, como manutenção da fragilidade radicular, a necessidade de múltiplas intervenções e desgaste desnecessário de estrutura dental (Cvek, 1992).

Em 2001, Iwayu et al. (2001) relataram o primeiro caso de revascularização em dente permanente imaturo necrosado. Essa técnica consiste na estimulação biológica do crescimento radicular por meio de células indiferenciadas presentes na papila apical que preenchem o canal radicular após a indução de um coágulo sanguíneo (Lovelace et al., 2011). Desde então diversos estudos clínicos e experimentais tem demonstrado resultados positivos dessa técnica, principalmente no que diz respeito ao fortalecimento das paredes dos canais radiculares e crescimento de comprimento radicular, além da volta de sensibilidade a testes térmicos (Soares et al., 2013; Nagata et al., 2014; Botero et al., 2017).

A terapia endodôntica regenerativa utiliza a capacidade inerente de proliferação de células do tecido conjuntivo para preencher os espaços vazios no corpo. Para isso, a presença de um arcabouço biológico que preceda esse novo tecido se faz necessário. Embora diversos estudos tenham propostos arcabouços sintéticos (Ulusoy et al., 2019), o coágulo sanguíneo do próprio paciente é o melhor para essa função, principalmente pela liberação de diversos fatores de crescimento que promovem a proliferação e diferenciação celular (Webb et al., 1997). Assim, a partir desse coágulo, redes de fibrinas servirão de sustentação para a formação do tecido conjuntivo e cimento dentro do canal radicular, promovendo o crescimento e fortalecimento radicular (Nosrat et al., 2019).

Contudo, para garantia da terapia endodôntica regenerativa, assim como para tratamentos endodônticos convencionais, o uso de substâncias químicas auxiliares se fazem obrigatórias para garantia da descontaminação de bactérias que possam estar presentes nos canais radiculares (Fouad, 2017). Atualmente a Associação Americana de Endodontia recomenda o uso do hipoclorito de sódio em baixas concentrações associadas ao EDTA 17% (American Association of Endodontists, 2018). O uso do hipoclorito pode ser justificado pelo seu alto poder antibacteriano, tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas,

além do seu baixo custo (Berber et al., 2006). Contudo, para o tratamento de dentes permanentes imaturos, o hipoclorito apresenta uma série de desvantagens que tornam o seu uso limitado, como por exemplo a alta citotoxicidade quando em contato a células da papila apical (Trevino et al., 2011), a redução da liberação de fatores de crescimento pela dentina radicular quando associado ao EDTA (Galler et al., 2015; Zeng et al., 2016), além de graves injúrias aos pacientes em casos de extravasamento.

Nagata et al. (2014) propuseram um novo protocolo de descontaminação com o uso de clorexidina 2% como substância química auxiliar. Os resultados apresentados pelo estudo demonstraram uma alta taxa de sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos realizados com essa substância química. Assim como o hipoclorito de sódio, a clorexidina apresenta alta atividade antibacteriana para gram-positivos e gram-negativos, além de apresentar uma substantividade quando em contato com a dentina radicular, o que permite que seus efeitos antimicrobianos sejam prolongados (Gomes et al., 2009). Embora alguns estudos tenham demonstrado que a clorexidina possa ser prejudicial às células da papila apical (Widbiller et al., 2019), sua baixa citotoxicidade aos tecidos periapicais em casos de extravasamento a tornam ideal para casos de dentes com ápices abertos. Além disso, estudo de Galler et al. (2015), concluíram que a clorexidina associada ao EDTA potencializa a liberação de fatores de crescimento pela dentina radicular.

Recentemente, Taweewattanapaisan et al. (2019) observaram que a irrigação com EDTA promove alterações na morfologia de células sanguíneas e na rede de fibrina do coágulo induzido pós-revascularização. Sabendo-se que a clorexidina possui substantividade e que sua interação com EDTA produz subprodutos, é de crítica importância o conhecimento do efeito desse tipo de protocolo de descontaminação na formação do coágulo sanguíneo, haja vista que este será o principal arcabouço para chegada de células mesenquimais indiferenciadas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 TRAUMA DENTAL COMO ETIOLOGIA PARA NECROSE PULPAR DE DENTES IMATUROS

As lesões traumáticas dentárias representam aproximadamente 5% das lesões em crianças e adolescentes, podendo levar a sérios problemas médicos e psicológicos (Malak et al., 2021). Estima-se que sua prevalência seja de um bilhão de pessoas afetadas em todo o mundo, podendo ser considerada como a quinta injúria ou doença mais prevalente (Petti et al., 2018). A alta taxa de violência e de acidentes de trânsito, assim como maior uma participação das crianças em atividades esportivas e lazer, são fatores que contribuem para transformar o traumatismo dentário em um problema de saúde pública emergente (Traebert et al., 2012).

As injúrias dentárias podem ocorrer isoladamente ou associadas a lesões faciais ou corporais. Apresentam alta incidência em crianças de 1 a 3 anos, predominando em meninos de 10 a 12 anos como consequência da prática de esportes de contato e atividades de risco (Tewari et al., 2019).

Segundo a International Association of Dental Traumatology (IADT), o trauma dental pode ser classificado em dois grupos, de acordo com o tecido afetado. Quando se trata apenas dos tecidos duros dos dentes, os traumas podem ser classificados como fratura em esmalte, fratura em esmalte e dentina com ou sem exposição pulpar, fratura coronoradicular, fratura radicular e fratura alveolar. Quando afetam os tecidos de suporte do dente, são classificados como concussões, subluxações, luxações extrusivas, laterais ou intrusivas e avulsões dentais. Dentre essas lesões, as mais comuns são de luxação para dentição decídua e para os dentes permanentes, as fraturas coronárias são as mais relatadas (Levin et al., 2020). Sequelas após os traumatismos dentários são comuns e podem ocorrer em semanas, meses ou anos após o acidente traumático. Sequelas como obliteração do canal pulpar, necrose pulpar e reabsorção radicular são as mais comuns, sendo que o pior prognóstico observado é a reabsorção radicular (Lima et al., 2015).

Lima et al (2015) tiveram como objetivo avaliar as principais complicações pós-traumáticas da luxação severa e reimplante de dentes permanentes com rizogênese completa e incompleta por meio de análises clínicas e radiográficas durante 24 meses. Para isso, foram avaliados oitenta e três pacientes com idades entre 7 e 55 anos com 180 dentes traumatizados apresentando luxação extrusiva (n= 67), luxação lateral (n= 69), luxação intrusiva (n= 10) e avulsão dentária (n= 34) seguida de reimplante. Como resultado, observou-se que os pacientes que procuraram tratamento 9 semanas após ocorrido o trauma, apresentaram 10

vezes mais chances de desenvolver reabsorção inflamatória. Além disso, todos os elementos que sofreram luxação intrusiva e avulsão dentária foram diagnosticados com necrose pulpar, representando 82,7% da amostra, também se observou reabsorção radicular inflamatória (20,5%) e a reabsorção por substituição que foi relacionada ao reimplante dentário (94,1%). Desta forma, os autores concluíram que a demora na procura de um tratamento pode prejudicar o prognóstico de luxações severas e reimplantes e que a principal complicação pós-traumática observada foi a necrose pulpar.

Sendo a necrose pulpar a sequela mais comum em dentes traumatizados, o manejo de dentes imaturos necrosados apresenta-se como um grande desafio clínico (Jeeruphan et al., 2012; Nosrat et al., 2012), pois com a interrupção do desenvolvimento radicular, as paredes dentinárias permanecem finas e frágeis, ficando susceptíveis à fratura quando sujeitas a forças oclusais ou a novos episódios de trauma (Cvek, 1992; Camp, 2008; Flanagan, 2014). Sendo assim, a intervenção endodôntica ideal deve ter em vista a resolução de qualquer patologia apical existente, além de promover continuidade no desenvolvimento radicular (Hargreaves, Giesler, Henry, & Wang, 2008; Hargreaves et al., 2013). Nesse contexto, a técnica endodôntica regenerativa surge como uma alternativa terapêutica na abordagem endodôntica de dentes com rizogênese incompleta com necrose pulpar. Portanto, é de suma importância o diagnóstico, planejamento e acompanhamento adequados a fim de garantir um prognóstico favorável ao paciente, visto que essas situações permanecem como um desafio na área endodôntica.

