

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – NÍVEL  
MESTRADO  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO CLÍNICA ODONTOLÓGICA-ENDODONTIA

MARINA ASPESI

AVALIAÇÃO DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS  
PARA O PROTOCOLO DE  
REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO EM CULTURA  
CELULAR

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA – ENDODONTIA

MARINA ASPESI

**AVALIAÇÃO DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS  
PARA O PROTOCOLO DE  
REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO EM CULTURA  
CELULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de concentração Clínica Odontológica, ênfase em Endodontia.

Linha de pesquisa: Biomateriais e Técnicas Terapêuticas em Odontologia

Orientador (a): Prof<sup>ª</sup>. Dra Roberta Kochenborger Scarparo

Porto Alegre

2019

*“E um dia os homens  
descobrirão que esses discos  
voadores estavam apenas  
estudando a vidas dos  
insetos...”*

*Mário Quintana*

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Cristina e Eduardo, vocês são a base da minha vida e sem vocês nada disso seria possível. Agradeço por todo o amor, apoio e incentivo durante essa trajetória e em todos os momentos.

Ao meu namorado Gabriel, por sempre acreditar em mim, ser um grande incentivador e companheiro. Agradeço por todos os auxílios matemáticos e de Excel, que foram essenciais.

Ao meu irmão Nelson e à minha cunhada Isis, por me darem a certeza de que nunca estarei sozinha e por todo o amor e carinho sempre.

À minha orientadora, professora Roberta Kochenborger Scarparo, por todo o auxílio e dedicação ao longo desse trabalho. És uma fonte de inspiração para mim e eu fico muito feliz e orgulhosa de ser tua orientada.

À minha grande amiga e parceira de pesquisa Mariana Deluca, sem ti essa pesquisa não seria possível. Agradeço por todo o apoio e por ser meu ponto de equilíbrio, me acalmando e tornado tudo muito melhor. Sou muito grata pela parceria que criamos e quero levar para a vida.

À Pós-doutoranda Bibiana Matte, pelos incansáveis ensinamentos e auxílios durante todo o período experimental da pesquisa. E por sempre estar disponível para me passar seu extenso conhecimento nesse mundo mágico das células com tanta dedicação e amor. Me espelho muito em ti!!

À equipe do LAMOC, iniciando pelos professores Marcelo Lamers, Lisiane Bernardi e José Antônio Poli de Figueiredo. À toda equipe do “Journal Club”: Bibi, Paloma, Gabi, Lu’s, Júlia, Mari, Paola e Leo. Agradeço por terem me recebido tão bem e por toda troca de conhecimento, aprendi muito com vocês. Um agradecimento especial ao Leo Diel pela extração dos dentes em que as células foram coletadas, etapa fundamental para o desenvolvimento da pesquisa. E por sempre estar disponível para me ajudar após a clássica pergunta “Leo, pode dar uma olhadinha aqui?”. Agradeço também imensamente à Luiza Brand por toda a ajuda na parte experimental, sendo sempre muito atenciosa e positiva. Além de todo o ensinamento, as tuas palavras foram muito importantes e especiais para mim, tenho certeza que tu tens um futuro de muito sucesso pela frente.

À professora Fernanda Visioli e à colega Julia Nunes, pelos materiais utilizados no ensaio de SRB e por estarem sempre disponíveis para qualquer ajuda.

Aos professores da Endodontia, que tive o prazer de conviver e aprender durante as clínicas e algumas aulas teóricas. Tiago Melo, Ricardo Abreu, Fabiana Grecca, Régis Burmeister, Patrícia Kopper, Marcus Só, Simone Bonatto, Francisco Montagner e José Antônio de Figueiredo. Em especial à Pati Kopper que foi minha orientadora por um semestre, sendo sempre muito disponível e atenciosa. E à Fabi Grecca que teve uma grande participação, me auxiliando com a pesquisa sempre com muita dedicação.

Ao professor Luciano Casagrande por todo o apoio e disponibilidade durante a pesquisa.

Aos colegas de mestrado, com quem ao longo do curso e das disciplinas tive o prazer de criar uma amizade que faço questão de cultivar, Natália Villa, Luisa Dockhorn, Gabriela Crespo, Paulo Scalzilli, Mauricio Anastacio. Agradeço também às minhas grandes amigas doutorandas, Marla Cuppini, Gabriela Cardoso Ferreira e Paola Arosi, o apoio e incentivo de vocês foi essencial e muito importante para mim, foram minhas inspirações. Agradeço também a todos os outros colegas do “LabEndo” pela parceria e amizade.

Agradeço muito à Roberta Mendes, por ter sido essa colega e amiga tão atenciosa, sem medir esforços para me ajudar, tenho certeza que tu tens um futuro científico de muito sucesso pela frente. Agradeço também à Leticia Mestieri que, mesmo não participando diretamente desse trabalho, foi quem me apresentou, com muito carinho e dedicação, a metodologia de cultura celular, fazendo com que eu me interessasse para continuar trabalhando com essa linha, refletindo no atual trabalho.

Agradeço à banca, escolhida com muito carinho, por ter aceito esse convite: José Antônio Poli de Figueiredo, Lisiane Bernardi e Daiana Elisabeth Böttcher e à Silvana Beltrami Gonçalves Waltrick (suplente)

E a todos que de alguma forma participaram desta conquista, muito obrigada!

## Resumo:

O protocolo de revascularização pulpar é uma atual opção de tratamento para casos de dentes portadores de necrose pulpar com rizogênese incompleta. Embora a literatura mostre resultados promissores, ainda há inúmeras variações quanto ao protocolo de desinfecção química com o uso de soluções irrigadoras. Para o êxito do tratamento, o irrigante deve ter ação antimicrobiana e, ao mesmo tempo, permitir a sobrevivência das células responsáveis pelo processo de revascularização. O objetivo desse estudo foi avaliar o efeito do Hipoclorito de Sódio (NaOCL) associado ao EDTA, Hipoclorito de Sódio associado ao Smear Clear e do QMix® 2 in 1 em diferentes concentrações e tempos experimentais, como possíveis irrigantes para o protocolo de revascularização, por meio de ensaios *in vitro* em cultura de células primárias obtidas da papila apical humana e em linhagem celular endotelial. Os aspectos avaliados foram citotoxicidade, índice de polaridade celular, migração e efeito angiogênico, por meio do ensaio de tubulogênese. Os dados foram submetidos ao teste estatístico ANOVA seguido de post-hoc de Bonferroni com nível de significância de 5%. Para todos os grupos, um maior período de contato com o irrigante foi relacionado a uma menor viabilidade celular. O efeito citotóxico também foi dose dependente para todos os irrigantes, após o período de 24h ( $p < 0.5$ ). O grupo NaOCL/EDTA apresentou as maiores taxas de viabilidade ( $p < 0.5$ ). O índice de polaridade celular foi afetado pela concentração dos irrigantes. Menores tempos de exposição resultaram em morfologias celulares mais alongadas, especialmente no grupo NaOCL/EDTA. A velocidade de migração celular foi menor do que o controle, em todos os grupos analisadas nas diferentes concentrações e períodos ( $p < 0.5$ ), exceto na concentração de 0.1% no grupo NaOCL/EDTA após 1h de exposição. No período de 24h, o grupo NaOCL/EDTA 0.1% apresentou a maior velocidade de migração ( $p < 0.5$ ). A direcionalidade de migração foi reduzida nos maiores períodos de exposição aos irrigantes, em todos os grupos e concentrações, o que foi menos evidente para o NaOCL/EDTA. No ensaio de tubulogênese, células endoteliais tratadas com NaOCL/EDTA demonstraram uma maior distância de migração em uma matriz tridimensional (3D), comparado aos outros grupos, independentemente da concentração e período experimental avaliados ( $p < 0.5$ ). Em conclusão, dentre as soluções testadas, o uso de NaOCL associado ao EDTA apresentou melhores resultados em relação à resposta biológica do modelo de cultura celular avaliado.

**Palavras-chaves:** irrigantes do canal radicular; necrose da polpa dentária; endodontia regenerativa; viabilidade celular, ensaios de migração celular; coagulação sanguínea

## **Abstract:**

Pulp revascularization protocol is a current treatment option for cases of immature teeth presenting pulp necrosis. Although promising results has been demonstrated, there are still numerous variations regarding the chemical disinfection protocol. Irrigant solutions must have antimicrobial activity and also allow maintainance of cells viability. The aim of this study was to evaluate the effect of Sodium Hypochlorite (NaOCL) associated with EDTA, Sodium Hypochlorite associated with Smear Clear and QMix® 2 in 1 at different concentrations and experimental periods, as possible irrigants for the revascularization protocol. Cytotoxicity, cellular polarity index and migration assays were performed in primary cell culture obtained from human apical papilla. Cytotoxicity and angiogenic effect by a tubulogenesis assay were assessed using an endothelial cell line. Data were submitted to statistical test ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test with a significance level of 5%. For all groups, a longer contact period with the irrigant was related to lower cell viability. The cytotoxic effect was also dose dependent for all irrigants after the 24h period ( $p < 0.5$ ). The NaOCL/EDTA group had the highest viability rates ( $p < 0.5$ ). Cell polarity index was affected by irrigant concentration. Shorter exposure times resulted in longer cell morphologies, especially in the NaOCL/EDTA group. Cell migration rate was lower than control in all groups analyzed at different concentrations and periods ( $p < 0.5$ ), except at 0.1% concentration in NaOCL/EDTA group after 1h of exposure. In the 24h period, the 0.1% NaOCL/EDTA group presented the highest migration speed. ( $p < 0.5$ ). Migration directionality was reduced in the longest irrigant exposure periods in all groups and concentrations. NaOCL/EDTA presented the highest migration directionality compared to the other groups in both concentrations and periods evaluated. In the sprouting assay, endothelial cells treated with NaOCL/EDTA demonstrated a greater migration distance in a three-dimensional (3D) matrix compared to the other groups, regardless of the concentration and experimental period evaluated ( $p < 0.5$ ). In conclusion, amongst the tested solutions, the use of NaOCL associated with EDTA presented better results regarding to the biological behavior of the evaluated cell culture model.

**Keywords:** root canal irrigants; dental pulp necrosis; regenerative endodontics; cell viability, cell migration assays; blood coagulation

## SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO .....	9
2. INTRODUÇÃO.....	10
3. OBJETIVOS.....	16
4. ARTIGO CIENTÍFICO.....	17
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40
REFERÊNCIAS .....	41
ANEXOS .....	47



## 1.APRESENTAÇÃO

A presente dissertação teve como objetivo principal avaliar a ação do Hipoclorito de Sódio associado ao EDTA, Hipoclorito de Sódio associado ao Smear Clear e do QMix® 2 in 1 como possíveis irrigantes para o protocolo de revascularização, por meio de ensaios *in vitro* em cultura de células primárias obtidas da papila apical humana e em linhagem celular endotelial.

Será apresentada da seguinte forma:

- Introdução;
- Objetivos;
- Artigo científico: o desenvolvimento e os resultados do estudo estão apresentados na forma de artigo científico que será submetido à publicação na revista International Endodontic Journal, fator de impacto 3.331 (Qualis A1, CAPES);
- Considerações finais.

