

O CONDICIONAMENTO DA DENTINA COM SOLUÇÕES IRRIGADORAS INFLUENCIA NA LIBERAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO?

Data de submissão: 24/04/2024

Data de aceite: 01/07/2024

Sabrina Nascimento Ribeiro

Universidade Federal de Sergipe
Lagarto-SE
<http://lattes.cnpq.br/0071023466966794>

Maria Tereza Pedrosa de Albuquerque

Universidade Federal da Bahia
Salvador-BA
<https://orcid.org/0000-0002-5056-8126>

Mariana Emi Nagata

Universidade Estadual de Londrina
Londrina-PR
<http://lattes.cnpq.br/6436191171302789>

Juliana Yuri Nagata

Universidade Federal de Sergipe
Lagarto-SE
<https://orcid.org/0000-0002-5509-5110>

RESUMO: O objetivo deste capítulo é revisar a influência do condicionamento da dentina com diferentes tipos de soluções irrigadoras na liberação de fatores de crescimento. Soluções irrigadoras rotineiramente empregadas na Endodontia quando em contato com a dentina podem condicioná-la e promover a liberação de fatores de crescimento presentes em sua composição. Esses diversos fatores

fossilizados na dentina podem favorecer processos de regeneração e reparo tecidual principalmente em tratamentos regeneradores e terapias pulpares vitais. As principais soluções irrigadoras descritas na literatura e com potencial de ação na liberação de fatores de crescimento da dentina foram o EDTA 10% ou 17%, Ácido cítrico 10%, Ácido fosfórico 10% ou 37%, NaOCl 1,5%, Ácido Fólico 1% (IP6) e Ácido Etidrônico 9% (HEDP), e associações como NaOCl 1,5% + EDTA O principal fator de crescimento que tem sido quantificado nas pesquisas é o TGF- β 1. Dentre essas soluções, a maioria dos estudos têm demonstrado que o EDTA (10% ou 17%) permite uma maior liberação de fatores de crescimento, principalmente de IGF-1. Por outro lado, além do EDTA, alguns estudos também mencionam que o Ácido Cítrico 10% pode se mostrar superior ao EDTA na liberação de TGF- β 1, no recrutamento, fixação e sobrevivência das células-tronco, e sem aumentar seu efeito citotóxico. Observa-se um potencial de ação das substâncias químicas rotineiramente utilizadas no tratamento endodôntico como atuantes na liberação de fatores de crescimento fossilizados na dentina. Porém, mais estudos são necessários para

poder esclarecer o melhor protocolo de condicionamento, para possibilitar que tratamentos conservadores e regenerativos possam ser mais especificamente beneficiados a partir de componentes presentes naturalmente na dentina.

PALAVRAS-CHAVE: Fatores de Crescimento; Solução Irrigante; EDTA; Fator Transformador de Crescimento beta 1.

DOES DENTIN CONDITIONING WITH IRRIGANT SOLUTIONS INFLUENCE GROWTH FACTORS RELEASE?

ABSTRACT: The aim of this chapter is to study the impact of dentin conditioning with different types of irrigating solutions on growth release. Irrigant solutions routinely used in Endodontics in direct contact with dentin may act conditioning it and promoting growth factors release. The variety of fossilized growth factors in dentin may favor regenerative and repair processes mainly in endodontic regenerative and vital pulp therapies. The main irrigant solutions described in the literature includes 10% or 17% EDTA, 10% citric acid, 10% or 37% phosphoric acid, 1.5% NaOCl, IP6 (Phytic Acid) 1% and HEDP (Etidronic Acid) 9%, and associations such as NaOCl 1.5% + EDTA 17%. The main growth factor quantified in the researches was TGF- β 1. Among the studies addressing irrigating solutions, most of the articles has showed that EDTA (10% or 17%) allowed greater release of growth factors, especially IGF-1. Although EDTA predominance, some studies showed that 10% Citric Acid was superior to EDTA in the release of TGF- β 1, in the recruitment, fixation and survival of stem cells, without increasing its cytotoxic effect. The action potential of chemical substances routinely used in endodontic treatment as conditioning factors in the release of fossilized growth factors in dentin was observed. However, more studies are needed to clarify the best conditioning protocol, to enable conservative and regenerative treatments to be more specifically used from components naturally present in dentin.

KEYWORDS: Growth factors; Irrigant Solution; EDTA; Transforming Growth Factor beta 1.

