

Agitação do EDTA 17% e seu impacto na morfologia do coágulo sanguíneo formado pós-procedimentos endodônticos regenerativos – Um estudo *in vitro*

Palavras-Chave: Células sanguíneas. Endodontia Regenerativa. EDTA.

Autores/as:

Natasha Fernandes Peres – FOP/UNICAMP

Walbert de Andrade Vieira – FOP/UNICAMP

Prof.^a Dr.^a Adriana de Jesus Soares – FOP/UNICAMP

INTRODUÇÃO:

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. 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, o uso de substâncias químicas auxiliares se fazem obrigatórias para garantia da descontaminação de bactérias que possam estar presentes nos canais radiculares (FOUAD, 2017), além de estimular a liberação de fatores de crescimento presentes na dentina radicular (GALLER *et al.*, 2015). Atualmente a Associação Americana de Endodontia recomenda o EDTA 17% para a irrigação final, previamente à formação do coágulo sanguíneo (American Association of Endodontists, 2018). Estudos têm demonstrado que uma grande quantidade e diferentes tipos de fatores de crescimento são liberados após uma irrigação final com uso do EDTA (Galler *et al.* 2015). Além disso, estudos *in vitro* tem demonstrado mínimos danos causados pelo EDTA na viabilidade de células da papila apical (Chen *et al.*, 2018). Todavia, Taweewattanapaisan *et al.* (2019) observaram que a irrigação com EDTA promove alterações na morfológicas de células sanguíneas e na redução da rede de fibrina do coágulo induzido pós - revascularização. Os autores também observaram que uma irrigação final com soro fisiológico reduz significativamente os efeitos deletérios do EDTA sobre o coágulo sanguíneo.

Além da irrigação, a ativação da substância química auxiliar por meio de sistemas ultrassônicos tem sido amplamente utilizada com o objetivo de otimizar na remoção de smear layer presentes nas paredes dos túbulos (Plotino *et al.*, 2019; Souza *et al.*, 2019), além de aumentar a penetração das

soluções irrigadoras nostúbulos dentinários (Faria et al., 2018; Virdee et al., 2018). Algumas pesquisas demonstram que a agitação do irrigante pode ser uma etapa promissora para o sucesso da terapia endodôntica regenerativa. Todavia, não há estudos na literatura que tenham investigado a influência da agitação do EDTA com o dispositivo Easy Clean na morfologia do coágulo sanguíneo.

Desta forma, sabendo-se da importância da agitação do EDTA na terapia endodôntica regenerativa por meio da otimização da liberação dos fatores de crescimento pela dentina, é necessário conhecer também sua influência em outros aspectos desse procedimento. Dessa forma, a elaboração dos objetivos desse projeto partiu da hipótese nula de que a agitação do EDTA não potencializará os danos causados pelo EDTA ao coágulo sanguíneo, quando comparado à não agitação; além disso, os autores testarão também, a hipótese de que a irrigação final com soro fisiológico poderá reduzir os efeitos deletérios do EDTA sobre o coágulo sanguíneo.

METODOLOGIA:

Seleção e preparo dos espécimes

Sessenta (60) incisivos bovinos unirradiculares extraídos foram selecionados. Os dentes possuíam raízes retas, sem rachaduras e um comprimento de raiz de pelo menos 15mm. As coroas de todos os dentes foram removidas, e padronizou-se o comprimento radicular em 9 mm. As raízes dos dentes foram preparadas com uso de brocas gates glidden 4, 5 e 6 no sentido coroa-ápice e retropreparadas com brocas de largo 4 no sentido ápice-coroa por 2 mm até se obter um ápice aberto de 1 mm de diâmetro, confirmado com a passagem de uma lima 100 do tipo K.

A seguir, as raízes foram moldadas em silicone de condensação e colocadas em torno metálico para garantir estabilidade.

Grupos experimentais e protocolos de irrigação

Os espécimes foram distribuídos aleatoriamente (www.randomizer.org) em seis (6) grupos de acordo com o protocolo de irrigação final a ser utilizado (Quadro 1).

Quadro 1. Protocolos de irrigação utilizados em cada grupo de estudo.