## 2. INTRODUÇÃO

A revascularização pulpar é uma atual opção de tratamento para casos de dentes portadores de necrose pulpar com rizogênese incompleta (KAHLER B et al., 2018). Esses casos representam um grande desafio para os profissionais, pois os dentes imaturos apresentam as paredes radiculares finais e frágeis e não há um limite de trabalho definido, dificultando assim a desinfecção por meios mecânicos. Dessa forma, a desinfecção depende exclusivamente de irrigantes e medicações intracanal. (LOVELACE et al., 2011). Esta técnica surgiu como uma alternativa para o tradicional tratamento de apicificação, o qual consiste na utilização de uma pasta a base de hidróxido de cálcio no interior do canal radicular, realizando trocas periódicas deste produto por um longo período, em múltiplas consultas. Apesar deste procedimento também ter como objetivo a indução da formação de uma barreira calcificada, o mesmo não permite a continuidade do desenvolvimento radicular e a permanência desta medicação por longos períodos pode diminuir a resistência à fratura das raízes, fragilizando-as (ANDREASEN; FARIK; MUNKSGAARD, 2002). Dessa forma, em casos de ocorrência de traumatismos dento-alveolares, fraturas coronárias ou radiculares poderão ocorrer, comprometendo a permanência do dente na cavidade oral. Um clássico estudo realizado por Cvek em 1992, avaliou dentes humanos imaturos necróticos tratados com hidróxido de cálcio e posteriormente preenchidos com guta percha. O período de acompanhamento foi de 4 anos. Analisou-se a saúde dos tecidos periradiculares e a frequência de fraturas radiculares cervicais e observou-se que a ocorrência de fraturas foi maior do que o esperado e foi dependente do estágio de desenvolvimento radicular (CVEK, 1992).

Nesse sentido, o objetivo e a principal vantagem deste novo tratamento consiste em continuar o desenvolvimento radicular, através da deposição de tecido duro, fortalecendo a raiz contra possíveis fraturas (DIOGENES et al., 2013; GALLER, 2016). Esse procedimento ocorre através da formação de um *scaffold* no interior do canal radicular, que irá atuar como uma matriz para as células tronco indiferenciadas (LOVELACE et al., 2011; THIBODEAU e TROPE, 2007). A presença de infecção pode afetar

negativamente o processo de regeneração, danificando essas células (KIM, 2016). Por isso, é extremamente importante que haja uma adequada desinfecção prévia do canal radicular.

Um dos primeiros estudos envolvendo o processo de revascularização foi realizado no ano de 1961 por Ostby. Foi analisado o papel do coágulo sanguíneo após o preenchimento do canal radicular e observou-se a importância do mesmo para a formação de tecido fibroso no interior de canais radiculares. Além disso, também foi avaliado a influência do ambiente asséptico para a organização do tecido periapical (OSTBY, 1961). Em 1972 Ham e colaboradores também avaliaram a indução de formação de coágulo, observando o posterior fechamento apical. Sob o ponto de vista histológico, o tecido calcificado formado sobre o ápice radicular foi avaliado como material osteóide ou cementóide (HAM; PATTERSON; MITCHELL, 1972).

O protocolo clínico de revascularização baseia-se na desinfecção do sistema de canais radiculares através do uso de soluções irrigadoras e medicações intracanal, seguida pela indução de sangramento na região periapical que irá permitir o preenchimento do canal radicular pelo coágulo sanguíneo e por células indiferenciadas, possibilitando assim a formação do novo tecido. A porção cervical do dente é selada com MTA e coronalmente com materiais restauradores (SHAH et al., 2008), sendo realizado um acompanhamento clínico e radiográfico.

De acordo com a literatura, após ocorrer a desinfecção, as células da papila apical (SCAPs), estimuladas pelas células da bainha epitelial de Hertwig, são capazes de proliferar e diferenciarem-se em odontoblastos, permitindo a continuidade da formação radicular. (SONOYAMA et al., 2008; HUANG et al., 2008). A entrada dessas células no interior do canal radicular ocorre através da indução de sangramento na região periapical. Além disso, a presença de fatores de crescimento, também presentes no coágulo sanguíneo, apresentam um papel importante na revascularização. (WANG et al., 2007).

No entanto, o uso de antissépticos citotóxicos e a instrumentação excessiva podem inviabilizar o tecido da papila apical (DAS, 1980; DAS; DAS; MURPHY, 1997) e conseqüentemente as células capazes de formar polpa e dentina também são perdidas (IWAYA; IKAWA; KUBOTA, 2011).

Inicialmente, é realizada a descontaminação dos canais radiculares, por meio da irrigação e da medicação intracanal (LOVELACE et al., 2011). As soluções irrigadoras possuem um papel fundamental na desinfecção primária, sendo as mais utilizadas nesse protocolo o hipoclorito de sódio (NaOCl), a clorexidina (CHX) e o Ácido Etileno Diaminotetracético (EDTA).

Os relatos demonstram a utilização do hipoclorito de sódio em diferentes concentrações, variando de 1% a 6% (KONTAKIOTIS et al., 2015). O NaOCl é a solução irrigadora mais utilizada em tratamentos endodônticos, devido a sua capacidade antimicrobiana e dissolução de matéria orgânica (ESTRELA et al, 2002), porém, alguns estudos demonstram que a mesma é considerada citotóxica para células tronco da papila apical (TREVINO et al., 2011) sendo que quanto maior a sua concentração, menor a sua biocompatibilidade (VOUZARA et al., 2016).

A clorexidina também apresenta propriedades antimicrobianas, além de possuir efeito residual (GREENSTEIN; BERMAN; JAFFIN, 1986). As concentrações utilizadas nos protocolos de revascularização assumem valores de 0,12%, 0,2% e 2% (KONTAKIOTIS et al., 2015). Em relação à citotoxicidade, estudos também demonstram que a clorexidina possui efeito citotóxico. (BONACORSI; RADDI; CARLOS, 2004; VOUZARA et al., 2016), além de não ser capaz de dissolver tecido orgânico (NAENNI; THOMA; ZEHNDER, 2004).

Além dessas substâncias irrigadores é necessário fazer o uso de um agente quelante, sendo o EDTA o mais utilizado. Devido à sua ação quelante, sugere-se que o mesmo, ao entrar em contato com a dentina, seja capaz de liberar fatores de crescimento presente na matriz dentinária que servem como sinalização para a diferenciação celular (GRAHAM et al., 2006). Além disso, é capaz de reverter parcialmente os efeitos deletérios da solução de NaOCl em altas concentrações na sobrevivência e diferenciação de SCAPs (Martin et al, 2014).

Baseado em uma série de estudos publicados nos últimos anos, a

Associação Americana de Endodontia (AAE) estabeleceu um protocolo padrão atualizado em 2018 para auxiliar os clínicos. Entretanto, a AAE sugere que essas considerações devem ser apenas uma possível fonte de informação e em função da rápida evolução deste campo, os profissionais devem atualizar-se e estar atentos aos novos resultados advindos das pesquisas executadas. Após os procedimentos prévios de anestesia e isolamento absoluto, o protocolo propõe inicialmente a realização da irrigação abundante com NaOCL, em baixa concentração, como 1,5%, seguida pela irrigação com soro fisiológico ou EDTA, com a ponta da agulha posicionada cerca de 1mm aquém do final da raiz, minimizando os efeitos citotóxicos para as células troncos presentes nos tecidos apicais. Depois, realiza-se a secagem do canal radicular e a inserção da pasta de hidróxido de cálcio ou da pasta tri-antibiótica na concentração 1:1:1 de Metronidazol, Minociclina e Ciprofloxacina. Eles ainda consideram a utilização da pasta dupla antibiótica, sem a minoniclina. Por último se faz o selamento com um material restaurador temporário e aguarda-se de 1 a 4 semanas. Na segunda consulta observa-se a resposta ao tratamento, se houver sinais ou sintomas de infecção persistente, pode se considerar um tempo de tratamento adicional com os antibióticos. Se a resposta for favorável, a anestesia é feita com mepivacaína 3% sem vasoconstritor e depois o isolamento absoluto é realizado. Inicia-se pela irrigação com 20ml de EDTA 17%, seguida pela secagem do canal. Realiza-se o sangramento no interior do canal, pela sobre-instrumentação ultrapassando 2mm do forame apical, com o objetivo de se ter o canal inteiro preenchido por sangue, até a região da junção cimento-esmalte. Outra alternativa para a obtenção do coágulo sanguíneo é a utilização do plasma rico em plaquetas, ou a fibrina rica em plaquetas ou ainda a matriz de fibrina autóloga.

Depois, se necessário, coloca-se uma matriz reabsorvível sobre o coágulo sanguíneo e realiza-se o capeamento com MTA, seguido pela inserção de ionômero de vidro. Como o MTA tem sido associado à alteração de cor, pode-se utilizar como alternativa o Biodentine. É necessário realizar a preservação clínica e radiográfica, sendo a eliminação de sintomas e a saúde óssea o objetivo primário de sucesso. Como objetivo secundário, espera-se o aumento da espessura das paredes dentinárias e o desenvolvimento

radicular e, por fim, a resposta positiva ao teste de sensibilidade pulpar.

Com a intenção de aumentar a penetração dos irrigantes no canal radicular e nos túbulos dentinários, surfactantes podem ser adicionados à solução irrigadora (LUI, KUAH, CHEN, 2007). Uma nova formulação de irrigante chamada SmearClear (SybronEndo, Orange, CA) foi introduzida ao mercado, essa solução também possui ação quelante e contém na sua composição, EDTA 17%, cetramida e propriedades adicionais de surfactantes, sendo indicado para remoção da *smear layer* e limpeza final do canal radicular (DA SILVA et al., 2008). Sabe-se que uma maior penetrabilidade depende de uma baixa tensão superficial, por isso o objetivo da adição de surfactantes é reduzir essa tensão superficial, resultando em uma melhor eficiência de limpeza (CAMERON, 1986).

O QMix® 2 in 1 (Dentsply, Tulsa, EUA) também é uma recente solução irrigadora e é composta pela associação do EDTA, da Clorexidina e do detergente Cetramida (MA et al., 2011). Essa combinação tem como objetivo a remoção da *smear layer* e efeito antimicrobiano adicional. Estudos demonstram que o QMix é tão eficaz quanto o EDTA a 17% na remoção da *smear layer* (STOJICIC et al., 2012), sem causar erosão dentinária (BALDASSO et al., 2017)

Ambas as novas soluções irrigadoras apresentam efeitos desejáveis e promissores para o protocolo de revascularização e não há estudos que avaliem os seus efeitos nesse tipo de tratamento. Na literatura ainda há inúmeras variações do protocolo de revascularização, principalmente no que diz respeito aos materiais utilizados e às suas concentrações (KONTAKIOTIS et al., 2015). Apesar da sugestão da AAE, até o momento não há um consenso na literatura de qual seria o melhor protocolo de irrigação a ser utilizado.

O irrigante ideal para procedimentos de revascularização endodôntica deve ser capaz de ter ação desinfetante e ao mesmo tempo permitir a sobrevivência das células responsáveis pelo processo de revascularização (SCOTT et al., 2018). A viabilidade das células tronco é essencial para que ocorra a proliferação e a diferenciação para o desfecho do tratamento. (WIDBILLER; ALTHUMAIRY; DIOGENES, 2019). Além disso, as soluções

irrigadoras são utilizadas dentro dos canais radiculares e estudos demonstram que o efeito citotóxico dos irrigantes pode ser neutralizado pela dentina (HAAPASALO et al., 2007). Entretanto, até o momento, poucos estudos que avaliam o efeito dessas soluções sobre as células consideram esse aspecto.