INTRODUÇÃO

Fatores de crescimento presentes na dentina podem ser liberados quimicamente, por meio da utilização de substâncias químicas, desempenhando um papel crítico nos procedimentos endodônticos regenerativos (e.g. endodontia regenerativa e terapias vitais da polpa) (GALLER et al., 2016). A presença desses fatores no microambiente estimulam a atividade secretora dos odontoblastos, induzindo a migração, proliferação e diferenciação das células-tronco da polpa dental (GALLER et al., 2016; L. et al., 2016; SALEHI et al., 2016; SLOAN & SMITH, 2007), além de exercer funções benéficas incluindo, o estímulo de respostas celulares, a modificação da resposta imune e a promoção de angiogênese (GALLER et al., 2015).

Vários fatores de crescimento encontram-se fossilizados na matriz dentinária, como o Fator de Crescimento Transformador-beta 1 (TGF- β 1), Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGF-1), Fator de Crescimento Derivado das Plaquetas (PDGF), Fator de

Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), Fator de Crescimento de Fibroblastos Básico (bFGF), Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), Fator de Crescimento de Fibroblasto 2 (FGF-2) e a Proteína Morfogenética Humana 2 e 4 (BMP-2 e -4) (GOLDBERG et al., 2006, 2008; HOWARD et al., 2010; RUFAS et al., 2016; SMITH et al., 2016; ZENG et al., 2016). Dentre esses fatores, destaca-se o TGF- β 1, considerada a molécula chave para regeneração pulpar, uma vez que, age como um mediador da sinalização, diferenciação de células tronco semelhantes a odontoblastos que irão atuar na mineralização e quimiotaxia de diferentes tipos celulares (LI et al., 2011).

A descoberta do papel essencial dos fatores de crescimento, fossilizados na dentina, no processo regenerativo/reparador, tem influenciado positivamente na evolução do entendimento/aplicação das terapias pulpares vitais, as quais têm ganhado destaque, nos últimos anos, como uma alternativa de tratamento para casos de pulpites (reversíveis/irreversíveis) tanto em pacientes jovens quanto em adultos (AGUILAR & LINSUWANONT, 2011; ENDODONTISTS, 2015; ZANINI et al., 2016). Essas terapias visam o tratamento do tecido pulpar exposto à cavidade oral por lesões de cárie ou traumatismo dentário ao invés de removê-lo completamente, preservando estrutura dentária de suporte (diminuindo assim o risco de fraturas ao longo da vida), mantendo os mecanismos de defesa dentária e preservando a capacidade de propriocepção e nocicepção (AGUILAR & LINSUWANONT, 2011). Diante dos elevados índices de sucesso encontrados para estas terapias (65 – 100%), estudos recentes tem investigado tanto os meios (substâncias químicas – EDTA, Hipoclorito de sódio etc.) pelos quais os fatores de crescimento são liberados, como a influência da liberação desses fatores de crescimento, armazenados na matriz dentinária, no tratamento do tecido pulpar (AKSEL et al., 2020).

Um dos meios que proporciona a liberação dos fatores de crescimento é representado pela solubilização da dentina induzida pelo ambiente ácido durante a progressão do biofilme da cárie. Além desse modo primário, onde os microrganismos atuam diretamente na desmineralização da dentina com consequente liberação de fatores de crescimento, outro mecanismo manifesta-se pela indução dessa liberação por meio da ação de substâncias químicas capazes de promover o condicionamento da dentina (MAGLOIRE et al., 2001; ZEHNDER, 2006). Dentre esses agentes desmineralizadores, destaca-se o EDTA 17%, considerado o material mais comumente utilizado e recomendado para este fim (Association American of Endodontists, 2016). No entanto, outras substâncias vêm sendo investigadas, incluindo o Ácido Cítrico e Ácido Fosfórico que têm demonstrado potencial na liberação dessas moléculas (VIOLICH & CHANDLER, 2010). Além dessas soluções, algumas medicações intracanaís também se mostraram promissoras quanto a liberação dos mediadores dentinários, como o Hidróxido de Cálcio [Ca (OH) $_2$], Cimentos à Base de Silicato Tricálcico (TSCs), Agregado de Trióxido Mineral (MTA) e Biodentine (BD) (TAKAHASHI et al., 2013; WATTANAPAKKAVONG & SRISUWAN, 2019).

Essa variedade de materiais capazes de se beneficiar das moléculas bioativas presentes na dentina pode gerar dúvidas aos profissionais diante da quantidade de informações apresentadas na literatura, tornando-se importante interpretar e resumir esses dados sobre os tipos e as concentrações das soluções irrigadoras que mais ativamente possam atuar sobre o condicionamento da dentina, e conseqüentemente influenciar na modulação, sobrevivência e atividade das células-tronco mesenquimais da polpa dental (GALLER et al., 2011, 2015; MARTIN et al., 2014; RUPAREL et al., 2012). Dessa forma, esse capítulo irá revisar na literatura estudos que investigaram a influência, os tipos e benefícios das substâncias irrigadoras utilizadas no tratamento endodôntico quanto à liberação de fatores de crescimento da dentina.