## **2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA**

O tratamento endodôntico em dentes permanentes com rizogênese incompleta apresenta-se como um grande desafio pelo fato de o terço apical não estar completamente formado e o forame ser amplo, dificultando a adaptação do cone principal e retenção adequada do material obturador. Além disso, as paredes do canal ainda são frágeis e finas, fato que torna o preparo químico-mecânico convencional contraindicado (Soares et al., 1996; Dotto et al., 2006; Seibel et al., 2006). Neste contexto, os tratamentos de apicificação e de endodontia regenerativa são os procedimentos mais indicados para o tratamento desses dentes.

A apicificação de acordo com a Associação Americana de Endodontia (AAE) é indicada para dentes com dentes rizogênese incompleta com grande destruição coronária e que necessitam de pinos, podendo ser realizada por meio de duas técnicas. Uma delas, consiste em sucessivas trocas de pastas de hidróxido de cálcio que tem como objetivo induzir

a formação de uma barreira mineralizada para uma posterior obturação do canal radicular (Alcade et al., 2014). Porém, segundo Andreassen et al (2002), a permanência a longo prazo desta medicação pode levar a fragilização da raiz devido às propriedades higroscópicas e proteolíticas do hidróxido de cálcio. A segunda alternativa, é realizada por meio da confecção de uma barreira apical artificial com o próprio hidróxido cálcio ou agregado trióxido mineral (MTA) (Alcade et al., 2014). O uso do MTA para confecção do tampão apical, em substituição do hidróxido de cálcio, é justificado pela alta capacidade de selamento e resposta biológica (Nosrat et al., 2011). Todavia, tais procedimentos possuem a desvantagem de não permitir a continuidade do desenvolvimento radicular, fato que poderia manter a fragilidade radicular, possibilitando uma fratura (Nosrat et al., 2011).

A terapia endodôntica regenerativa, segundo a Associação Americana de Endodontia (AAE), é indicada para dentes necrosados em estágios iniciais de desenvolvimento radicular (estágios 2 e 3 de Cvek) e que não necessitarão de tratamentos restauradores com pinos, e para pacientes colaborativos, que não sejam alérgicos a antibióticos ou a medicamentos que serão utilizados no tratamento. Esta técnica tem como base a migração de células indiferenciadas para o interior do canal radicular, as quais irão dar origem a um novo tecido. Algumas teorias afirmam que essas células se originam na papila apical, enquanto outros autores afirmam que elas derivam do ligamento periodontal (Lovelace et al., 2011). Os dentes que possuem o diâmetro apical com uma abertura de 3mm, em média, são os que apresentam prognóstico mais favorável em virtude do suprimento abundante para região apical (Alcade et al., 2014).

Para que seja possível o sucesso da terapia endodôntica regenerativa, é necessário sobreinstrumentar o elemento dentário, a fim de induzir o fluxo sanguíneo para o interior do canal radicular para que haja formação de um coágulo sanguíneo rico em células mesenquimais indiferenciadas. As redes de fibrinas presentes neste coágulo serão responsáveis pela sustentação e nutrição do novo tecido formado (Torabinejad et al., 2017; Ulusoy et al., 2019; Taweewattanapaisan et al., 2019). Além disso, o estímulo de um coágulo sanguíneo aliado ao uso de substâncias irrigadoras, promovem a liberação de fatores de crescimento, que são proteínas que se ligam aos receptores celulares e que promoverão a migração, adesão e proliferação de células indiferenciadas (Murray et al., 2007; Bansal, 2011; Alcade et al., 2014; Smith et al., 2016).

O protocolo proposto pela Associação Americana de Endodontia (AAE) para a realização da terapia endodôntica regenerativa, deve ser dividido em duas sessões. Na primeira, é feita a desinfecção passiva do canal radicular com 20mL de hipoclorito de sódio (NaOCl) em menores concentrações (1,5%) e medicação intracanal a base de hidróxido de

cálcio ou uma pasta dupla ou tripla antibiótica que permanecerá no canal de 1 a 4 semanas. Na segunda sessão, na ausência de sinais e sintomas, irriga-se abundantemente o conduto de forma suave com 20 mL de EDTA 17% e induz o sangramento por meio de instrumentação de 2mm além do forame, com uso de uma lima manual de calibre 30 a 35. O sangramento deverá preencher o conduto e ficar abaixo da junção amelo-cementária. A seguir, uma esponja de colágeno é inserida no conduto, e uma barreira cervical com cimento biocerâmico é posicionada sobre a esponja, seguida de restauração definitiva com resina composta. Após isso, é recomendado o acompanhamento do paciente por 6, 12 e 24 meses.

De acordo com o estudo de Wilstrom et al (2021), que teve como objetivo avaliar e mapear as evidências existentes sobre a eficácia da apicificação e técnicas regenerativas no tratamento de dentes imaturos com necrose pulpar e periodontite apical. A busca da literatura foi feita em cinco bases de dados eletrônicas (PubMed, Web of Science, Cochrane Library, Ovid (Medline) e Embase) e incluiu sete estudos elegíveis. No total, 116 dentes foram avaliados nos grupos de técnicas regenerativas (RET) e 578 nos grupos de apicificação. A análise quantitativa evidenciou que as técnicas de regeneração e de apicificação (com hidróxido de cálcio e tampão apical de MTA) tiveram altas taxas de sucesso, entre 90 a 96%, mostrando eficácia na sobrevivência dos dentes permanentes necróticos imaturos. Porém, em termos de maturação, relacionados ao espessamento e tamanho radicular, as técnicas regenerativas endodônticas revelaram-se superiores às técnicas de apicificação. Todavia, os autores observaram uma alta heterogeneidade entre os estudos elegíveis e mais estudos são necessários em relação aos protocolos de tratamento e acompanhamento de ambas as técnicas.

### **2.3 SOLUÇÕES IRRIGADORAS UTILIZADAS NA TERAPIA ENDODÔNTICA REGENERATIVA**

Para que a regeneração pulpar seja bem sucedida, é de suma importância a desinfecção dos sistemas de canais radiculares, realizada pela ação de substâncias irrigadoras e da medicação intracanal (Lovelace et al., 2011; Alcade et al., 2014; Soares et al. 2020). Dentre as substâncias químicas mais utilizadas para estes procedimentos, destaca-se o hipoclorito de sódio (NaOCl) e gluconato de clorexidina (CLX), sendo o NaOCl mais utilizado, tanto no tratamento endodôntico de dentes decíduos como nos permanentes durante a desinfecção dos condutos (Fidalgo et al., 2009; Alcade et al., 2014).

O NaOCl destaca-se pela alta capacidade de dissolução de tecido orgânico, atividade bactericida, remoção da smear layer, desmineralização e consequente abertura dos túbulos dentinários. Pode ser utilizado em diversas concentrações, variando de 0,5 a 6% e

apresenta uma relação inversa entre potencial de desinfecção e citotoxicidade (Galler et al., 2015). Atualmente, para a terapia endodôntica regenerativa, a Associação Americana de Endodontia recomenda o uso do hipoclorito de sódio em baixas concentrações (American Association of Endodontists, 2018), devido ao efeito citotóxico que o NaOCl pode apresentar nas células-tronco da papila apical.

Martin et al (2014) analisaram a sobrevivência das células-tronco da papila apical (SCAPs) e expressão da sialofosfoproteína dentinária (DSPP) após a irrigação do canal radicular com diferentes concentrações de NaOCl. Para isso utilizaram raízes de terceiros molares extraídos, e simularam dentes imaturos padronizados com 5mm de comprimento. Após isso, as raízes foram descontaminadas com diferentes concentrações de hipoclorito de sódio (0.5%, 1.5%, 3%, ou 6%) e células indiferenciadas foram pipetadas no interior do conduto, permanecendo por 30 minutos. A seguir, as células foram encapsuladas em um hidrogel à base de ácido hialurônico e a contagem de células viáveis foi feita com um teste de luminescência. Os autores concluíram que altas concentrações de NaOCl (6%) alteram negativamente a sobrevivência e diferenciação de SCAPs, podendo ser evitado com uma menor concentração de NaOCl (1,5%) quando seguido de EDTA 17%. Portanto, a escolha da concentração de hipoclorito de sódio deve refletir a necessidade de um equilíbrio entre desinfecção suficiente e proliferação de células mesenquimais indiferenciadas (Galler et al., 2015).

Outra opção para desinfecção de canais durante a terapia endodôntica regenerativa, o gluconato de clorexidina tem sido utilizado como irrigante e associado à medicação intracanal na concentração de 2% (Reynolds, 2009; Shin et al., 2009; Soares et al., 2013; Nagata et al. 2014). Difere-se do hipoclorito de sódio pelo fato de apresentar alta substantividade e por causar menor irritação tecidual em casos de extravasamento (Soares et al., 2013), porém permanece a implicação clínica do uso da clorexidina em função da sua incipiente dissolução de tecidos orgânicos (Nagata et al., 2014).