Sendo assim, é válido utilizar esse modelo experimental, utilizando as células da papila dentária para avaliar o uso de irrigantes no tratamento de revascularização, visto que essas células estão diretamente envolvidas no processo de reparo (SONOYAMA et al., 2008; HUANG et al., 2008).

Por se tratar de um tratamento recente, ainda há diversas dúvidas existentes que precisam ser esclarecidas através da realização de novas pesquisas, visando atingir o melhor resultado de tratamento possível. Estudos utilizando ensaios com culturas celulares são comumente aplicados para avaliar os mecanismos envolvidos em diferentes respostas biológicas e investigar o comportamento celular em situações específicas. Embora os resultados não possam ser imediatamente utilizados em humanos, eles são clinicamente relevantes, pois representam um modelo básico apropriado para avaliar diferentes propriedades dos materiais e seus potenciais riscos para a saúde.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do Hipoclorito de Sódio associado ao EDTA, Hipoclorito de Sódio associado ao Smear Clear e do QMix® 2 in 1 como possíveis irrigantes para o protocolo de revascularização, por meio de ensaios *in vitro* em cultura de células primárias obtidas da papila apical humana e em linhagem celular endotelial.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1 Avaliar a citotoxicidade das soluções irrigadoras em diferentes concentrações e períodos por meio do ensaio de SRB.

3.2.2 Avaliar o efeito das soluções irrigadoras em diferentes concentrações e períodos no índice da polaridade celular.

3.2.3 Avaliar o efeito das soluções irrigadoras em diferentes concentrações e períodos na migração celular por meio do ensaio de *time-lapse*.

3.2.4 Avaliar o efeito das soluções irrigadoras em diferentes concentrações e períodos no efeito angiogênico por meio do ensaio de tubulogênese, associado ao ensaio de SRB em células endoteliais (HUVEC).



#### **4. ARTIGO CIENTIFÍCO**

##### **Cytotoxic, migration and angiogenic effects of irrigation protocols for revascularization: a study in endothelial and apical papilla cells.**

Marina Aspesi<sup>1</sup>, Mariana Castello de Carvalho Deluca<sup>1</sup>, Bibiana Franzen Matte<sup>1</sup>, Luiza Meurer Brand<sup>1</sup>, Patrícia Maria Poli Kopper Móra<sup>1</sup>, Fabiana Soares Grecca<sup>1</sup>, Luciano Casagrande<sup>1</sup>, Roberta Kochenborger Scarparo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil.

##### **Correspondence to:**

Roberta Kochenborger Scarparo

School of Dentistry, Federal University of Rio Grande do Sul.

Rua Ramiro Barcelos, 2492. Porto Alegre, Brazil.

E-mail address: [roberta.scarparo@ufrgs.br](mailto:roberta.scarparo@ufrgs.br)

Phone: +55 (51) 3308 5023

**Abstract**

**Introduction:** Intracanal chemical disinfection is an important step of revascularization procedures and should promote both antimicrobial activity and maintenance of cell viability. Various irrigation protocols have been suggested to establish more predictable outcomes. In the present study the effects of sodium hypochlorite associated with EDTA (NaOCL/EDTA) and of alternative irrigating protocols - NaOCL associated with SmearClear and QMix - were evaluated in a cell culture model. **Methods:** Three roots of mandibular first premolars had their length and root canal diameter standardized to simulate the anatomical features of immature teeth. The irrigant protocols were performed in the standardized roots to allow the contact of irrigant solutions with dentin, using concentrations of 0.1, 0.5 and 1%. The resulting solutions were used to evaluate cytotoxicity, polarization index, migration speed and directionality of cells from the apical papilla. Moreover, the cytotoxicity and angiogenic effect of these solutions on endothelial cell spreading was analyzed. **Results:** NaOCL/EDTA group promoted lower cytotoxicity, greater migration speed and longer migration distance of cells from the apical papilla migration compared to other groups, especially at the concentration of 0.1% ( $p < 0.5$ ). Also, endothelial cells treated with NaOCL/EDTA showed better results regarding to the angiogenic effect ( $p < 0.5$ ). **Conclusions:** NaOCL/EDTA presented more favorable biological response of cells involved in the revascularization outcome. In addition, the irrigant solutions concentrations affect cellular responses. Based on the results of the present study and in the current available data, the use of NaOCL/EDTA should still be considered as the first irrigating protocol option for revascularization procedures.

**Key words:** root canal irrigants; endodontic regeneration; cytotoxicity; cell migration; angiogenesis

## Introduction

Immature permanent teeth with pulp necrosis are a major challenge for clinicians. Traditional treatment options, such as apexification, result in fragile roots and high tooth loss rates (1). Revascularization procedures have been considered the first treatment option for non-vital immature teeth (2-3), aiming to enable root development and strengthening (4-5). However, the predictability of this treatment option should be improved (6-7).

Considering the anatomical peculiarity and the need to retain stem cell viability, chemical disinfection should be optimized in the endodontic treatment of immature teeth, and variations on the disinfection protocol have been suggested (8). Sodium hypochlorite (NaOCl) has been preferred due to its antimicrobial and tissue dissolution abilities (9-12). The American Association of Endodontists (AAE) protocol (2), recommends that a concentration of 1.5% be employed in conjunction with ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), aiming to reduce NaOCl toxicity against stem cells from apical papilla (SCAPs) (13). Due to its chelating action, it is also suggested that EDTA is capable of releasing dentin matrix growth factors helping on cell differentiation signaling (14). However, the use of NaOCl can be toxic to SCAPs (15) and, if extruded to periapical tissues, it can cause pain and morbidity (16). Chlorhexidine (CHX) has been also suggested due to its antimicrobial properties and residual effect (17), but it highly affected cell viability of SCAPS (18) as well.

Due to the capacity of improving dentinal tubules penetration (19-21) and cleaning efficiency (20,22-23), the use of endodontic irrigants that combine antimicrobial properties with chelating and surfactant agents should be considered for the endodontic treatment of immature teeth. Within this context, QMix™ (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK, USA) - comprised CHX, EDTA, and cetrimide - and SmearClear (SybronEndo, Orange, CA, USA) - a 17% EDTA solution containing cetrimide - could be alternatives. Some studies have evaluated these solutions on cell culture viability, but the influence of dentin was not considered (24-27). Besides, the effect of these materials on cell migration and in the angiogenesis has yet to be studied.

The aim of this study was to evaluate the effects of various concentrations of 1.5% NaOCl/17% EDTA; 1.5% NaOCl/SmearClear and QMix on apical papilla cells survival, morphology and migration using a dentin model that simulates an immature tooth. Moreover, the angiogenic effect of these solutions on endothelial cell spreading was assessed.

## **Materials and methods**

### ***Ethics considerations***

The protocol of this research was approved by the Cientific Committee (n° 36239) and by the Research Ethics Committee (n° 3.110.390/2019) of Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, Brazil.

### ***Cell culture***

Apical papilla cells were obtained by two donors. The cells were collected via apical opening from third molars presenting incomplete root development and stored in a culture dish (35x10 mm; TPP - Techno Plastic Products, Zollstrasse, Trasadingen, Swiss) containing Minimum Essential Medium Eagle - Alpha Modification ( $\alpha$ -MEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco, Grand Island, NY, USA) and 1% penicillin and streptomycin (P/S, Gibco). The tissues were sectioned into fragments of approximately 1 mm<sup>3</sup> and kept in an incubator at 37°C, 100% humidity and 5% CO<sub>2</sub>. Culture medium was changed 24h after the tissue collection and every 48h to obtain explants of the cells. After 90% confluency, successive passages were prepared for cellular expansion, and the experiments were performed between the fourth (P4) and the eighth (P8) passage. All the experiments were conducted in three independent times. During this whole period, the cells were incubated in a 37°C humidified and 5% CO<sub>2</sub> environment.

Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were obtained from American Type Culture Collection (ATCC) and were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 10% FBS containing 1% penicillin and streptomycin in an incubator at 5%, CO<sub>2</sub>, 37°C and 100% humidity.

### ***Exposure to Irrigants***

To simulate a clinical situation, three roots of mandibular first premolars with a standardized length of 13mm were used. The root canal was enlarged to the foraminal end with a Peeso drill (# 4), simulating the morphology of immature teeth. The roots were fixed in falcon tubes (TPP) using a rubber dam and a rubber O-ring (Ø 0.8 cm).

Three irrigating protocols, i.e 1.5% NaOCl/EDTA (NaOCl/EDTA), 1.5% NaOCl/SmearClear (NaOCl/SC) and QMix were compared. Each root was used for one experimental group. Root canals were irrigated with 20 ml of each irrigating solution. Immediately before each experiment, the resulting solutions were diluted in media in the following concentrations: 1%, 0.5%, 0.1%. The cells were placed in contact either with the non-exposed media (control) or to the media exposed to different concentrations of the irrigants. Different exposure periods were evaluated in order to analyze the time dependence effect.

### ***Apical papilla cells assays***

#### ***Cytotoxicity assay***

Cytotoxicity was assessed by sulforhodamine B (SRB, Sigma-Aldrich). For SRB evaluation, apical papilla cells were seeded in 96-well plates (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) at a cell density of  $5 \times 10^3$  cells per well, exposed to different concentration of the irrigants (1%, 0.5% and 0.1%). The cytotoxicity effect of the irrigation solutions on the apical papilla cells was evaluated after 1, 24 and 72h. Additionally, an exposure period of 1h, followed by 24h in contact with unexposed media was evaluated to verify the residual effect of irrigants. After each experimental period, 50 µL of a 50% trichloroacetic acid solution (Sigma-Aldrich) were added, followed by incubation for 1h at 4°C. The wells content were removed and 50 µL of SRB dye (0.4%) were added in each well for 30 minutes. The plate was washed with 1% acetic acid solution (Sigma-Aldrich) and 100 µL of Trizma Base (10mM) (Sigma-Aldrich) were added to solubilize the colorimetric product. The optical densities of the solutions were measured in a spectrophotometer (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, MA, USA) at 560 nm wavelength.

The SRB absorbance readouts were normalized with the absorbance of the control group ( $\alpha$ -MEM) and represented the activity of the viable cells.

### ***Polarity index assay***

Apical papilla cells were plated in 6-well plates (Kasvi, Curitiba, PR, Brasil) at a cell density of  $2,5 \times 10^4$  cells per well, exposed to the same different concentration of the irrigants (1%, 0.5% and 0.1%). The effect of irrigation solutions on cells polarity was evaluated after 1, 24 and 72h. Additionally, an exposure period of 1h, followed by 24h in contact with unexposed media was evaluated to verify the residual effect of irrigants. Images were captured in a microscope (Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) with a charge coupled device camera (AxioCam mrm, Zeiss) using a 10X objective (Eclan-Neofluar 10x/0.3 aperture, Zeiss-) and AxioVision Software (Zeiss-). The polarity index (PI) was calculated as the length of the main migration axis (parallel to the direction of movement) divided by the length of the perpendicular axis that intersects the center of the nucleus of the cell (28). Over 200 cells were randomly analyzed, using the software ImageJ. ([http://rsb.info.nih.gov/ij\[B2\]](http://rsb.info.nih.gov/ij[B2])).