Grupos	Protocolo de irrigação final
Grupo Controle (GC) (n=10)	Solução salina 0,9% (20ml), sem agitação
Grupo Experimental 1 (GE1) (n=10)	Solução salina 0,9% (20ml) + Agitação
Grupo Experimental 2 (GE2) (n=10)	EDTA 17% (20 ml), sem agitação
Grupo Experimental 3 (GE3) (n=10)	EDTA 17% (20 ml) + Agitação
Grupo Experimental 4 (GE4) (n=10)	EDTA 17% (20 ml) + solução salina 0,9% (20ml).
Grupo Experimental 5 (GE5) (n=10)	EDTA 17% (20 ml) + Agitação + Solução salina 0,9% (20ml).

Todos os procedimentos de irrigação foram realizados com o auxílio de seringa descartável de 5ml e agulha hipodérmica posicionada 1 mm aquém do ápice. A agitação da solução foi realizada com uso do dispositivo Easy Clean posicionado 2 mm aquém do ápice, em cinemática recíproca, acoplado ao motor endodôntico X-Smart Plus. Os canais foram preenchidos com a solução irrigadora, a qual foi agitada em três ciclos de 20 segundos cada, totalizando 60 segundos de agitação (LEONI

et al., 2017). Entre cada ciclo de agitação, a solução irrigadora foi substituída.

Ao final, os canais foram secos com uma Capillary tip nº 0,48 e pontas de papel absorvente estéreis. Em seguida, 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.

Coleta do sangue e formação do coágulo

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.

Imediatamente após a coleta, com uso de um microbrush estéril, o sangue foi espalhado em toda extensão dos canais radiculares dos espécimes, com o objetivo de simular o procedimento de revascularização. Em seguida, as raízes foram mantidas em uma câmara umidificadora à 37°C durante 15 minutos.

Preparação do espécime para análise no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

As raízes com o coágulo sanguíneo formado foram fixadas em uma solução de glutaraldeído a 2,5% em uma solução tampão de PBS com um pH de 7,4 por 24 horas, e foram desidratadas em série com etanol. A seguir, os espécimes foram posicionados em stubs metálicos e recobertos com ouro-paládio.

Análise de densidade da rede de fibrina

Três fotomicrografias foram tiradas de cada terço da raiz, em diferentes áreas, sob magnificação de 2500x. Utilizamos um método amplamente utilizado na literatura para avaliação da formação da rede de fibrinas em coágulos sanguíneos, o Índice de Adesão de Elementos Sanguíneos (IAES) (DANTAS *et al.*, 2012), de acordo com escores (Escore 0: Ausência de rede de fibrina e células sanguíneas; Escore 1: Rede de fibrina mal distribuída e/ou células sanguíneas; Escore 2: Número moderado de células sanguíneas e rede fina de fibrina com entrelaçamento deficiente; Escore 3: Rede densa de fibrina com ricos entrelaçamentos e presença de células sanguíneas).

Análise morfológica dos eritrócitos e plaquetas

As análises da morfologia dos eritrócitos e plaquetas foram realizadas por meio de análise visual com uso de Microscopia Eletrônica de Varredura JEOL. Três micrografias foram tiradas de cada terço da raiz, em áreas aleatórias da superfície dos espécimes, sob magnificação de 2500x. Imagens em uma magnificação de 500x foram tiradas com o objetivo de verificar a homogeneidade do coágulo. Esta análise foi apenas visual e descritiva.

Análise estatística

O teste de normalidade de Shapiro-Wilk e Levene evidenciou que os dados não apresentaram distribuição normal, e portanto os dados foram analisados por meio dos testes de Kruskal Wallis com pós teste de Dunn. O nível de significância foi estabelecido em $\alpha = 5\%$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Os resultados parciais desse estudo demonstram que os grupos irrigados apenas com soro fisiológico foi o que apresentou a maior densidade de rede de fibrinas, apresentando uma superfície de coágulo composta por eritrócitos bicôncavos, esferócitos e plaquetas. Os grupos experimentais apresentaram taxa moderada de rede de fibrinas, eritrócitos bicôncavos e principalmente a formação de “rouleaux” (Figura 1). As alterações morfológicas do coágulo sanguíneo encontradas nos grupos experimentais que utilizaram EDTA pode ser justificada pelas propriedades deletérias desse composto aos componentes sanguíneos do coágulo, uma vez que essa solução irrigadora tem propriedades anticoagulantes amplamente estabelecidas (VIVES-CORRONS et al., 2014).