No estudo clínico de Nagata et al (2014), vinte e três dentes permanentes traumatizados com rizogênese incompleta de pacientes com idades entre 7 e 17 anos foram avaliados, com a finalidade de comparar o sucesso da pasta tripla antibiótica (TAP) e da combinação de hidróxido de cálcio com gel de clorexidina a 2% (CHX) como medicação intracanal. Como protocolo de irrigação, foi utilizado o hipoclorito de sódio (6%) e tiosulfato de sódio (5%) para inativar os efeitos residuais do NaOCl, clorexidina gel (2%) seguida de Tween 80 (5%) e lecitina de soja (0,07%) para neutralizar os efeitos residuais da CHX, além do EDTA 17% na segunda consulta. Os pacientes foram acompanhados durante um período de, em média, 15 meses e foi observada em aproximadamente 100% dos casos a regressão

das lesões periapicais e consequente ausência de sintomatologia dolorosa, bem como o fechamento apical, aumento da espessura e comprimento radicular. Esse estudo evidenciou a efetividade da clorexidina como solução irrigadora e como veículo do hidróxido de cálcio para uso como medicação intracanal na terapia endodôntica regenerativa.

Em contrapartida, o uso de clorexidina durante a terapia endodôntica é controverso devido aos seus efeitos deletérios às células da papila apical, resultando em menor migração e proliferação celular (Trevino et al., 2011). Estudo recente de Widbiller et al. (2019) preconizam que após a irrigação com clorexidina, deve ser realizado uma irrigação final com um agente neutralizante composto pelo Tween 80 e lecitina de soja 0.07%.

Além do uso de substâncias irrigantes, é fundamental o uso de agentes quelantes, como o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), ácido cítrico e MTAD (Galler et al., 2011). O EDTA é utilizado para acentuar a remoção da smear layer e para promover a liberação de fatores de crescimento, por meio da desmineralização e exposição da matriz dentinária durante a terapia endodôntica regenerativa (Mohammadi et al., 2013; Galler et al., 2015), além de promover uma maior proliferação e adesão de células tronco. Contudo, apesar de suas vantagens na revascularização pulpar, o estudo de Taweewattanapaisan et al (2019) evidenciou que a irrigação com EDTA 17% ocasiona alterações na morfologia de células sanguíneas e na rede de fibrina do coágulo induzido pós-revascularização, e que seu uso deve ser seguido por uma irrigação com soro fisiológico a fim de reduzir os seus efeitos sobre o coágulo sanguíneo.



### **3 PROPOSIÇÃO**

O objetivo desse estudo foi avaliar in vitro as características do coágulo sanguíneo formado pós-procedimento endodôntico regenerativo em dentes imaturos submetidos a diferentes protocolos de irrigação.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 SUBMISSÃO AO COMITÊ DE ÉTICA**

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas sob o parecer n. CAAE: 30143620.7.0000.5418 (Anexo 2).

### **4.2 SELEÇÃO E PREPARO DOS ESPÉCIMES**

#### **4.2.1 Secção dos dentes**

Quinze (15) incisivos bovinos unirradiculares extraídos foram utilizados após aplicação dos seguintes critérios de inclusão e exclusão: Os dentes deveriam possuir raízes retas, sem rachaduras e um comprimento de raiz de pelo menos 15mm. As raízes que apresentarem mais de um único canal, curvatura acentuada, fissuras, fraturas, calcificação radiculares ou cáries extensas serão excluídas do estudo.

Após a limpeza, com auxílio de uma lapiseira com grafite nº .0,5, demarcou-se a junção cimento esmalte. As coroas de todos os dentes foram removidas com uso de um disco diamantado dupla face, com um corte perpendicular ao longo eixo do dente, 2mm abaixo da junção cimento-esmalte, e posteriormente foi realizado outro corte 10 mm abaixo do primeiro, padronizando todas as raízes com 10 mm de comprimento. A seguir, dois sulcos longitudinais foram confeccionados nas faces vestibular e lingual de cada espécime, sem atingir o canal radicular, utilizando um disco diamantado dupla face.

#### **4.2.2 Preparo dos canais**

Sob irrigação com 20 ml de soro fisiológico, as raízes dos dentes foram preparadas em toda extensão com uso de limas rotatórias 40.06 no sentido coroa-ápice e retropreparadas com brocas gates glidden 4 no sentido ápice-coroa por 2mm até se obter um ápice aberto de 1mm de diâmetro, confirmado com a passagem de uma lima 100 do tipo K. Radiografias digitais (Apixia PSP Scanner, California, EUA) foram realizadas para confirmação do formato do canal preparado.

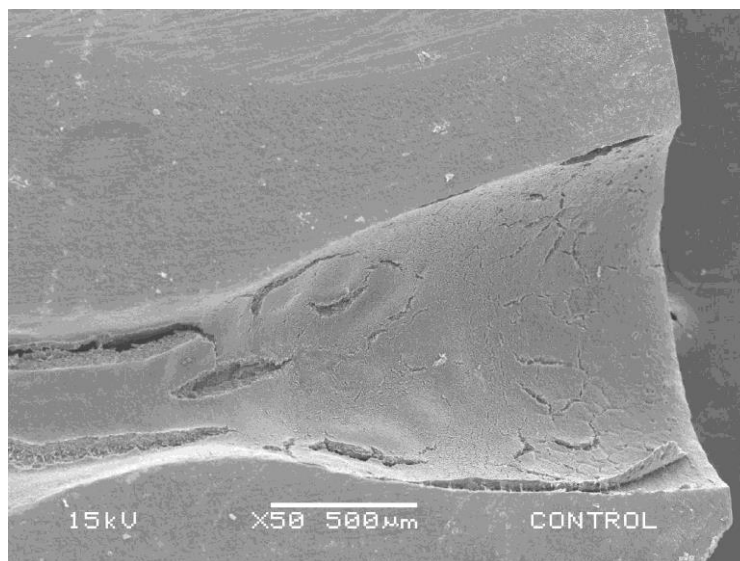


Figura 1 - Imagem em microscopia eletrônica de varredura com aumento de 50x, onde é possível observar o preparo apical das amostras.

#### 4.2.3 Montagem do corpo de prova

Os espécimes foram divididos verticalmente ao meio, no sentido vestibulo-lingual, por um cinzel cirúrgico. A metade de cada raiz que se apresentou mais íntegra foi selecionada para o estudo. A outra metade foi descartada. A seguir, as raízes foram moldadas em silicone de condensação e colocadas em torno metálico para garantir estabilidade.

#### 4.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente ([www.randomizer.org](http://www.randomizer.org)) em três grupos (n=5), de acordo com o protocolo de irrigação a ser utilizado:

- **Grupo Controle (GC):** Soro fisiológico (20ml/5min)
- **Grupo Experimental 1 (G1):** Hipoclorito de sódio 1,5% (20 ml/5min) + Soro fisiológico (5 ml) + EDTA 17% (20 ml/5min)
- **Grupo Experimental 2 (G2):** EDTA 17% (20 ml/5min) + Soro fisiológico (5ml)

Em todos os protocolos de irrigação as pontas das agulhas (25G) estavam posicionadas a 1mm do ápice para evitar o extravasamento das substâncias. Ao final, os canais foram secos com uma Capillary tip nº 0,48 (Ultradent, Indaiatuba, SP, Brasil) e pontas de papel absorvente estéreis.

#### **4.4 COLETA DE SANGUE**

A amostra de sangue foi coletada de um voluntário saudável, com mais de 18 anos, não fumante, que não tenha anemia ou doenças cardiovasculares, não faz uso de medicações anticoagulantes e que não tenha ingerido aspirina ou qualquer substância análoga por pelo menos 48 horas antes da coleta. Após aceitar participar, o voluntário assinou um termo de consentimento livre e esclarecido, onde foram explicados os objetivos do estudo (Anexo 4).

A coleta foi realizada seguindo as normas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (2010). A ponta do dedo médio de uma das mãos foi limpa com uma gaze estéril e álcool 70%, e em seguida o sangramento foi induzido por meio de uso de uma lanceta para glicemia. A primeira gota foi limpa com uma gaze estéril e as seguintes foram coletadas e armazenadas em um recipiente de vidro estéril.