### ***Migration assay***

Cells were plated on collagen-coated dishes ( $5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) at a density of  $2,5 \times 10^4$  cells per well and maintained at the incubator for 4 hours to promote cell attachment. Then, different concentration of the irrigants were added to the cells and maintained in contact for 1 or 24h. After the exposure time of 1h, the cells were maintained in contact with unexposed media for 24h aiming to evaluate the residual effect of irrigation protocols.

For long-term migration, time-lapse images were captured in a microscopy at 10 min intervals for 24 hours (Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) with heat control ( $37^\circ\text{C}$ ) and a charge coupled device camera (AxioCam mrm, Zeiss) using a 10X objective (Eclan-Neofluar 10x/0.3 aperture, Zeiss-) and AxioVision Software (Zeiss-).

Migrating cells were tracked using the software ImageJ updated with the plugin Manual Tracking. From these data, the migration velocity as total distance of migration ( $\mu\text{m}$ ) per hour was calculated. For the directionality analysis, a polar plot graph was constructed, which represents the spatial

trajectory developed by each migratory cell, where the X and Y coordinates of each cell trajectory were normalized to start at a virtual ( $X = 0$  and  $Y = 0$ ) position.

## **HUVEC Assays**

### ***Cytotoxicity and Sprouting assay***

For sprouting assay, the protocol of Koh et al, 2008 (29) was adapted. HUVEC cells at a density of  $3 \times 10^4$  cells per well were plated in low adhesive 96-well plate containing 1.5% low melting agarose (Sigma) with regular culture media and under standard humidified conditions ( $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$ ) for 48h to stimulate spheroid formation. For analysis of endothelial cell spreading, spheroids were transferred to a rat-tail collagen-based 3D matrix (1.8 mg/ml) with the irrigants diluted in the media. The effect of irrigants on HUVECs were evaluated after 1h followed by 96h in contact with unexposed media and 96h in contact with the exposed media. After collagen polymerization (30 min), spheroids were imaged at 0, 24, 48, 72 and 96h using a Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) with a charge coupled device camera (AxioCam mrrn, Zeiss) using a 4X objective (Eclan-Neofluar 10x/0.3 aperture, Zeiss-) and AxioVision Software (Zeiss-). The perimeter of spheroids was measured by ImageJ software, as previously described. It was calculated the ratio of the treated spheroids after 96h by the original spheroids (24h).

Also, the SRB assay was performed with HUVECs, as previously described. Cells were exposed to the irrigants during 1h, followed by 24h in contact with unexposed media.

### ***Statistical analysis***

All the experiments were conducted and analyzed in triplicate. Data were analyzed using Graph Pad Prism 5.0 version software (Graph Pad, La Jolla, CA). The normality of the data was analyzed by Kolmogorov-Smirnov. Data were analyzed by ANOVA followed by Bonferroni *post hoc* test ( $p < .05$ ). Results were expressed as mean  $\pm$  SD (standard deviation). Different lowercase letters represent the groups' statistical differences when comparing the same concentrations (e.g. NaOCL/EDTA 1% vs NaOCL/SC 1%). Different capital letters represent the statistical differences among the

concentrations within each group (e.g. NaOCL/EDTA 1% and NaOCL/EDTA 0.5% concentrations).

## **Results**

### ***Apical papilla cells cytotoxicity assay***

SRB assay showed that after 1h, 0.1% NaOCL/EDTA, 0.1% and 0.5% NaOCL/SC and 0.5% QMix presented similar viability rate of cells from the apical papilla compared to the control ( $p < .05$ ) (Figure 1A). After 1h+24h, NaOCL/SC showed a dose dependent significant decrease in cell viability ( $p < .05$ ) and, at the concentration of 1%, presented lower cell viability compared to the other groups and among the different concentrations (Figure 1B). Dose dependent cytotoxic effects were observed for all irrigants after 24h ( $p < .05$ ). At this period, only the 0.1% NaOCL/EDTA was similar to control ( $p < .05$ ) (Figure 1C). After 72h, apical papilla cells viability was highly decreased in all experimental groups, presenting significantly lower rates compared to the control, regardless of irrigants concentrations ( $p < .05$ ). In this period, NaOCL/EDTA protocol showed higher rates of cell viability compared to the other groups ( $p < .05$ ), except with NaOCL/SC at 0.5% concentrations and QMix at 1% concentrations. Moreover, at 72h within NaOCL/EDTA group, the concentration of 0.1% promoted the highest cell viability ( $p < .05$ ) (Figure 1D).

### ***Polarity index assay:***

Cell polarization was affected in a dose and time dependent manner, regardless of the irrigating protocol and solution concentration. Shorter exposure periods maintained elongated cell morphology (similar to the control group), while longer exposure periods promoted greater number of round cells (Figure 2). Decreased fraction of elongated cells was mainly observed in the NaOCL/SC and QMix groups from the 24h exposure period (Figure 2C-D).



### ***Migration velocity and directionality assay***

Migration speed was lower for all irrigation protocols compared to the control, regardless of the experimental period, except for 0.1% NaOCL/EDTA after 1h of cells exposition ( $p < .05$ ) (Figure 3A). At 1h + 24h, at the 0.1% concentration, all groups presented similar migration speed ( $p > 0.5$ ), except NaOCL/EDTA and NaOCL/SC at the concentration of 0.5% ( $p < 0.5$ ). Dose dependent migration speed was observed for all groups after 24h ( $p < .05$ ) (Figure 3A). 0.1% NaOCL/EDTA showed higher migration speed compared to other groups after 24h of cells exposition. ( $p < .05$ ) (Figure 3A).

At 0.5% concentration, migration directionality was severely impacted by the period of irrigants exposition, regardless of the experimental group. Longer periods of cells exposition decreased distance of cell migration, especially in the NaOCL/SC and QMix groups. At a lower concentration (0.1%), the longer period of irrigants exposure to cells (24h) allowed higher migration trajectory, compared to the 0.5% concentration at the same period, in all the groups (Supplementary Figure 1). NaOCL/EDTA showed longer migration trajectory compared to other groups in both concentrations and periods evaluated (Figure 3B and Supplementary Figure 1).

### ***Endothelial cells cytotoxicity assay***

NaOCL/EDTA and QMix promoted cell viability rates similar to those observed for the control group, regardless of its concentration ( $p < .05$ ). NaOCL/SC was similar to the control group only at the concentration of 0.1%. ( $p < .05$ ).

### ***Endothelial cells sprouting assay***

Sprouting assay analyzes revealed that endothelial cells treated with NaOCL/EDTA showed a higher migration distance into a three dimensional (3D) matrix compared to NaOCL/SC and QMix, regardless of its concentration and experimental period ( $p < .05$ ). At the concentration of 0.1%, NaOCL/EDTA presented similar outcomes compared to the control group in both exposure periods. At the concentration of 0.5% NaOCL/EDTA was similar to control group only in the 1h + 96h period ( $p < .05$ ).

## Discussion

To establish more predictable protocols for revascularization procedures, the influence of single steps of this treatment modality has to be evaluated. In this regard, root canal irrigation and dentin pretreatment are of paramount importance for the clinical outcomes. Ideal irrigation protocols should promote disinfection, while favoring stem cell viability and angiogenesis (18). Thus, the present investigation evaluated the effects of various concentrations of NaOCL/EDTA and of alternative irrigating protocols (NaOCL/SC and QMix) on apical papilla cells viability, morphology and migration and on endothelial cells viability and sprouting.

It is well known that antimicrobial and chelating agents must be associated in cases of revascularization (5). Therefore, NaOCL was associated either with EDTA or SC. Since the formulation of QMix already comprises an antimicrobial (CHX) and a chelating agent (EDTA) it was used as a single irrigant solution. Previous studies also tested this irrigating solution as the only irrigant (20,24), although the manufacturer recommended it as final irrigation.

An experimental model simulating the morphology of immature teeth was used to assess the irrigating protocols effects on cell viability and behavior, considering their interaction with dentin. In this regard, it is well established that EDTA treatment – which is part of the three irrigating protocols tested herein - promotes the release of dentin-derived growth factors related to cell survival, proliferation and differentiation (30-34), including transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), bone morphogenetic protein 2 (BMP2), and angiogenic factors such as platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), and fibroblast growth factor 2 (FGF2) (31,33,35).

The cytotoxic effect of irrigants in different concentrations and exposure periods was assessed by SRB colorimetric assay. SRB presents advantages in comparison to other methods that evaluate cytotoxicity, such as better predictive power (36). The present outcomes showed that the three irrigant solutions have dose and time dependent effects on apical papilla cells viability. It was observed a significant reduction after 72 hours of treatment

compared to the control group. Moreover, NaOCL/EDTA generally promoted the highest rates of cell viability amongst the tested irrigation protocols. Aiming to simulate clinical reality, the residual effect of the irrigating protocols on cell viability was also assessed. As shown, NaOCL/SC presented a residual effect, since the cell viability highly decreased in the 1h+24h compared to 1h period.

Amongst the three tested concentrations and the three irrigants solutions evaluated, 0.1% NaOCL presented the least cytotoxic effect. The irrigating solutions were diluted to various concentrations unlike from the clinical situation, because *in vitro* cultured cells are more susceptible to drugs toxic effects than the *in vivo* periapical tissue (37), since the cultured cells are isolated, without taking into account the host defense mechanism for detoxification (24). In the clinical situation, the drugs are not so irritating as in the cytotoxicity studies, because blood channels, the lymph system and the phagocytic cells helps to dilute the drugs (38).

Probably, NaOCL/SC and QMix cytotoxic effect is related to the presence of cetrimide in their composition. Cetrimide is a quaternary ammonium disinfectant that presents cytotoxic (39), and proinflammatory (27) effects. As a matter of fact, it has been demonstrated that cellular membrane integrity and cell morphological features are significantly affected by cetrimide (39), and that cell permeability is potentiated when quaternary ammoniums are used combined with EDTA (40). Also in agreement with the present study, other investigations observed dose and time-dependent deleterious effects of cetremide on cell culture (39).

Moreover, the cytotoxicity of CHX, present in QMix solution, has been previously demonstrated (41-43). Although the concentration of CHX present in QMix is not disclosed by the manufacturer, it is possible that CHX substantivity interferes with the binding of SCAP cells to the extracellular dentinal matrix, leading indirectly to a decrease in cellular viability (15).

Especially for revascularization procedures, cell migration ability should directly influence the clinical decision for an irrigation protocol. In this regard, the irrigants used during treatment should favor migration by means of providing the release of chemotactic factors included in the recruitment of apical papilla cells. In the current study, changes in cell morphology were

assessed in conjunction with migration velocity and directionality assays to evaluate migration capacity. Apical papilla cells morphological features were analyzed by the polarity index, which has been reported to indicate the state of migration cells, being cells with higher indexes more prone to migration (28). Higher concentrations of irrigants and longer exposure periods induced loss of cell polarization. Polarity index were mainly decreased in NaOCL/SC and QMix groups, showing a greater cell size reduction.

To confirm the migratory ability, migration speed and directionality by a time-lapse assay were evaluated. All experimental groups had the migration speed decreased compared to the control group, except for 0.1% NaOCL/EDTA after 1h of cells exposition. Also, the longest exposure time, severely impacted migration directionality in all groups. In 24h, the NaOCL/EDTA showed the higher migration speed and longer distance of cell migration compared to other groups in both concentrations.