INFLUÊNCIA DAS SUBSTÂNCIAS QUÍMICAS AUXILIARES (CONDICIONANTES) NA LIBERAÇÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO DA DENTINA

A liberação de fatores de crescimento presentes na dentina por meio de processos químicos representa etapa determinante no sucesso dos procedimentos endodônticos regenerativos para que se obtenha a substituição ou recomposição das estruturas danificadas da polpa, dentina e cimento, bem como células do complexo dentinopulpar (GALLER et al., 2015; HARGREAVES et al., 2013; KAUSHIK et al., 2016). Dentre as possibilidades terapêuticas clínicas que podem atuar nessa liberação de fatores de crescimento, pode-se citar o emprego de substâncias químicas nas paredes do canal radicular que atuem na remoção da porção inorgânica da dentina permitindo assim que esses ativos possam exercer suas funções no ambiente onde foi liberado (ZEHNDER, 2006). Estudos mostram que o tipo de solução de irrigação utilizado durante a descontaminação dos canais radiculares pode influenciar na liberação de fatores de crescimento, sendo o EDTA, geralmente a uma concentração de 17%, o agente mais comumente utilizado (ALGHILAN et al., 2017; TREVINO et al., 2011). Dentre os fatores de crescimento que desempenham um papel significativo na regeneração endodôntica, o Fator de Transformação de Crescimento Beta 1 (TGF- β 1), representa um dos principais agentes responsáveis por induzir a proliferação celular, diferenciação e quimiotaxia em diferentes tipos de células (NIWA et al., 2018).

Diante da relevância de se conhecer o papel dessas substâncias na regeneração pulpar, um estudo mensurou a quantidade de TGF- β 1, Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico (FGF-2) e Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) que poderiam ser liberados de discos de dentina humana preparados a partir de molares humanos extraídos (GALLER et al., 2015). O teste consistiu em imergir cada disco em 100 mL de solução teste por 5, 10 ou 20 minutos. As soluções testadas consistiram em EDTA 10%, pH 6; EDTA 10%, pH 7; EDTA 17%, pH 7; Ácido Cítrico 10%, pH 2; Tampão Citrato, pH 5; e Tampão de Fosfato de Ácido Cítrico, pH 7. Os fatores de crescimento foram quantificados por meio do

Sistema de Teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) para cada tipo de fator de crescimento (TGF-b1, FGF-2 e VEGF). Os resultados mostraram que o condicionamento com EDTA 10% (pH=7) por 20 minutos resultou na liberação de maiores quantidades de TGF-b1 (923 pg/mL), enquanto EDTA 10% (pH=6) e EDTA 17% (pH=7) foram menos eficazes (449 pg/mL e 827 pg/mL, respectivamente). A liberação de TGF-b1 após o tratamento com Ácido Cítrico e suas variações foram significativamente menores (57 pg / mL). Além disso, foi observado que a liberação do fator de crescimento apresentou-se dependente do tempo, no qual o aumento do tempo de exposição resultou em maiores quantidades de TGF-b1 liberadas. Já a liberação de FGF-2 e VEGF após condicionamento da dentina mostrou-se também dependente do tempo, mas em níveis mais baixos quando comparado ao TGF-b1 (FGF-2, 10 pg / mL, VEGF, 32 pg / mL após exposição de 20 minutos). Outro achado relevante da pesquisa foi observado com relação a um aumento na quantidade de TGF-b1 quando o condicionamento por EDTA foi precedido pela utilização de Clorexidina durante 5 minutos, porém quando o tempo foi aumentado para 10 minutos a liberação do fator de crescimento em questão foi semelhante ao do EDTA sozinho. Por outro lado, o uso de NaOCl antes do condicionamento com EDTA reduziu significativamente a liberação de TGF-b1 (GALLER et al., 2015).