#### **4.5 FORMAÇÃO DO COÁGULO**

Com uso de um microbrush estéril, o sangue foi espalhado em toda extensão dos canais radiculares dos espécimes previamente submetidas aos protocolos de irrigação, com o objetivo de simular o procedimento de revascularização.

A seguir, os espécimes foram retirados do torno e imediatamente após, as raízes foram mantidas em uma câmara umidificadora à 37°C durante 15 minutos.

#### **4.6 PREPARAÇÃO DO ESPÉCIME PARA ANÁLISE O MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARRUDURA (MEV)**

##### **4.6.1 Fixação**

As amostras foram fixadas em uma solução de glutaraldeído a 2,5% em uma solução tampão de PBS com um pH de 7,4 por 30 minutos, seguido por três lavagens em solução tampão fosfato por 5 minutos. A seguir, as amostras foram desidratadas em série com etanol a 30,50,70 e 90% e três vezes com etanol a 100%.

A amostra já fixada e completamente desidratada foi levada à câmara de CPD, em um pequeno volume de acetona, em uma temperatura de 4°C. A câmara foi isolada e CO<sub>2</sub>

líquido foi injetado, sendo substituído até a remoção total da acetona. Posteriormente, a câmara foi aquecida e o CO<sub>2</sub> tornou-se gasoso a uma determinada pressão.

#### 4.6.2 Montagem do stub

Com auxílio de fita adesiva dupla face de carbono, os espécimes foram posicionados com as superfícies voltadas para cima, procurando deixar estas na mesma altura e paralelas ao plano do stub, ajustando-se a melhor orientação em relação ao feixe de elétrons e ao coletor.

#### 4.6.3 Metalização

Concluída a montagem, o stub foi colocado em pote com sílica gel fechado hermeticamente por 24 h para secagem e só após foi levado para o metalizador (SCD050, BAL-TEC AG, Balzers, Principado de Liechtenstein) para as superfícies dos espécimes serem revestidas com liga de ouro-paládio, sob alto vácuo. Essa cobertura, de aproximadamente 30 nm, além de tornar as amostras biológicas mais condutivas, melhora a emissão de elétrons secundários. Até a análise, os stubs foram armazenados em potes plásticos hermeticamente fechados com sílica gel.



Figura 2 - Amostras após metalização.

#### 4.7 ANÁLISE DE DENSIDADE DA REDE DE FIBRINA E DO DIÂMETRO DAS FIBRAS

Para quantificar a densidade da rede de fibrinas, três imagens representativas de cada espécime foram selecionadas e calibradas utilizando a escala de 10µm e divididas em doze quadrados com áreas 100µm<sup>2</sup> cada (Figuras 3 e 4), utilizando o software ImageJ.

Posteriormente, dois examinadores realizaram a contagem de fibras que se encontravam em cada um desses quadrados (Figura 5), de forma independente. Para determinação da densidade, realizou-se a média da quantidade das fibras a cada  $100\ \mu\text{m}^2$  em cada imagem. Os dados foram tabulados em uma planilha de Excel utilizando a unidade de medida fibras/ $100\ \mu\text{m}^2$ .

A análise dos diâmetros foi feita seguindo o mesmo método da quantificação de fibrinas. Porém, foram mensuradas as cinco fibras de maior calibre (figura 6) das três imagens representativas de cada espécime de cada grupo. Através do software ImageJ (National Institutes of Health Bethesda, Bethesda, MD) foram observadas as três imagens de cada espécime e ao final, foi feita a média e desvio padrão dos valores obtidos.

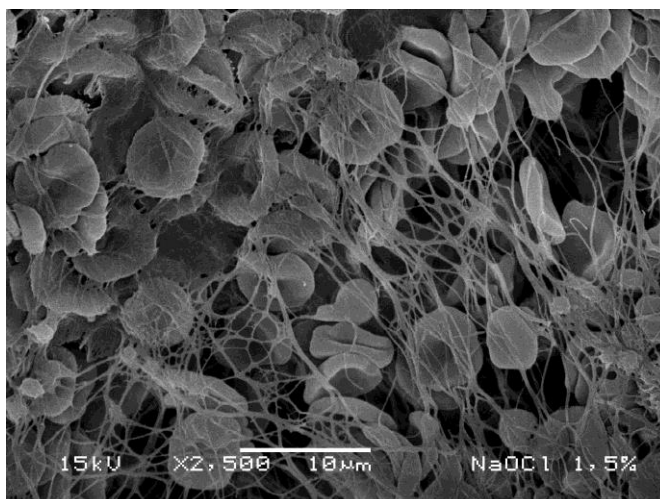


Figura 3 - Calibração em escala de  $10\ \mu\text{m}$ .

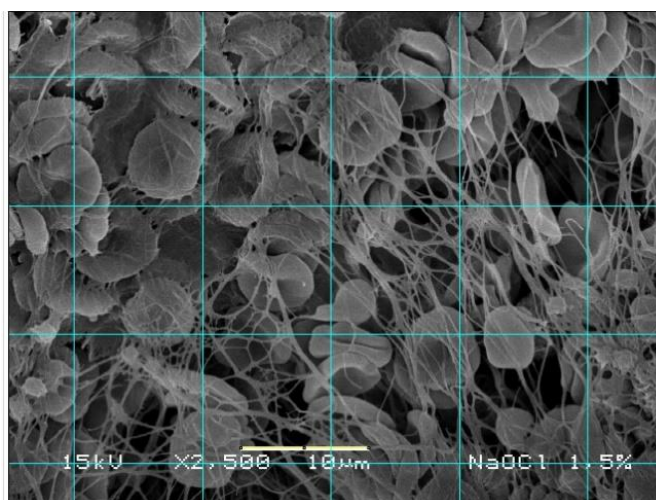


Figura 4 - Divisão em 12 áreas de  $100\ \mu\text{m}^2$  cada.

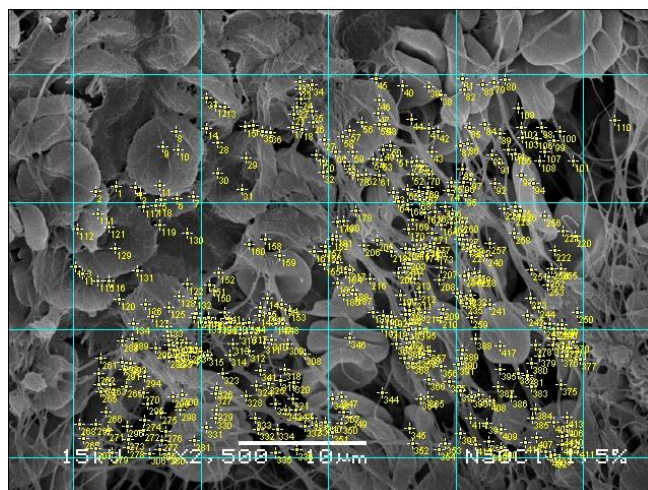


Figura 5 - Contagem das fibras em cada quadrado.

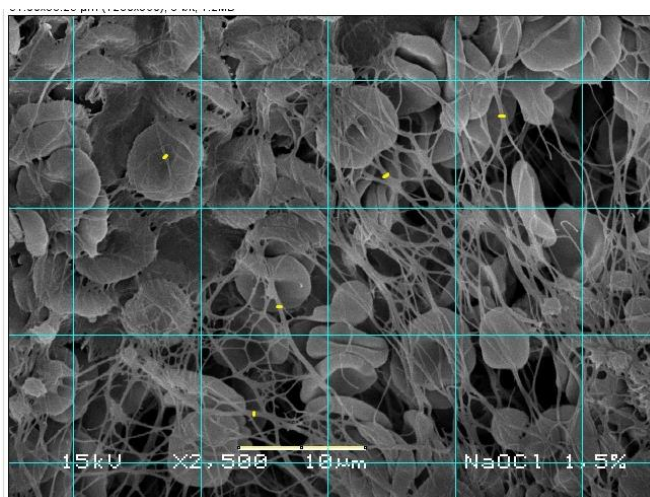


Figura 6 - Análise do diâmetro das cinco fibras mais calibrosas (traços amarelos).

#### 4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DAS PLAQUETAS, ERITRÓCITOS E DA ESTRUTURA DE MEMBRANAS

A análise ultraestrutural da morfologia das plaquetas e eritrócitos foram avaliadas por meio de análise visual com uso de Microscopia Eletrônica de Varredura JEOL (JEOL-JSM T330A). Três micrografias foram tiradas em áreas aleatórias da superfície dos espécimes, sob magnificação de 2500x. Imagens em uma magnificação de 500x foram retiradas com o objetivo de verificar a homogeneidade do coágulo. As estruturas das membranas dos eritrócitos foram avaliadas sob magnificação de 2500x.