The effects of EDTA on cell migration has been previously demonstrated and is associated to its capacity of favoring the release of a variety of endogenous growth factors from dentine (44). On the other hand, chemotactic factors released from the blood clot are also included in the recruitment of SCAPs (45), which could not be evaluated through the experimental model adopted herein and can be considered a limitation of the present study. For the clinical outcome of root canal development as a consequence of the revascularization protocol it is necessary that the cells migrate to the root canal to allow cell differentiation (44). In this regard directionality assay provided information related to the distance of cell migration, but was not capable to demonstrate differences regarding cell trajectory direction in the model adopted herein.

Since the blood clot is one of the steps in the revascularization protocol, a spheroid-based angiogenesis assay was performed with endothelial cells. In this regard, it is well established that models that mimic capillary sprouting *in vitro* are important tools to investigate developmental blood vessel formation (46). Sprouting assay provides a sensitive and versatile tool to study the impact of pro and antiangiogenic determinants on multiple steps of the angiogenic cascade (47). Heiss et al., 2015 (47) concluded that this method supports the formation of tip cells that precede the

elongation of individual capillary-like sprouts originating from single spheroids. The current results showed that the NaOCl/EDTA group had the highest migration distance into a three dimensional (3D) matrix and it was similar to the control group in both concentrations in 1h and in the 0.1% concentration after 96h treatment. In contrast, the NaOCl/SC and QMix groups were different to control group in both concentrations and exposure periods, even in 1h hour of contact, demonstrating that they might negatively impact in the angiogenesis process *in vivo*.

Considering the aforementioned, NaOCl/EDTA presented more favorable biological response of cells involved in the revascularization outcome, compared to NaOCl/SC and QMix. In addition, the irrigant solutions concentrations affect cellular responses. The use of low concentrations of NaOCl/EDTA still should be considered as the first irrigating protocol option for revascularization procedures. Further *in vivo* studies should be performed to evaluate clinical conditions that could not be represented in cell culture.

## References

1. 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;8(2):45-55.
2. American Association of Endodontists. AAE clinical considerations for a regenerative procedure. Available at: [https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo\\_AsOfApril2018.pdf](https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf)
3. Galler KM, Krastl G, Simon S, Van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, et al. European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *Int Endod J.* 2016;49(8):717-23.
4. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics.* 2013;28(1):2-23.
5. Galler KM. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *Int Endod J.* 2016;49(10):926-36.
6. Kahler B, Mistry S, Moule A, Ringsmuth AK, Case P, Thomson A, et al. Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. *J Endod.* 2014;40(3):333-8.
7. Nicoloso GF, Goldenfum GM, Pizzol TDSD, Scarparo RK, Montagner F, de Almeida Rodrigues J, et al. Pulp Revascularization or Apexification for the Treatment of Immature Necrotic Permanent Teeth: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Pediatr Dent.* 2019;43(5):305-13.

8. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakos GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J Endod.* 2015;41(2):146-54.
9. Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod.* 2009;35(5):745-9.
10. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod.* 2008;34(5):611-6.
11. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod.* 2011;37(2):265-8.
12. Zhu W, Zhu X, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhang C. Regeneration of dental pulp tissue in immature teeth with apical periodontitis using platelet-rich plasma and dental pulp cells. *Int Endod J.* 2013;46(10):962-70.
13. Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod.* 2014;40(1):51-5.
14. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials.* 2006;27(14):2865-73.
15. 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;37(8):1109-15.
16. Zhu WC, Gyamfi J, Niu LN, Schoeffel GJ, Liu SY, Santarcangelo F, et al. Anatomy of sodium hypochlorite accidents involving facial ecchymosis - a review. *J Dent.* 2013;41(11):935-48.
17. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology.* 1986;57(6):370-7.
18. Widbillier 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;45(2):156-60.
19. da Silva LA, Sanguino AC, Rocha CT, Leonardo MR, Silva RA. Scanning electron microscopic preliminary study of the efficacy of SmearClear and EDTA for smear layer removal after root canal instrumentation in permanent teeth. *J Endod.* 2008;34(12):1541-4.
20. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J.* 2012;45(4):363-71.

21. Eliot C, Hatton JF, Stewart GP, Hildebolt CF, Jane Gillespie M, Gutmann JL. The effect of the irrigant QMix on removal of canal wall smear layer: an ex vivo study. *Odontology*. 2014;102(2):232-40.
22. Giardino L, Andrade FB, Beltrami R. Antimicrobial Effect and Surface Tension of Some Chelating Solutions with Added Surfactants. *Braz Dent J*. 2016;27(5):584-8.
23. Bolfoni MR, Ferla MoS, Sposito OaS, Giardino L, Jacinto ReC, Pappen FG. Effect of a surfactant on the antimicrobial activity of sodium hypochlorite solutions. *Braz Dent J*. 2014;25(5):416-9.
24. Alkahtani A, Alkahtany SM, Mahmood A, Elsafadi MA, Aldahmash AM, Anil S. Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Oral Health*. 2014;14:27.
25. Farhad Mollashahi N, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Iran Endod J*. 2016;11(4):293-7.
26. Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. Cytotoxicity of Endodontic Irrigants on Human Periodontal Ligament Cells. *Iran Endod J*. 2018;13(3):390-4.
27. Pappen FG, Souza EM, Giardino L, Carlos IZ, Leonardo MR, de Toledo Leonardo R. Endodontic chelators induce nitric oxide expression by murine-cultured macrophages. *J Endod*. 2009;35(6):824-8.
28. Lamers ML, Almeida ME, Vicente-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS One*. 2011;6(8):e22865.
29. Koh W, Stratman AN, Sacharidou A, Davis GE. In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. *Methods Enzymol*. 2008;443:83-101.
30. Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent*. 2007;35(8):636-42.
31. Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol*. 1992;36(4):491-503.
32. Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res*. 1990;5(7):717-23.
33. Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol*. 2000;45(11):1013-6.
34. Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*. 2006;13(7):611-20.

35. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J.* 2000;32(8):489-94.
36. van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8:47.
37. Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod.* 2005;31(10):746-8.
38. Wall GL, Dowson J, Shipman C. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;33(2):230-41.
39. Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(3):642-52.
40. Van Ooteghem M. Les collyres guttae ophthalmicae. Van Ooteghem M eds. *Préparations Ophtalmiques. Technique et Documentation.* 1995;58-110. Lavoisier Paris, France.
41. Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;92(4):446-50.
42. Bonacorsi C, Raddi MS, Carlos IZ. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. *Braz J Med Biol Res.* 2004;37(2):207-12.
43. Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49(8):764-73.
44. Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J.* 2016;49(6):581-90.
45. Fayazi S, Takimoto K, Diogenes A. Comparative Evaluation of Chemotactic Factor Effect on Migration and Differentiation of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod.* 2017;43(8):1288-93.
46. Pfisterer L, Korff T. Spheroid-Based In Vitro Angiogenesis Model. *Methods Mol Biol.* 2016;1430:167-77.
47. Heiss M, Hellström M, Kalén M, May T, Weber H, Hecker M, et al. Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J.* 2015;29(7):3076-84.



## Figures

### Figure Captions:

**Figure 1. Experimental model to simulate the revascularization protocol:** The previously prepared and sterilized root was fixed in a falcon tube (A) to allow solutions to come into contact with dentin during canal irrigation (B); The resulting solution was collected and diluted in culture medium at different concentrations (C).

**Figure 2. Apical papilla cell viability after exposure to irrigants in various concentrations:** Different capital letters represent statistical differences at the same material in different concentrations. Different lowercase letters represent statistical differences between the materials at the same concentration. ( $p < .05$ ).

**Figure 3. Polarization index assay of cells exposure to irrigants:** White lines indicate the main migration axis (parallel to the direction of movement) and intersection the center of the cell used to determine the polarity index of the cells. The picture shows an example of a low polarized (left) and a highly polarized cell – control group. (right), with the indexes evaluated (A). Polarization index changes caused by cells exposure to irrigant protocols after various experimental periods (B-C-D).

**Figure 4. Cell migration speed after the exposure to irrigants analyzed by a time-lapse assay (A).** Different capital letters represent statistical differences at the same material in different concentrations. Different lowercase letters represent statistical differences between the materials at the same concentration. ( $p < .05$ ). **Cell directionality plot after the exposure to irrigants analyzed by a time-lapse assay (B).** Polar plot graphs of the apical papilla cells in the presence of irrigants for different time. Each line represents one migratory cell.

**Figure 5. HUVEC viability after exposure to irrigant protocols for 1+24h. (A).** Different capital letters represent statistical differences at the same irrigant in different concentrations. Different lowercase letters represent statistical differences between the irrigants at the same concentration. ( $p < .05$ ). **HUVEC sprouting assay after the exposure to irrigants for different periods (B).** HUVEC spheroids areas were measured as shown in the picture. Different capital letters represent statistical differences at the same material in different concentrations. Different lowercase letters represent statistical differences between the materials at the same concentration. ( $p < .05$ ).

**Figure 6. Cell directionality plot after the exposure to irrigants analyzed by a time-lapse assay.** Polar plot graphs of the apical papilla cells in the presence of irrigants for different time. Each line represents one migratory cell.

Figure 1.

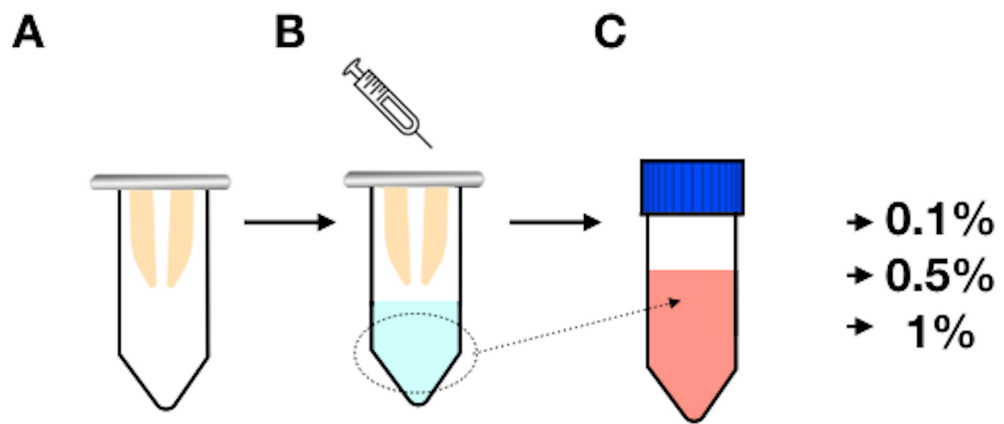




Figure 3.