No ano seguinte, investigou-se também o tipo e a quantidade de fatores de crescimento liberados no espaço do canal radicular, utilizando dentes permanentes com raiz única, sem fraturas, ou aberrações anatômicas (ZENG et al., 2016). Para caracterizar os tipos de fatores de crescimento liberados, os segmentos radiculares foram irrigados com NaOCl 1,5% seguido por EDTA 17% e então mantidos em meio de cultura por 1 dia. Já para avaliar a quantidade de TGF-b1 e o FGF liberado, os protocolos de irrigação consistiram em a) NaOCl 1,5% (20 mL / 5 min) + EDTA 17% (20 mL / 5 min), b) NaOCl 2,5% (20 mL / 5 min) + EDTA 17% (20 mL / 5 min), c) EDTA 17% (20 mL / 5 min), e d) Água desionizada (20 mL / 5 min). Essa quantificação foi mensurada pelo mesmo método utilizado no estudo anterior (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática). Os resultados detectaram a expressão de 11 tipos de fatores de crescimento, incluindo Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), Fator Estimulador de Colônias 1 (CSF1), Fator de Estimulação de Colônia 3 (CSF3), Proteína de Ligação ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1 (IGFBP1), Proteína de Ligação ao Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 3 (IGFBP3), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF-AB), Fator de Crescimento Transformador Alfa (TGF-a), Fator de Crescimento Transformador Beta 1 (TGF-b1), Fator de Crescimento Transformador Beta 2 (TGF-b2), Fator de Crescimento Endotelial Vascular A (VEGF-A), e Fator de Crescimento Endotelial Vascular D (VEGF-D). Quantitativamente, as amostras irrigadas com água desionizada liberaram TGF- b1 em um nível muito baixo (0,78 ng / mL) enquanto o grupo irrigado apenas com EDTA 17% liberou TGF-b1 em um nível variando de 4 ng / mL a 16 ng / mL. Após 4 horas da irrigação, 3 grupos (NaOCl 1,5% + EDTA 17%, NaOCl 2,5% + EDTA 17%, e grupo EDTA 17%) não tiveram diferença estatística

na liberação de TGF- β 1. Porém, no primeiro dia, as concentrações de TGF- β 1 no grupo NaOCl 1,5% + EDTA 17% (69,04 ng / mL) e no grupo NaOCl 2,5% + de EDTA 17% (59,26 ng / ml) atingiram um pico, com ambos os grupos retratando significativamente maiores quantidades de liberação de TGF- β 1 do que o grupo EDTA 17% (6,92 ng / mL). Por outro lado, no terceiro dia, a concentração de TGF- β 1 diminuiu em ambos os grupos NaOCl 1,5% + EDTA 17% (15,16 ng / mL) e NaOCl 2,5% + EDTA 17% (13,04 ng / mL) e tornou-se semelhante ao grupo de EDTA 17% (16,25 ng / mL). Por fim, a liberação de FGF em todos os grupos apresentou valores muito baixos em todos os momentos (0 ng / mL a 0,43 ng / mL). Dessa forma, esse estudo também demonstrou que a presença desses fatores de crescimento estimulou a migração de células-tronco da polpa dentária, o que ressalta ainda mais a importância dessas substâncias na regeneração endodôntica (ZENG et al., 2016).

Outro aspecto importante abordado no ano seguinte, consistiu em formas de potencializar a ação das substâncias químicas auxiliares na liberação de TGF- β 1 fossilizados na dentina. Neste sentido, um estudo analisou o impacto da irrigação com e sem ativação ultrassônica na liberação de fatores de crescimento da dentina humana (WIDBILLER et al., 2017). Para a realização desse estudo, discos de dentina (6 mm de diâmetro e 200 μ m de espessura) foram preparados a partir de terceiros molares humanos de jovens entre 15 e 25 anos. Em seguida, os discos de dentina foram distribuídos em placas de 96 poços (Costar®, Corning Inc., Lowell, MA, EUA) e submetidos aos protocolos de irrigação de uma ou duas etapas, com ou sem ativação ultrassônica (US). As substâncias químicas auxiliares foram testadas da seguinte forma: Passo único: PBS por 10 min com US, EDTA 10% em pH 7 por 1 min com US, EDTA 10% em pH 7 por 3 min com US, EDTA 10% em pH 7 por 10 min sem US; ou Dois passos: PBS por 10 min sem US, seguido de PBS por 1 min com US; EDTA 10% em pH 7 por 1 min sem US, seguido de PBS por 1 min com US; EDTA 10% em pH 7 por 10 min sem US, seguido de PBS por 3 min com US; EDTA 10% em pH 7 por 10 min sem US, seguido de PBS por 5 min com US. Importante ressaltar que cada disco de dentina foi submetido 3 vezes ao mesmo protocolo. Além disso, o TGF- β 1 foi quantificado por meio do teste ELISA. Os resultados do estudo mostraram que o tratamento com PBS por 10 min com ou sem ativação ultrassônica não induziu a liberação do fator de crescimento analisado. Já o tratamento com EDTA em etapa única, liberou uma maior quantidade de TGF- β 1, aumentando progressivamente com o tempo (197 pg/ml após 1 min, 535 pg/ml após 3 min e 908 pg/ml após 10 min). De forma semelhante, quando a irrigação com EDTA foi ativada com o ultrassom observou-se uma maior liberação do TGF- β 1, que passou de 197 pg/ml sem US para 313 pg/ml com US. Outro achado relevante, foi que no protocolo de duas etapas com EDTA por 1 min seguido por 1 min de irrigação ativada com PBS resultou no aumento da liberação de TGF- β 1 (286 pg/ml), quando comparado ao PBS isoladamente. Concomitantemente, o condicionamento com EDTA por 10 min permitiu a liberação de TGF- β 1 em PBS com ativação ultrassônica de forma significativa (735 pg/ml após 3 min e 1334 pg/mL após 5 min). Esse estudo também estabeleceu um modelo