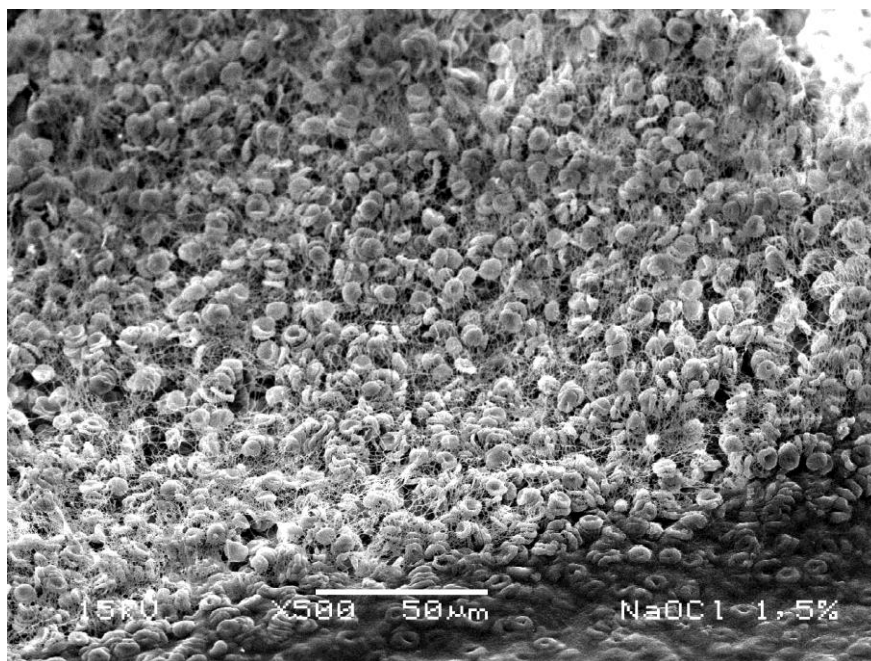


Figura 7 - Imagem com 500x de magnificação para avaliação da homogeneidade do coágulo.

#### 4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Antes da avaliação, a confiabilidade intraobservador da densidade das fibras foi avaliada com o coeficiente de correlação Kappa, sendo considerado um índice ideal kappa > 0.8. Os resultados foram descritos em mediana, valor mínimo e máximo. A comparação entre o número de fibras por 100µm<sup>2</sup> e do diâmetro das fibras de cada grupo de irrigação foi realizada por meio do teste Kruskal-Wallis, seguido do teste *post hoc* de Bonferroni. Um p < 0,05 foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises de dados estatísticos foram realizadas usando o software R.



## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE DESCRITIVA DA MORFOLOGIA DO COÁGULO

As amostras dos grupos foram analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), sendo que cada um continha cinco dentes que foram devidamente fixados, montados em stub e metalizados. Durante as observações, foram feitas três micrografias em áreas aleatórias da superfície dos espécimes, sob magnificação de 2500x, com o objetivo de analisar a densidade e diâmetro das redes de fibrina.

O grupo GC foi o que mais apresentou variação no formato das hemácias. Foram observadas hemácias bicôncavas, achatadas, muitas com bordas irregulares e houve a formação de rouleaux (empilhamento das hemácias). Além disso, observou-se redes de fibrinas dispersas e pouco numerosas (Figura 8).

O grupo G1 evidenciou a maior quantidade de células inerentes ao coágulo sanguíneo. Observou-se hemácias majoritariamente bicôncavas, discreta presença de neutrófilos, plaquetas e grande densidade de fibrinas.

O grupo G2 apresentou a menor taxa de formação de fibrinas. As hemácias foram observadas bicôncavas, crenadas, algumas com bordas irregulares e formação de rouleaux.

Vale ressaltar que os diâmetros das fibras apresentaram pouca variação entre os grupos.

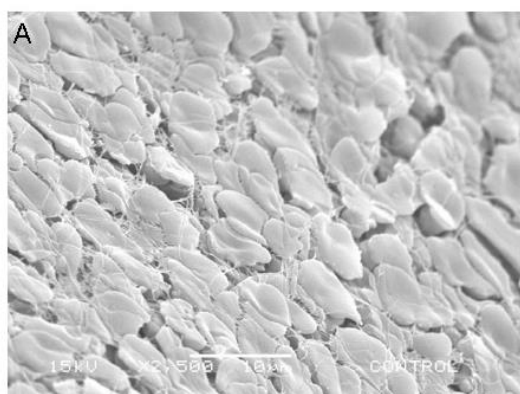


Figura A. Grupo GC: presença de hemácias achatadas, bicôncavas, bordas irregulares e densidade mediana de rede de fibrinas.

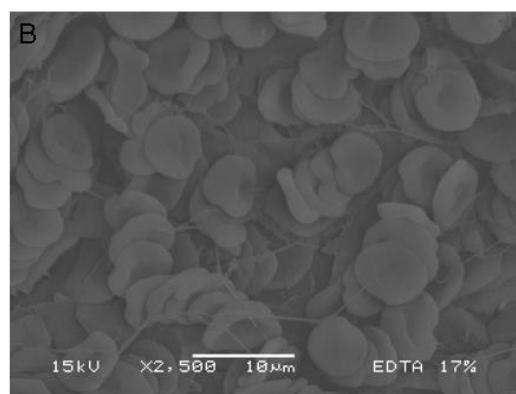


Figura B. Grupo G2: presença de hemácias bicôncavas, crenadas, formação de rouleaux e baixa densidade de rede de fibrinas.

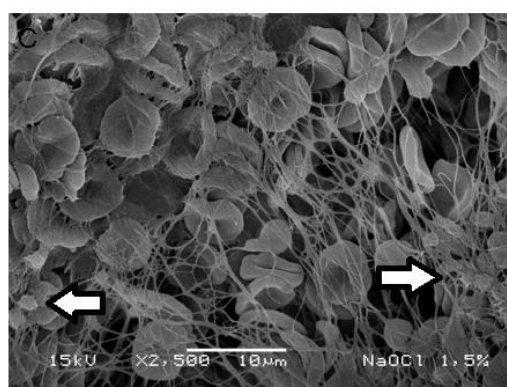


Figura C. Grupo G1: presença de hemácias bicôncavas, plaquetas (indicado pela seta) e alta densidade de rede de fibrinas.

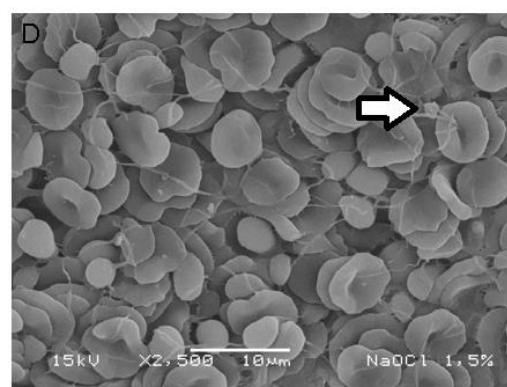


Figura D. Grupo G1: presença de hemácias bicôncavas e neutrófilo (indicado pela seta).

Figura 8 - Características morfológicas do coágulo sanguíneo formado em cada grupo experimento. Foram selecionadas fotos representativas de cada grupo.

## 5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística revelou diferença significativa ( $p < 0.05$ ) entre a densidade de fibras presentes no GE1, quando comparado aos grupos GC e G2. Em relação ao diâmetro das fibras, não foi observada diferença significativa entre os grupos. Na tabela 1 é possível observar detalhes dos dados obtidos em cada grupo.