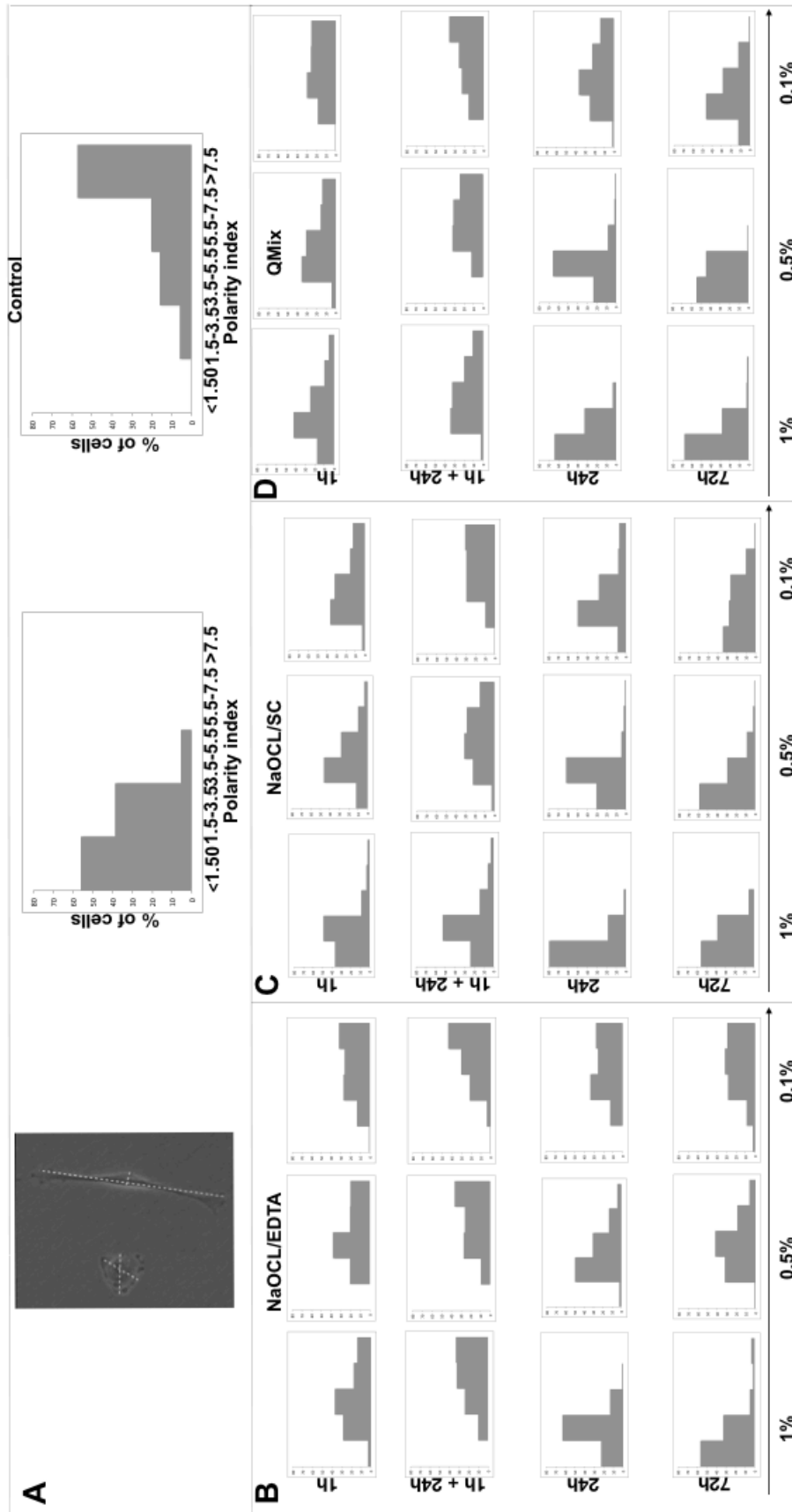


Figure 4.

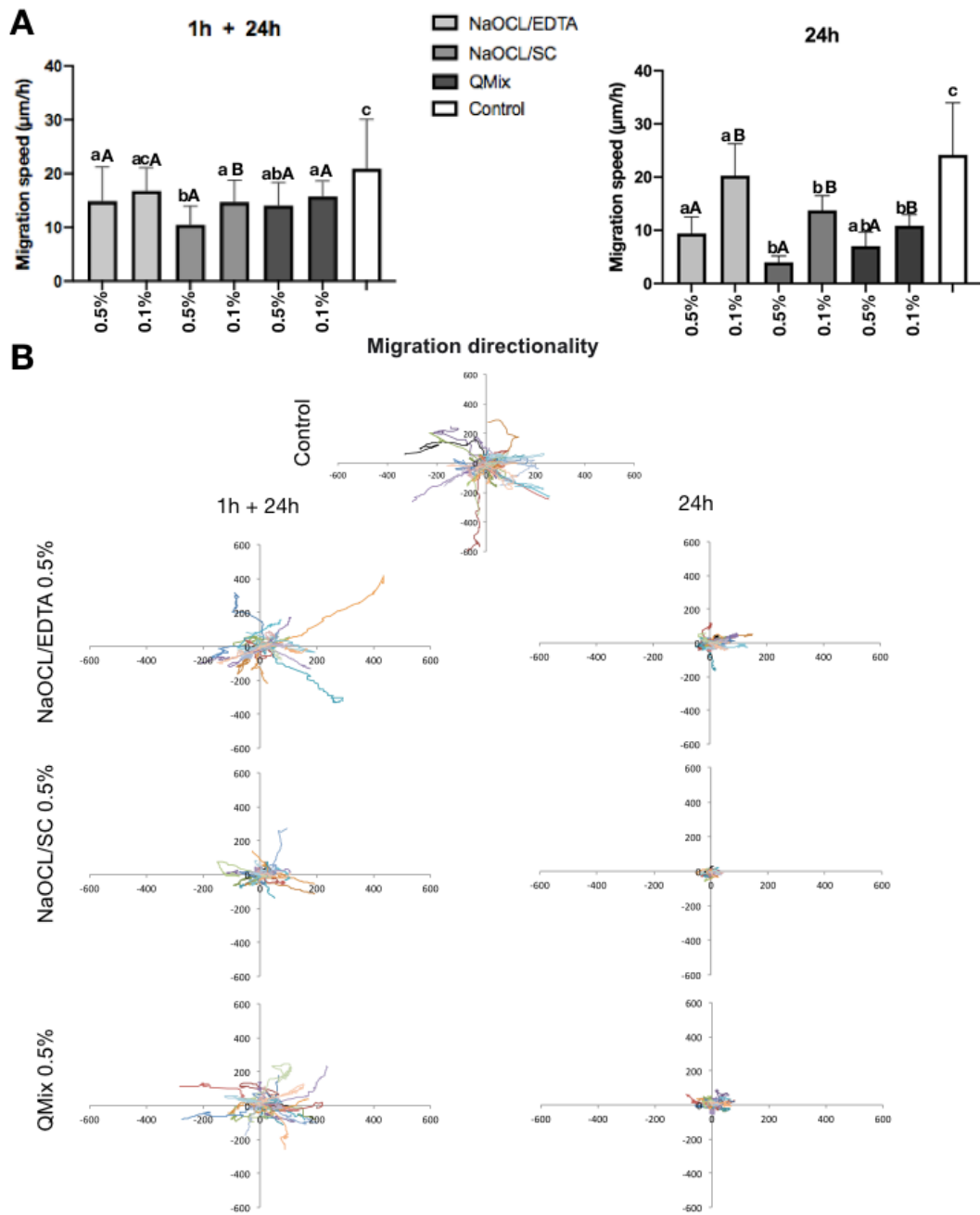


Figure 5.

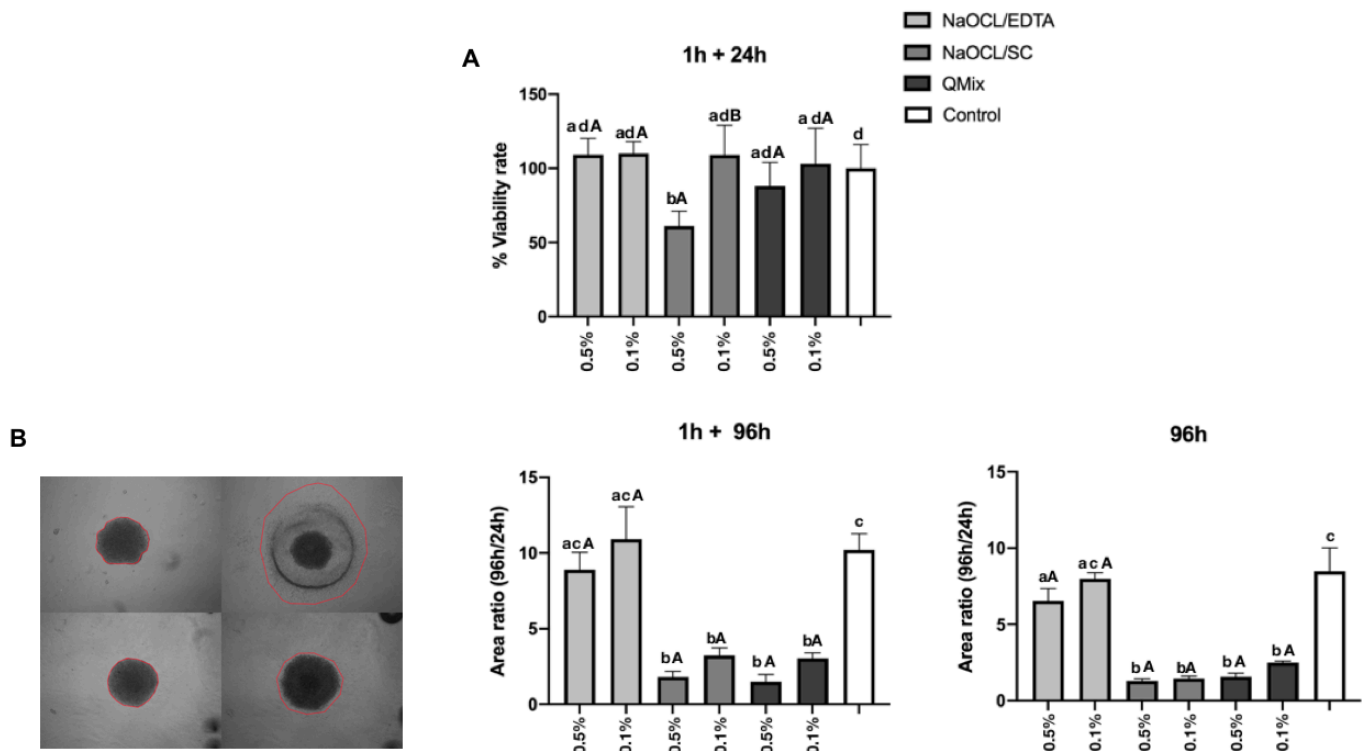
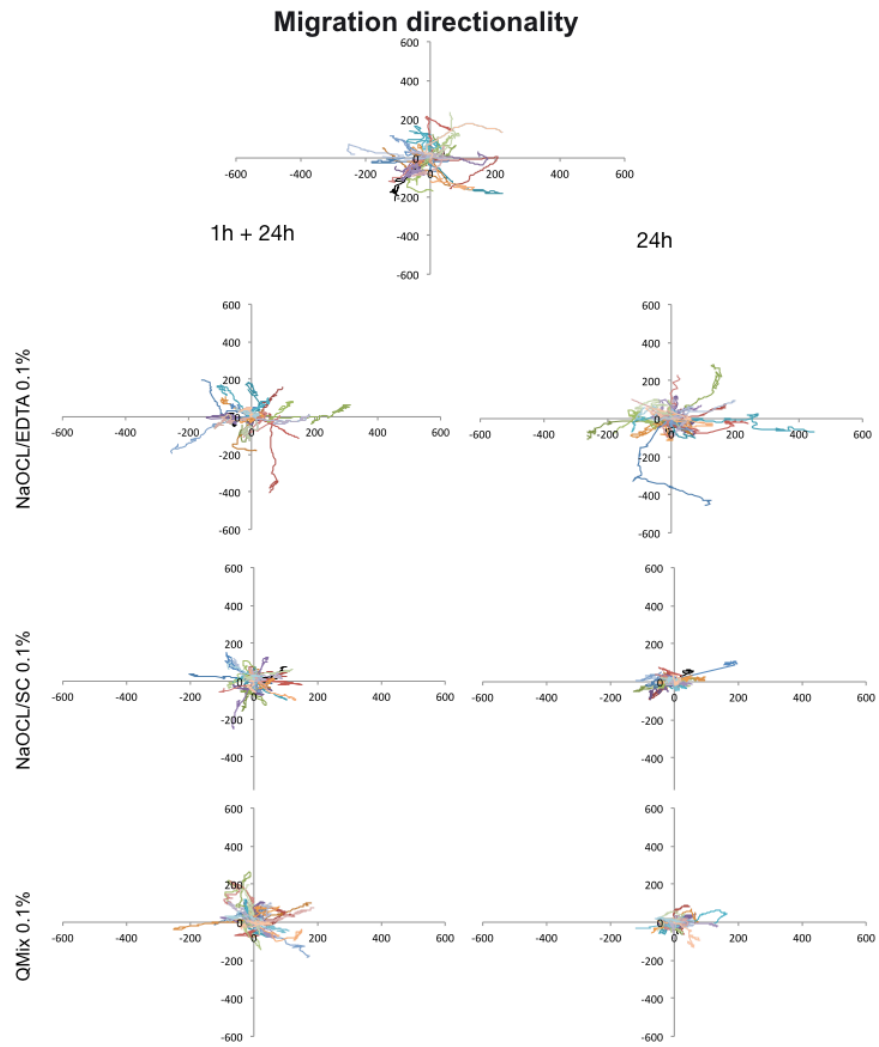