As análises da densidade de fibrina demonstraram que a irrigação apenas com EDTA é capaz de influenciar negativamente na formação da rede de fibrinas do coágulo sanguíneo. Esse resultado é condizente com o que já existe na literatura (DANTAS et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2014; TAWEEWATTANAPAIAN et al., 2019; STEFANINI et al., 2021), e pode ser justificado pelo fato de o EDTA interferir diretamente na cascata de coágulo e interrupção da formação de trombina e fibrinogênio devido à quelatação dos íons cálcio (BANFI et al., 2007).

Apesar dos efeitos deletérios à formação da rede de fibrina dos grupos irrigados apenas com EDTA, os resultados do presente estudo demonstraram que esses efeitos podem ser revertidos total ou parcialmente com uma irrigação final de soro fisiológico. Dessa forma, os resultados estão de acordo com um estudo prévio (TAWEEWATTANAPAIAN et al., 2019), de metodologia semelhante, no qual observou que a densidade da rede de fibrina formada no grupo irrigado com EDTA seguido por soro fisiológico foi similar ao grupo controle (apenas soro fisiológico). Isso pode ser explicado pelo fato de a irrigação com soro fisiológico remover o EDTA residual presente na dentina após a irrigação, diminuindo seus efeitos deletérios ao coágulo.

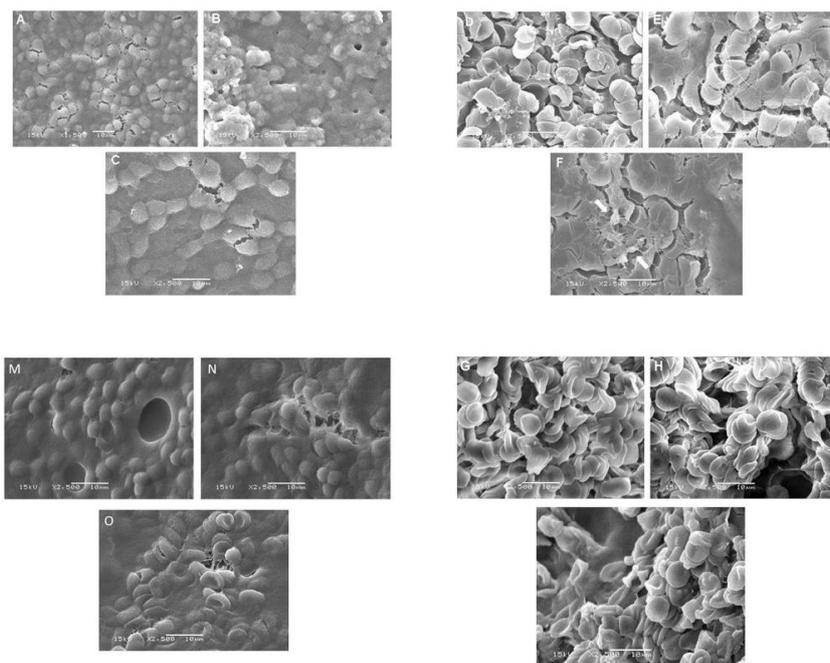


Figura 1. Microfotografias de imagens representativas dos grupos experimentais.

CONCLUSÕES:

Por meio dos resultados obtidos até o momento, pode-se concluir que a irrigação com EDTA é capaz de influenciar a formação do coágulo sanguíneo durante procedimentos endodônticos regenerativos, e que uma irrigação final com soro fisiológico é capaz de reverter os efeitos deletérios aos componentes do coágulo sanguíneo.

BIBLIOGRAFIA

- American Association of Endodontists. AAE Clinical Considerations for a Regenerative Procedure, 2018.
- Fouad AF. Microbial Factors and Antimicrobial Strategies in Dental Pulp Regeneration. *J Endod.* 2017Sep;43(9S):S46-S50.
- Galler KM, Buchalla W, Hiller KA, Federlin M, Eidt A, Schiefersteiner M, Schmalz G. 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.
- Nosrat A, Kolahdouzan A, Khatibi AH, Verma P, Jamshidi D, Nevins AJ, Torabinejad M. Clinical, Radiographic, and Histologic Outcome of Regenerative Endodontic Treatment in Human Teeth Using a Novel Collagen-hydroxyapatite Scaffold. *J Endod.* 2019 Feb;45(2):136-143.
- 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):281-286.
- 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.