Tabela 1 - Comparação estatística da mediana do número de fibras por 100 $\mu\text{m}^2$  e da mediana do número de fibras dos diferentes grupos de irrigação

| <b>Grupos</b>                                                | <b>Mediana do número de fibras / 100<math>\mu\text{m}^2</math> (mínimo, máximo)</b> | <b>Mediana do diâmetro das fibras em <math>\mu\text{m}</math> (mínimo, máximo)</b> |
|--------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|
| GC (soro fisiológico)                                        | 4 (0, 12) <sup>a</sup>                                                              | 0,210 (0,119, 0,427) <sup>a</sup>                                                  |
| G1 (Hipoclorito de sódio 1,5% + soro fisiológico + EDTA 17%) | 15 (1, 41) <sup>b</sup>                                                             | 0,333 (0,214, 0,676) <sup>a</sup>                                                  |
| G2 (EDTA 17%)                                                | 2 (0, 8) <sup>a</sup>                                                               | 0,324 (0,178, 0,485) <sup>a</sup>                                                  |
| P value (Kruskal-Wallis test)                                | < 0,05                                                                              | > 0,05                                                                             |

Letras diferentes indica diferença estatisticamente significativa ( $P < 0,05$ ) entre os diferentes protocolos de irrigação

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo fazer uma análise ultraestrutural do coágulo sanguíneo em dentes imaturos submetidos a diferentes protocolos de irrigação. Através do Microscópio Eletrônico de Varredura, pôde-se observar como resultado mais satisfatório, o grupo G1, em que se obteve uma superfície de coágulo composta por uma malha densa de fibras com eritrócitos abundantes e bicôncavos, sendo encontrados em toda a extensão do canal radicular, além de plaquetas ativadas e neutrófilos.

O grupo G2, evidenciou a menor taxa de síntese de fibras, alterações morfológicas das hemácias e principalmente a formação de rouleaux. Em relação ao diâmetro das fibras, não foi observada variação significativa ao modificar os protocolos de irrigação.

Na área endodôntica, o hipoclorito de sódio (NaOCl) tem sido utilizado em diferentes concentrações para limpeza dos canais radiculares, devido às propriedades antimicrobianas, capacidade de dissolver resíduos teciduais e biocompatibilidade com os tecidos adjacentes. Porém, deve-se prevenir o extravasamento dessa substância para o periápice, uma vez que pode afetar as células estaminais da papila apical e interferir na formação do coágulo sanguíneo e diferenciação celular no interior do canal radicular (Bansal et al., 2015).

No grupo G1, houve grande formação de rede de fibrinas ao longo do canal, em que o resultado se deve ao fato de ter realizado a combinação do hipoclorito de sódio 1,5% + soro fisiológico + EDTA 17%. Logo, pode-se dizer que o NaOCl, foi o responsável pela dissolução de tecido orgânico, ou seja, desmineralizou parte da dentina radicular, criando canais de difusão na parte inter e peritubular da dentina, (Zhang, 2010). Porém, o uso isolado do NaOCl, não promove a completa remoção de smear layer, tornando necessária a utilização de um agente quelante irreversível, o EDTA, que se liga aos íons cálcio, promovendo maior limpeza dos túbulos dentinários e liberando fatores de crescimento na dentina radicular. Segundo um estudo de Taweewattanapaisan et al. (2019), durante a odontogênese, ocorre o aprisionamento de moléculas bioativas na matriz extracelular da dentina que posteriormente, se forem expostas a fatores de crescimento (TGF- $\beta$ 1 e FGF- $\beta$ 2), podem impulsionar a diferenciação celular e síntese matricial (TGF- $\beta$ 1), além de aumentar a proliferação celular e angiogênese (FGF- $\beta$ 2), que são fundamentais para a formação de um arcabouço, visando a neoformação de tecido conjuntivo e manutenção do metabolismo celular no interior do canal radicular. Acredita-se também, que o soro fisiológico utilizado nos grupos G1 e G2, foi responsável pela lavagem residual de NaOCl e EDTA, fato que contribuiu para a síntese das redes de fibrina.

Assim como Taweewattanapaisan et al. (2019), observamos no grupo G2, a crenação e empilhamento (formação de rouleaux) das hemácias. No primeiro caso, ocorreu devido a difusão de água para fora das células. Já no segundo, provavelmente ocorreu o aumento de proteínas plasmáticas, além da menor taxa de formação de fibras. Dessa forma, concluiu-se que o uso de apenas um agente quelante não apresenta resultado satisfatório, visando a regeneração endodôntica.

Vale ressaltar, que o presente estudo in vitro, apresentou diversas limitações, tais como a inviabilidade de reprodução fiel a uma situação clínica e a necessidade da realização de estudos futuros, visto a baixa evidência científica do tema em questão. Entretanto é o primeiro estudo da literatura a investigar a associação entre hipoclorito de sódio e EDTA e seus efeitos na formação estrutural do coágulo sanguíneo no interior dos canais radiculares. Por se tratar de um estudo piloto, estudos futuros deverão ser realizados com a metodologia apresentada afim de se investigar mais a fundo a influência de soluções irrigadoras e seus produtos sobre a formação do coágulo sanguíneo.

## **7 CONCLUSÃO**

Pôde-se concluir através do presente estudo que os protocolos de irrigação utilizando hipoclorito de sódio, EDTA 17% e soro fisiológico ocasionam alterações na morfologia do coágulo sanguíneo formado durante os procedimentos endodônticos regenerativos em dentes imaturos.

## REFERÊNCIAS<sup>1\*</sup>

Alcalde M, Guimarães B, Fernandes S, Amoroso-Silva P, Bramante C, Vivan R, et al. Revascularização pulpar: considerações técnicas e implicações clínicas. *Salusvita*. 2014;33(3):415-32.

American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure; 2018.

Andreassen, J, Farik, B, Munksgaard, E. Long--term calcium hydroxide as roots canal dressing may increase risk of root canal fracture. *Dent Traumatol*. 2002 Jun;18(3):134-7. doi: 10.1034/j.1600-9657.2002.00097.x.

Bansal R, Jain A, Mittal S. Current overview on challenges in regenerative endodontics. *J Conserv Dent*. 2015 Jan-Feb;18(1):1-6. doi: 10.4103/0972-0707.148861.

Berber VB, Gomes BP, Sena NT, Vianna ME, Ferraz CC, Zaia AA, et al. Efficacy of various concentrations of NaOCl and instrumentation techniques in reducing *Enterococcus faecalis* within root canals and dentinal tubules. *Int Endod J*. 2006 Jan;39(1):10-7. doi: 10.1111/j.1365-2591.2005.01038.x.

Botero TM, Tang X, Gardner R, Hu JCC, Boynton JR, Holland GR. Clinical Evidence for Regenerative Endodontic Procedures: Immediate versus Delayed Induction? *J Endod*. 2017 Sep;43(9S):S75-S81. doi: 10.1016/j.joen.2017.07.009.

Camp JH. Diagnosis dilemmas in vital pulp therapy: treatment for the toothache is changing, especially in young, immature teeth. *Pediatr Dent*. 2008 May-Jun;30(3):197-205.

Cvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha: a retrospective clinical study. *Endod Dent Traumatol*. 1992 Apr;8(2):45-55. doi: 10.1111/j.1600-9657.1992.tb00228.x.

de-Jesus-Soares A, Prado MC, Nardello LCL, Pereira AC, Cerqueira-Neto ACCL, Nagata JY, et al. Clinical and molecular microbiological evaluation of regenerative endodontic

---

<sup>1\*</sup> De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed.

procedures in immature permanent teeth. *J Endod.* 2020 Oct;46(10):1448-54. doi: 10.1016/j.joen.2020.07.005.

Desai S, Chandler N. The restoration of permanent immature anterior teeth, root filled using MTA: a review. *J Dent.* 2009 Sep;(37): 652–7. doi: 10.1016/j.jdent.2009.05.026.

Dotto SR, Travassos RMC, Santos R, Santos KSA, Melo WRA. Tratamento endodôntico em dente permanente com necrose pulpar e ápice incompleto – relato de caso. *Rev Endod.* 2006;(2):1-8.

Fidalgo T, Primo L, Barcelos R, Petrópolis D, da Rocha-Azevedo B, Costa e Silva Filho F. Citotoxicidade de diferentes concentrações de hipoclorito de sódio sobre osteoblastos humanos. *RGO.* 2009;57(3):317-21

Flanagan TA. What can cause the pulps of immature, permanent teeth with open apices to become necrotic and what treatment options are available for these teeth. *Aust Endod J.* 2014 Dec;40(3):95–100. doi: 10.1111/aej.12087.

Fouad AF. Microbial factors and antimicrobial strategies in dental pulp regeneration. *J Endod.* 2017 Sep;43(9S):S46-S50. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.010.

Galler K, D'Souza R, Federlin M, Cavender A, Hartgerink J, Hecker S. Dentin conditioning code- termines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod.* 2011;37(11):1536-41. doi: 10.1016/j.joen.2011.08.027.

Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, et al. Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. *J Endod.* 2015 Mar;41(3):363-8. doi: 10.1016/j.joen.2014.11.021.

Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, et al. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent.* 2009 Jan;37(1):76-81. doi: 10.1016/j.jdent.2008.09.009.

Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2013;39(3):30–43. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.025.



Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold?. *J Endod*. 2008;34(7):51–6. doi: 10.1016/j.joen.2008.02.032.

Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol*. 2001 Aug;17(4):185-7. doi: 10.1034/j.1600-9657.2001.017004185.x.

Jeeruphan, T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: Comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: A retrospective study. *J Endod*. 2012;38(10):1330-6. doi:10.1016/j.joen.2012.06.028.

Levin L, Day PF, Hicks L, et al. International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: General introduction. *Dent Traumatol*. 2020; 36:309-13. doi: 10.1111/edt.12574.

Lima TF, Nagata JY, de Souza-Filho FJ, de Jesus Soares A. Post-traumatic complications of severe luxations and replanted teeth. *J Contemp Dent Pract*. 2015 Jan;16(1):13-9. doi: 10.5005/jp-journals-10024-1628.

Lovelace TW, Henry MA, Hargreaves KM, Diogenes A. Evaluation of the delivery of mesenchymal stem cells into the root canal space of necrotic immature teeth after clinical regenerative endodontic procedure. *J Endod*. 2011 Feb;37(2):133-8. doi: 10.1016/j.joen.2010.10.009.

Malak C, Chakar C, Romanos A, Rachidi S. Prevalence and etiological factors of dental trauma among 12- and 15-year-old schoolchildren of Lebanon: a national study. *Scient World J*. 2021 Mar 5;2021:5587431. doi: 10.1155/2021/5587431.

Mohammadi Z, Shalav S, Jafarzadeh H. Ethyleneaminetetraacetic in endodontics. *Eur J Dent*. 2013 Sep;7(Suppl 1):S135-42. doi: 10.4103/1305-7456.119091.

Murray P, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod*. 2009;33(4):377-90. doi: 10.1016/j.joen.2006.09.013.

Nagata JY, Gomes BP, Rocha Lima TF, Murakami LS, de Faria DE, Campos GR, et al. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J Endod*. 2014 May;40(5):606-12. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.032.

Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K. Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. *Journal of Endodontics*. 2012;38(10):1428-34. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.025.

Nosrat A, Kolahdouzan A, Khatibi AH, Verma P, Jamshidi D, Nevins AJ, et al. Clinical, radiographic, and histologic outcome of regenerative endodontic treatment in human teeth using a novel collagen-hydroxyapatite scaffold. *J Endod*. 2019 Feb;45(2):136-43. doi: 10.1016/j.joen.2018.10.012

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and reports of two cases with new biomaterial. *J Endod*. 2011;37(4):562-7. doi: 10.1016/j.joen.2011.01.011.

Petti S, Glendor U, Andersson L. World traumatic dental injury prevalence and incidence, a meta-analysis-One billion living people have had traumatic dental injuries. *Dent Traumatol*. 2018 Apr;34(2):71-86. doi: 10.1111/edt.12389.

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J*. 2009;(42):84-92. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01467.x.

Seibel VM, Soares RG, Limongi O. Histomorfologia do reparo após tratamento endodôntico em dentes com rizogênese incompleta: revisão de literatura. *Rev Sul-Bras Odontol*. 2006;3(2):37-43.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*. 2009;(42):1118-26. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01633.x.

Smith AJ, Duncan HF, Diogenes A, Simon S, Cooper PR. Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2016 Jan;42(1):47-56. doi: 10.1016/j.joen.2015.10.019.

Soares Ade J, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, et al. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *J Endod*. 2013 Mar;39(3):417-20. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.005.

Soares IJ, Felipe MCS, Lucena MG. Tratamento de dentes com rizogênese incompleta. *Rev ABO Nac*. 1996;(4):26-31.

Songtrakul K, Azarpajouh T, Malek M, Sigurdsson A, Kahler B, Lin L. Modified Apexification Procedure for Immature Permanent Teeth with a Necrotic Pulp/Apical Periodontitis: A Case Series. *J Endod* 2020 Jan;46(1):116-23. doi: 10.1016/j.joen.2019.10.009.

Taweewattanapaisan P, Jantararat J, Ounjai P, Janebodin K. The Effects of EDTA on Blood Clot in Regenerative Endodontic Procedures. *J Endod*. 2019 Mar;45(3):281-6. doi: 10.1016/j.joen.2018.10.010.

Tewari N, Bansal K, Mathur VP. Dental Trauma in Children: A Quick Overview on Management. *Indian J Pediatr*. 2019 Nov;86(11):1043-7. doi: 10.1007/s12098-019-02984-7.

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):1806-10. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.029.

Traebert J, Claudino D. Epidemiologia do Traumatismo Dentário em Crianças: A Produção Científica Brasileira. *Pesq Bras Odontoped Clín Integ*, João Pessoa. 2012;12(2):263-72. doi: 10.4034/PBOCI.2012.122.17.

Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, et al. Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod* 2011 Aug;37(8):1109-15. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.013.

Ulusoy AT, Turedi I, Cimen M, Cehreli ZC. Evaluation of Blood Clot, Platelet-rich Plasma, Platelet-rich Fibrin, and Platelet Pellet as Scaffolds in Regenerative Endodontic Treatment: A Prospective Randomized Trial. *J Endod*. 2019 May;45(5):560-6. doi: 10.1016/j.joen.2019.02.002.

Webb NJ, Bottomley MJ, Watson CJ, Brenchley PE. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is released from platelets during blood clotting: implications for measurement of circulating VEGF levels in clinical disease. *Clin Sci (Lond)*. 1998 Apr;94(4):395-404. doi: 10.1042/cs0940395.

WHO Guidelines on Drawing Blood: Best Practices in Phlebotomy. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2010.

Widbiller M, Althumairy RI, Diogenes A. Direct and Indirect Effect of Chlorhexidine on Survival of Stem Cells from the Apical Papilla and Its Neutralization. *J Endod*. 2019 Feb;45(2):156-60. doi: 10.1016/j.joen.2018.11.012.

Wikström A, Brundin M, Lopes MF, El Sayed M, Tsilingaridis G. What is the best long-term treatment modality for immature permanent teeth with pulp necrosis and apical periodontitis?. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2021 Jan 8. doi: 10.1007/s40368-020-00575-1.

Zeng Q, Nguyen S, Zhang H, Chebrolu HP, Alzebdeh D, Badi MA, Kim JR, Ling J, et al. Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. *J Endod*. 2016 Dec;42(12):1760-6. doi: 10.1016/j.joen.2016.04.029.

Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent*. 2010;2010:856087. doi: 10.1155/2010/856087.

## APÊNDICE 1 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA  
UNICAMP



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)  
Número do CAAE: (inserir após aprovação pelo CEP)

### APRESENTAÇÃO DA PESQUISA:

Você está sendo convidado a participar como voluntário da pesquisa *Análise morfológica do coágulo sanguíneo em dentes submetidos a diferentes protocolos de irrigação – Um estudo in vitro*, que será realizada na Faculdade de Odontologia de Piracicaba, sob a responsabilidade do pesquisador Walbert de Andrade Vieira. As informações presentes neste documento foram fornecidas pelos pesquisadores Walbert de Andrade Vieira, Adriana de Jesus Soares e Giovanna Hiromi Kitamura. Este documento, chamado Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, visa assegurar seus direitos como participante e é elaborado em duas vias, uma que ficará com você e outra que ficará com o pesquisador.

Por favor, leia com atenção e calma, aproveitando para esclarecer suas dúvidas. Se tiver perguntas antes ou mesmo depois assinar o Termo, você poderá esclarecê-las com o pesquisador. Se preferir, você pode levar este Termo para casa e consultar seus familiares ou outras pessoas antes de decidir participar. Não haverá qualquer tipo de penalização ou prejuízo se você não quiser participar ou se retirar sua autorização em qualquer momento, mesmo depois de iniciar sua participação na pesquisa. É importante realizar esta pesquisa porque por meio dela esperamos propor o melhor método de descontaminação dos canais radiculares que serão submetidos a procedimentos regenerativos da polpa (nervo) do dente.

### INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

**Objetivos:** O objetivo desta pesquisa será avaliar microscopicamente a morfologia do sangue após o contato com substâncias utilizadas durante o tratamento de canal.

**Procedimentos e metodologias:** Participando do estudo você está sendo convidado a doar o seu sangue, que será coletado de um dos seus dedos médios, com uso de um aparelho utilizado para medir glicemia. O procedimento dura menos de um minuto e pode gerar leve desconforto e dor no momento da coleta. Ao término, será solicitado que você mantenha o local pressionado por pelo menos dez minutos com um algodão estéril. Você **não** deve participar deste estudo se possuir anemia ou problemas de coração, fuma, faz uso de anticoagulantes ou que tenha feito ingestão de aspirina ou qualquer outra substância similar nas últimas 48 horas.