Figure 6.



## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Por ser uma recente modalidade de tratamento com resultados promissores, a revascularização pulpar vem sendo amplamente estudada nos últimos anos. A etapa de desinfecção química, por meio de soluções irrigadoras é crucial para o desfecho clínico desse procedimento. Para que o tratamento tenha êxito, as células envolvidas nesse processo precisam se manter viáveis para que ocorra proliferação, migração e finalmente a diferenciação, permitindo a continuidade da formação radicular. (SONOYAMA et al., 2008; HUANG et al., 2008)

No presente estudo, pode-se concluir que o uso do irrigante Hipoclorito de Sódio associado ao EDTA foi capaz de permitir uma melhor resposta biológica das células avaliadas, em relação à viabilidade, migração e efeito angiogênico. Sendo assim, essas soluções ainda devem ser consideradas para o uso no protocolo de revascularização pulpar.

Além disso, as menores concentrações dos materiais e os menores tempos de exposição dos irrigantes em contato com as células proporcionaram melhores resultados nos experimentos avaliados.

Estudos adicionais envolvendo metodologias, *in vivo*, devem ser realizados para avaliar condições clínicas que não podem ser avaliadas em estudos *in vitro*.



## REFERÊNCIAS

Alkahtani A, Alkahtany SM, Mahmood A, Elsafadi MA, Aldahmash AM, Anil S. Cytotoxicity of QMix™ endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Oral Health*. 2014;14:27.

Almushayt A, Narayanan K, Zaki AE, George A. Dentin matrix protein 1 induces cytodifferentiation of dental pulp stem cells into odontoblasts. *Gene Ther*. 2006;13(7):611-20.

American Association of Endodontists. AAE clinical considerations for a regenerative procedure. Available at: [https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo\\_AsOfApril2018.pdf](https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/06/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf)

Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*. 2002;18(3):134-7.

Baldasso FER, Roletto L, Silva VDD, Morgental RD, Kopper PMP. Effect of final irrigation protocols on microhardness reduction and erosion of root canal dentin. *Braz Oral Res*. 2017;31:e40.

Bègue-Kirn C, Smith AJ, Ruch JV, Wozney JM, Purchio A, Hartmann D, et al. Effects of dentin proteins, transforming growth factor beta 1 (TGF beta 1) and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) on the differentiation of odontoblast in vitro. *Int J Dev Biol*. 1992;36(4):491-503.

Bolfoni MR, Ferla MoS, Sposito OaS, Giardino L, Jacinto ReC, Pappen FG. Effect of a surfactant on the antimicrobial activity of sodium hypochlorite solutions. *Braz Dent J*. 2014;25(5):416-9.

Bonacorsi C, Raddi MS, Carlos IZ. Cytotoxicity of chlorhexidine digluconate to murine macrophages and its effect on hydrogen peroxide and nitric oxide induction. *Braz J Med Biol Res*. 2004;37(2):207-12.

Cameron JA. The effect of a fluorocarbon surfactant on the surface tension of the endodontic irrigant, sodium hypochlorite. A preliminary report. *Aust Dent J*. 1986;31(5):364-8.

Chang YC, Huang FM, Tai KW, Chou MY. The effect of sodium hypochlorite and chlorhexidine on cultured human periodontal ligament cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001;92(4):446-50.

Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod*. 2008;34(5):611-6.

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;8(2):45-55.

da Silva LA, Sanguino AC, Rocha CT, Leonardo MR, Silva RA. Scanning electron microscopic preliminary study of the efficacy of SmearClear and EDTA for smear layer removal after root canal instrumentation in permanent teeth. *J Endod.* 2008;34(12):1541-4.

Das S. Apexification in a nonvital tooth by control of infection. *J Am Dent Assoc.* 1980;100(6):880-1.

Das S, Das AK, Murphy RA. Experimental apexigenesis in baboons. *Endod Dent Traumatol.* 1997;13(1):31-5.

Debbasch C, Brignole F, Pisella PJ, Warnet JM, Rat P, Baudouin C. Quaternary ammoniums and other preservatives' contribution in oxidative stress and apoptosis on Chang conjunctival cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(3):642-52.

Ding RY, Cheung GS, Chen J, Yin XZ, Wang QQ, Zhang CF. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod.* 2009;35(5):745-9.

Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endodontic Topics.* 2013;28(1):2-23.

Eliot C, Hatton JF, Stewart GP, Hildebolt CF, Jane Gillespie M, Gutmann JL. The effect of the irrigant QMix on removal of canal wall smear layer: an ex vivo study. *Odontology.* 2014;102(2):232-40.

Estrela C, Estrela CR, Barbin EL, Spanó JC, Marchesan MA, Pécora JD. Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Braz Dent J.* 2002;13(2):113-7.

Farhad Mollashahi N, Saberi E, Karkehabadi H. Evaluation of Cytotoxic Effects of Various Endodontic Irrigation Solutions on the Survival of Stem Cell of Human Apical Papilla. *Iran Endod J.* 2016;11(4):293-7.

Fayazi S, Takimoto K, Diogenes A. Comparative Evaluation of Chemotactic Factor Effect on Migration and Differentiation of Stem Cells of the Apical Papilla. *J Endod.* 2017;43(8):1288-93.

Finkelman RD, Mohan S, Jennings JC, Taylor AK, Jepsen S, Baylink DJ. Quantitation of growth factors IGF-I, SGF/IGF-II, and TGF-beta in human dentin. *J Bone Miner Res.* 1990;5(7):717-23.

Galler KM. Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *Int Endod J.* 2016;49(10):926-36.

Galler KM, Krastl G, Simon S, Van Gorp G, Meschi N, Vahedi B, et al. European Society of Endodontology position statement: Revitalization procedures. *Int Endod J*. 2016;49(8):717-23.

Galler KM, Widbiller M, Buchalla W, Eidt A, Hiller KA, Hoffer PC, et al. EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. *Int Endod J*. 2016;49(6):581-90.

Giardino L, Andrade FB, Beltrami R. Antimicrobial Effect and Surface Tension of Some Chelating Solutions with Added Surfactants. *Braz Dent J*. 2016;27(5):584-8.

Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith AJ. The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials*. 2006;27(14):2865-73.

Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine: an adjunct to periodontal therapy. *Journal of periodontology*. 1986;57(6):370-7.

Haapasalo M, Qian W, Portenier I, Waltimo T. Effects of dentin on the antimicrobial properties of endodontic medicaments. *J Endod*. 2007;33(8):917-25.

Ham JW, Patterson SS, Mitchell DF. Induced apical closure of immature pulpless teeth in monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1972;33(3):438-49.

Heiss M, Hellström M, Kalén M, May T, Weber H, Hecker M, et al. Endothelial cell spheroids as a versatile tool to study angiogenesis in vitro. *FASEB J*. 2015;29(7):3076-84.

Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod*. 2008;34(6):645-51.

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

Kahler B, Mistry S, Moule A, Ringsmuth AK, Case P, Thomson A, et al. Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. *J Endod*. 2014;40(3):333-8.

Kahler B, Rossi-Fedele G. A review of tooth discoloration after regenerative endodontic therapy. *Journal of endodontics*. 2016;42(4):563-9.

Karkehabadi H, Yousefifakhr H, Zadsirjan S. Cytotoxicity of Endodontic Irrigants on Human Periodontal Ligament Cells. *Iran Endod J*. 2018;13(3):390-4.

- Kim SG. Infection and pulp regeneration. *Dentistry journal*. 2016;4(1):4.
- Koh W, Stratman AN, Sacharidou A, Davis GE. In vitro three dimensional collagen matrix models of endothelial lumen formation during vasculogenesis and angiogenesis. *Methods Enzymol*. 2008;443:83-101.
- Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J Endod*. 2015;41(2):146-54.
- Lamers ML, Almeida ME, Vicente-Manzanares M, Horwitz AF, Santos MF. High glucose-mediated oxidative stress impairs cell migration. *PLoS One*. 2011;6(8):e22865.
- 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;37(2):133-8.
- Lui JN, Kuah HG, Chen NN. Effect of EDTA with and without surfactants or ultrasonics on removal of smear layer. *J Endod*. 2007;33(4):472-5.
- Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M. A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod*. 2011;37(10):1380-5.
- Malheiros CF, Marques MM, Gavini G. In vitro evaluation of the cytotoxic effects of acid solutions used as canal irrigants. *J Endod*. 2005;31(10):746-8.
- Martin DE, De Almeida JF, Henry MA, Khaing ZZ, Schmidt CE, Teixeira FB, et al. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod*. 2014;40(1):51-5.
- Naenni N, Thoma K, Zehnder M. Soft tissue dissolution capacity of currently used and potential endodontic irrigants. *J Endod*. 2004;30(11):785-7.
- Nicoloso GF, Goldenfum GM, Pizzol TDS, Scarparo RK, Montagner F, de Almeida Rodrigues J, et al. Pulp Revascularization or Apexification for the Treatment of Immature Necrotic Permanent Teeth: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Pediatr Dent*. 2019;43(5):305-13.
- Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand*. 1961;19:324-53.
- Pappen FG, Souza EM, Giardino L, Carlos IZ, Leonardo MR, de Toledo Leonardo R. Endodontic chelators induce nitric oxide expression by murine-cultured macrophages. *J Endod*. 2009;35(6):824-8.
- Pfisterer L, Korff T. Spheroid-Based In Vitro Angiogenesis Model. *Methods Mol Biol*. 2016;1430:167-77.