**Métodos alternativos:** Um método alternativo para a coleta do sangue é por meio de punção venosa. Tal método possui maiores chances de provocar desconforto e contaminação durante a coleta. Além disso, o volume necessário para esta pesquisa é muito pequeno e facilmente alcançado sem necessidade de punção venosa.

**Desconfortos e riscos previstos:** O procedimento de doação do sangue pode causar pequeno desconforto e dor no momento de perfuração com a lanceta para glicemia, além de risco de contaminação.

**Benefícios:** Não são esperados benefícios diretos ao voluntário participante da pesquisa. Apenas a população em geral será beneficiada por meio de publicações científicas.

**Forma de contato com os pesquisadores:** Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com a pesquisadora Giovanna Hiromi Kitamura (Telefone: (014) 997662658; Endereço: Departamento de Odontologia Restauradora, Área de Endodontia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Av. Limeira, 901, Bairro Areião, CEP:13413-903; Email: giovannakitamura10).

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

**Forma de contato com Comitê de Ética em Pesquisa (CEP):** O papel do CEP é avaliar e acompanhar os aspectos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, protegendo os participantes em seus direitos e dignidade. **Em caso de dúvidas, denúncias ou reclamações sobre sua participação e sobre seus direitos como participante da pesquisa, entre em contato com a secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)** da Faculdade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP: Av Limeira 901, FOP-Unicamp, CEP 13414-903, Piracicaba – SP. Fone/Fax 19-2106.5349, e-mail cep@fop.unicamp.br e Web Page [www.fop.unicamp.br/cep](http://www.fop.unicamp.br/cep).

#### **GARANTIAS AOS PARTICIPANTES:**

**Esclarecimentos:** Você será informado e esclarecido sobre os aspectos relevantes da pesquisa, antes, durante e depois da pesquisa, mesmo se esta informação causar sua recusa na participação ou sua saída da pesquisa.

**Direito de recusa a participar e direito de retirada do consentimento:** Você tem o direito de se recusar a participar da pesquisa e de desistir e retirar o seu consentimento em qualquer momento da pesquisa sem que isso traga qualquer penalidade ou represálias de qualquer natureza e sem que haja prejuízo ao seu tratamento iniciado ou por iniciar.

**Sigilo e privacidade:** Você tem a garantia de que sua identidade será mantida em sigilo e as informações obtidas durante a pesquisa só serão acessadas pelos pesquisadores. Na divulgação dos resultados desse estudo, informações que possam identificá-lo não serão mostradas ou publicadas.

**Ressarcimento:** Você não terá qualquer despesa por participar na pesquisa.

**Indenização e medidas de reparação:** Não há previsão de indenização ou de medidas de reparo, pois não há previsão de risco ou de dano pela participação na pesquisa, mas você tem o direito de buscar indenização e reparação se se sentir prejudicado pela participação na pesquisa.

**Entrega de via do TCLE:** Você receberá uma via deste Termo assinada e rubricada pelo pesquisador.

#### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO:**

Após ter recebido esclarecimentos sobre a natureza da pesquisa, seus objetivos, métodos, benefícios previstos, potenciais riscos e desconfortos que esta pode acarretar, aceito participar e declaro ter recebido uma via original deste documento rubricada em todas as folhas e assinada ao final, pelo pesquisador e por mim:

Nome do (a) participante: \_\_\_\_\_

Contato telefônico: \_\_\_\_\_

e-mail (opcional): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_, Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.  
(Assinatura do participante ou nome e assinatura do seu RESPONSÁVEL LEGAL)

#### **Responsabilidade do Pesquisador:**

Asseguro ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Asseguro, também, ter explicado e fornecido uma via deste documento ao participante. Informo que o estudo foi aprovado pelo CEP perante o qual o projeto foi apresentado. Comprometo-me a utilizar o material e os dados obtidos nesta pesquisa exclusivamente para as finalidades previstas neste documento ou conforme o consentimento dado pelo participante.

Rubrica do pesquisador: \_\_\_\_\_

Rubrica do participante: \_\_\_\_\_

## ANEXOS

## Anexo 1 – Verificação de originalidade e prevenção de plágio

# ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DO COÁGULO SANGUÍNEO FORMADO PÓS-PROCEDIMENTO ENDODÔNTICO REGENERATIVO EM DENTES IMATUROS SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO – UM ESTUDO EM EX-VIVO

## RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE

|                       |                    |             |                       |
|-----------------------|--------------------|-------------|-----------------------|
| 1 % <small>EN</small> | 0 %                | 1 %         | 0 %                   |
| ÍNDICE DE SEMELHANÇA  | FONTES DA INTERNET | PUBLICAÇÕES | DOCUMENTOS DOS ALUNOS |

## FONTES PRIMÁRIAS

|   |                                                                                                                                                                                                               |      |
|---|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1 | Peerapohn Taweewattanapaisan, Jeeraphat Jantararat, Puey Ounjai, Kajohnkiart Janebodin. "The Effects of EDTA on Blood Clot in Regenerative Endodontic Procedures", Journal of Endodontics, 2019<br>Publicação | <1 % |
| 2 | <a href="http://www.cellulosechemtechnol.ro">www.cellulosechemtechnol.ro</a><br>Fonte da Internet                                                                                                             | <1 % |



## Anexo 2 – Comitê de Ética em Pesquisa



UNICAMP - FACULDADE DE  
ODONTOLOGIA DE  
PIRACICABA DA  
UNIVERSIDADE DE CAMPINAS  
- FOP/UNICAMP



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE MORFOLÓGICA DO COÁGULO SANGUÍNEO EM DENTES SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGAÇÃO e UM ESTUDO IN VITRO

**Pesquisador:** WALBERT DE ANDRADE VIEIRA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 30143620.7.0000.5418

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.962.005

#### Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo do registro do protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil

A EQUIPE DE PESQUISA citada na capa do projeto de pesquisa inclui WALBERT DE ANDRADE VIEIRA (Cirurgião Dentista, Mestrando no PPG em Clínica Odontológica, área de concentração em Endodontia, da FOP-UNICAMP, Pesquisador responsável, orientando), GIOVANNA HIROMI KITAMURA (Graduanda no Curso de Odontologia da FOP-UNICAMP, Pesquisadora participante, Orientanda), ADRIANA DE JESUS SOARES (Cirurgiã Dentista, Docente na área de Endodontia da FOP-UNICAMP, Pesquisadora participante, orientadora), o que é confirmado na declaração dos pesquisadores e na PB.

#### Situação do Parecer:

Aprovado

#### Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 08 de Abril de 2020

---

**Assinado por:**  
**jacks jorge junior**  
**(Coordenador(a))**



## Anexo 3 – Iniciação Científica

### Relatório Final-PIBIC

Nome: Giovanna Hiromi Kitamura

#### Dados do Orientador

Nome: ADRIANA DE JESUS SOARES

### ANÁLISE DO COÁGULO SANGUÍNEO FORMADO PÓS-PROCEDIMENTO ENDODONTICO REGENERATIVO SUBMETIDOS A DIFERENTES PROTOCOLOS DE DESCONTAMINAÇÃO – UM ESTUDO EM EX-VIVO

Versão enviada em 27/09/2020 18:21:18 [ver relatório](#)

#### **Parecer do orientador emitido em 27/09/2020 18:51:12**

Desempenho do aluno no projeto: A aluna desempenhou com responsabilidade todas as fases do projeto, e conseguiu mesmo frente a suspensão das atividades presenciais obter resultados propostos do projeto.

Desempenho acadêmico do aluno: A bolsista obteve um excelente desempenho acadêmico durante a elaboração da pesquisa. O presente trabalho foi enviado para o XXVII Jornada Odontológica de Piracicaba da UNICAMP e será apresentado nos dias 29 e 30 de outubro de 2020.

Também vai participar XXVIII Congresso {VIRTUAL} de Iniciação Científica da UNICAMP.

#### **Parecer do Assessor dado em 11/12/2020 10:14:03**

O relatório está muito bem escrito e justificado, apresentando os resultados possíveis, em virtude da pandemia. Está prevista a continuação do estudo quando as atividades presenciais retornarem, diminuindo assim os prejuízos ao aprendizado da aluna. A orientadora se mostra satisfeita com o desempenho da aluna.

**Aprovado**