Roberts-Clark DJ, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.* 2000;45(11):1013-6.

Scott MB, Zilinski GS, Kirkpatrick TC, Himel VT, Sabey KA, Lallier TE. The Effects of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla, Including Endocyn. *J Endod.* 2018;44(2):263-8.

Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod.* 2008;34(8):919-25; Discussion 1157.

Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, et al. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod.* 2008;34(2):166-71.

Stojcic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M. Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J.* 2012;45(4):363-71.

Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent.* 2007;29(1):47-50.

Tomson PL, Grover LM, Lumley PJ, Sloan AJ, Smith AJ, Cooper PR. Dissolution of bio-active dentine matrix components by mineral trioxide aggregate. *J Dent.* 2007;35(8):636-42.

Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod.* 2011;37(2):265-8.

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;37(8):1109-15.

Van Ooteghem M. Les collyres guttae ophthalmicae. Van Ooteghem M eds. *Préparations Ophtalmiques. Technique et Documentation.* 1995;58–110. Lavoisier Paris, France.

van Tonder A, Joubert AM, Cromarty AD. Limitations of the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay when compared to three commonly used cell enumeration assays. *BMC Res Notes.* 2015;8:47.

Vouzara T, Koulaouzidou E, Ziouti F, Economides N. Combined and independent cytotoxicity of sodium hypochlorite, ethylenediaminetetraacetic acid and chlorhexidine. *Int Endod J.* 2016;49(8):764-73.

Wall GL, Dowson J, Shipman C. Antibacterial efficacy and cytotoxicity of three endodontic drugs. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1972;33(2):230-41.

Wang Q, Lin XJ, Lin ZY, Liu GX, Shan XL. Expression of vascular endothelial growth factor in dental pulp of immature and mature permanent teeth in human. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 2007;16(3):285-9.

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;45(2):156-60.

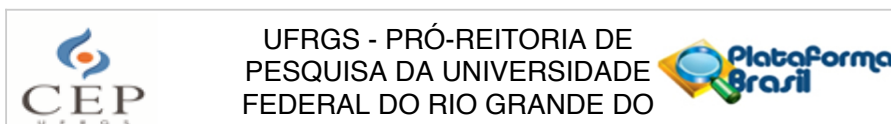
Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J.* 2000;32(8):489-94.

Zhu WC, Gyamfi J, Niu LN, Schoeffel GJ, Liu SY, Santarcangelo F, et al. Anatomy of sodium hypochlorite accidents involving facial ecchymosis - a review. *J Dent.* 2013;41(11):935-48.

Zhu W, Zhu X, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhang C. Regeneration of dental pulp tissue in immature teeth with apical periodontitis using platelet-rich plasma and dental pulp cells. *Int Endod J.* 2013;46(10):962-70.

## ANEXOS

### ANEXO A



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação de soluções irrigadoras no protocolo de revascularização pulpar: estudo em células tronco da papila apical.

**Pesquisador:** Roberta Kochenborger Scarparo

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 04697218.8.0000.5347

**Instituição Proponente:** Faculdade de Odontologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.110.390

##### Apresentação do Projeto:

Trata-se do projeto de pesquisa que tem como pesquisador responsável Roberta Kochenborger Scarparo, intitulado "AVALIAÇÃO DE SOLUÇÕES IRRIGADORAS NO PROTOCOLO DE REVASCULARIZAÇÃO PULPAR: ESTUDO EM CÉLULAS TRONCO DA PAPILA APICAL" a ser executado de 03/2019 a 09/2019 e que pretende "Avaliar "in vitro" e "ex vivo" a ação do QMix 2 in 1 e do Smear Clear como possíveis irrigantes para o protocolo de revascularização, por meio de ensaios in vitro em cultura de células primárias obtidas da papila apical humana e em linhagem celular endotelial.

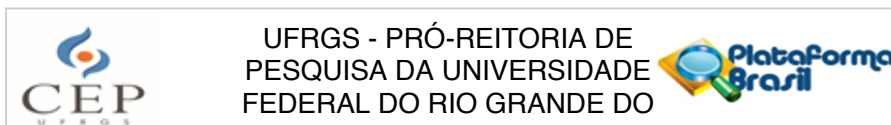
Como hipótese, os pesquisadores informam que "A hipótese nula é que o protocolo de desinfecção proposto pela Associação Americana de Endodontia não possui diferença em relação ao protocolo alternativo utilizando as soluções irrigadoras Qmix e SmearClear."

Foi apresentada uma fundamentação teórica bem estruturada, considerando aspectos relativos à revascularização, desinfecção e seus protocolos e medicações intracanal.

##### Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a ação do QMix® 2 in 1 e do Smear Clear como possíveis irrigantes para o protocolo de

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.110.390

revascularização, por meio de ensaios in vitro em cultura de células primárias obtidas da papila apical humana e em linhagem celular endotelial.

Como objetivos específicos:

- Avaliar a citotoxicidade das soluções irrigadoras por meio dos ensaios de MTT e SRB
- Avaliar a capacidade das soluções irrigadoras promoverem proliferação celular por meio do ensaio de cicatrização da ferida in vitro.
- Avaliar a bioatividade celular das soluções irrigadoras por meio da enzima fosfatase alcalina e identificar depósitos minerais por meio da coloração de Alizarin Red
- Avaliar o efeito angiogênico das soluções irrigadoras por meio do ensaio de tubulogênese, associado ao ensaio de SRB em células endoteliais (HUVEC)
- Avaliar as vias envolvidas no potencial osteogênico a partir de marcadores osteogênicos através do ensaio de PCR Real Time
- Avaliar o efeito das soluções irrigadoras na aderência à superfície dentinária do canal radicular por meio da microscopia eletrônica de varredura
- Avaliar a influência da utilização do modelo com a superfície radicular e com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), nos resultados dos ensaios.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Como riscos, os pesquisadores informam que “não trará riscos à saúde do participante, uma vez que serão empregados dentes extraídos por razões terapêuticas e independentes do objetivo desse estudo. Os riscos do projeto referem-se à quebra de confidencialidade. Esses serão minimizados pela assinatura de termo de compromisso de manutenção de sigilo de dados pessoais dos participantes pelos pesquisadores, o que também estará explícito no termo de consentimento livre e esclarecido.”

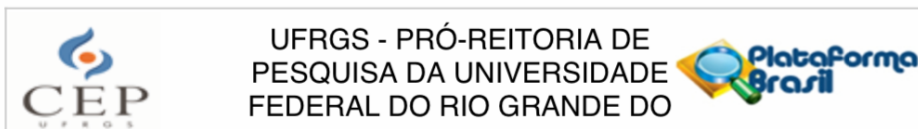
Como benefícios, os pesquisadores relatam que “serão indiretos e estão relacionados a possibilidade de aprimoramento do conhecimento acerca de protocolos de revascularização pulpar.”

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Segundo os pesquisadores, “indivíduos com indicação terapêutica de extração de terceiros molares com rizogênese incompleta serão convidados a doar seus dentes afim de obter o isolamento de

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br





Continuação do Parecer: 3.110.390

células da papila apical. Além disso, indivíduos com indicação de exodontia terapêutica de pré-molares inferiores também serão convidados a doar seus dentes para que estes sejam utilizados em alguns dos ensaios propostos. Tais pacientes serão recrutados junto à disciplina de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo-Facial da Faculdade de Odontologia da

UFRGS. Foi acrescentado termo de concordância da chefe do ambulatório.

Como tamanho amostral serão necessários 38 indivíduos entre: Teste de aderência por microscopia eletrônica de varredura (10) + avaliação da citotoxicidade, proliferação, bioatividade, efeito angiogênico, RT-PCR (24) + Isolamento e caracterização de células da papila apical (4).

Serão realizados diversos grupos experimentais:

Grupo 1a: Protocolo da Associação Americana de Endodontia (AAE):

Grupo 1b: Protocolo da Associação Americana de Endodontia (AAE) + LPS:

Grupo 2a: Protocolo utilizando o irrigante QMix:

Grupo 2b: Protocolo utilizando o irrigante Qmix + LPS

Grupo 3a: Protocolo utilizando o irrigante Smear Clear:

Grupo 3b: Protocolo utilizando o irrigante Smear Clear + LPS

Foi apresentado cronograma com execução prevista de março a setembro de 2019.

Foi apresentado orçamento, ficando claro que a responsabilidade é exclusiva do pesquisador principal.

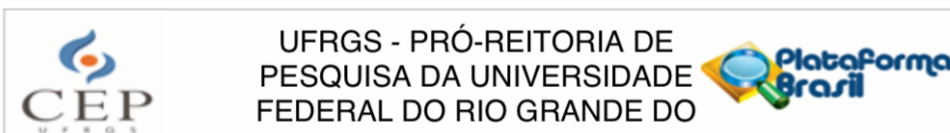
Foram anexados termos de concordância para execução do projeto nos Laboratórios de Endodontia e no Núcleo de Pesquisa Básica da FO da UFRGS.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foi apresentado projeto de pesquisa, folha de rosto assinada, TCLE e Termo de Doação de Dente.

Em relação ao TCLE apresentado adequadamente.

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.110.390

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O projeto de pesquisa encontra-se em condições de aprovação, de acordo com os aspectos éticos (CNS Resolução 466/12).

**Considerações Finais a critério do CEP:**

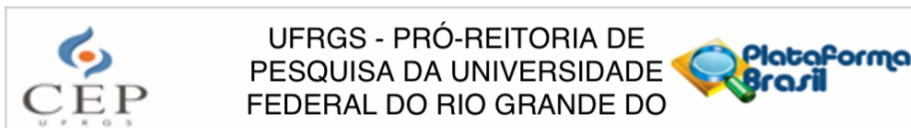
Aprovado.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1251524.pdf	14/12/2018 20:01:17		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOMESTRADOMARINAASPESI.pdf	14/12/2018 19:52:37	MARINA ASPESI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	doacaodente.pdf	14/12/2018 19:51:32	MARINA ASPESI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	adriana.pdf	14/12/2018 19:51:07	MARINA ASPESI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termoconsentimento.pdf	14/12/2018 19:50:45	MARINA ASPESI	Aceito
Declaração de Pesquisadores	pesquisadores.pdf	14/12/2018 19:50:36	MARINA ASPESI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	fernanda.pdf	14/12/2018 19:50:16	MARINA ASPESI	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	regis.pdf	14/12/2018 19:50:06	MARINA ASPESI	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	14/12/2018 19:49:37	MARINA ASPESI	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	14/12/2018 19:49:25	MARINA ASPESI	Aceito
Folha de Rosto	RobertaKochenborgerScarpato.pdf	14/12/2018 19:12:35	MARINA ASPESI	Aceito

**Situação do Parecer:**

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br



Continuação do Parecer: 3.110.390

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

PORTO ALEGRE, 10 de Janeiro de 2019

---

**Assinado por:**  
**MARIA DA GRAÇA CORSO DA MOTTA**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av. Paulo Gama, 110 - Sala 317 do Prédio Anexo 1 da Reitoria - Campus Centro  
**Bairro:** Farroupilha **CEP:** 90.040-060  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br