de canal radicular com uma configuração clinicamente relevante para analisar a liberação do fator de crescimento. Para a construção desse modelo (Widbiller et al., 2017), foram incluídos primeiros e segundos molares de indivíduos de todas as faixas etárias, mas que não apresentavam tratamento endodôntico, raízes curvas ou fechamento apical incompleto. Para a padronização do modelo, segmentos radiculares com um comprimento de canal padronizado de 10 mm foram fixados em uma ponta de pipeta com material de impressão (bandeja Panasil® Soft Heavy, Kettenbach GmbH & Co. KG, Eschenburg, Alemanha) e submetidas aos protocolos de irrigação por três vezes: PBS por 10 min com US, EDTA por 10 min, seguido de PBS por 5 min com US e EDTA por 3 min com US. Diferentemente do que ocorreu com os discos de dentina submetidos ao tratamento com PBS, os modelos de raízes condicionados com PBS durante 10 min com US liberaram uma quantidade considerável de fator de crescimento (382 pg/ml) sem diferença estatística entre os três ciclos. Foi observado também, que ao final do condicionamento com EDTA seguido de ativação US com PBS, obteve-se uma concentração cumulativa de 1023 pg/ml de TGF- β 1, esta quantidade aumentou significativamente após os ciclos seguintes. Porém, os maiores valores de TGF- β 1 foram obtidos por meio da ativação ultrassônica de EDTA por 3 min (3445 pg/ml) sem diferenças estatísticas entre os ciclos. Nesse sentido, nota-se que a US potencializou a liberação do fator de crescimento em questão (WIDBILLER et al., 2017).

Além das conhecidas propriedades benéficas do EDTA na liberação de agentes ativos no canal radicular, outro estudo analisou a quantidade de TGF-b1 liberada após o emprego de outros irrigantes finais durante procedimentos endodônticos regenerativos (CHAE et al., 2018). Para isso, também foram utilizados segmentos de raiz preparados a partir de dentes permanentes com raiz única, sem fraturas, nem aberrações anatômicas. Os irrigantes utilizados nessa investigação envolveram a Solução Salina, EDTA 17%, Ácido Cítrico 10%, Ácido Fosfórico 10% e 37%. A quantificação de TGF-b1 foi mensurada pelo mesmo teste de ELISA. Os resultados desse estudo mostraram que após 24 horas da irrigação, o grupo do Ácido Cítrico 10% liberou uma quantidade de TGF-b1 significativamente maior (516 pg / ml), quando comparado ao EDTA 17% (231 pg / ml). Já o grupo de Ácido Fosfórico 10% liberou uma quantidade semelhante de TGF-b1 (240 pg/ ml) quando comparado ao grupo do EDTA 17%, entretanto superior ao grupo do Ácido Fosfórico 37% (53 pg/ ml). Os mesmos resultados de liberação foram observados para os grupos do Ácido Fosfórico 37% e da Solução Salina, que não se apresentaram significativamente diferentes do controle negativo (43 pg/ ml) (CHAE; YANG; KIM, 2018). Nesse sentido, o uso de Ácido Cítrico 10% mostrou-se mais vantajoso do que o uso de EDTA 17%, pois além de liberar mais TGF-b1 da dentina do canal radicular, o mesmo não aumentou seu efeito citotóxico.

Diante da possibilidade vantajosa do Ácido Cítrico (AC), o mesmo foi novamente testado quanto à liberação de TGF-b1 da dentina humana tratada em comparação ao EDTA, utilizando um método insensível ao pH (IVICA et al., 2019). Para a análise, foram confeccionados discos de dentina humana (200 micrômetros de espessura) preparados

a partir da porção dentinária localizada abaixo da junção cimento-esmalte de molares humanos extraídos. Os agentes condicionantes testados foram representados pelo: AC 10% (pH = 2, 476 mol / L), EDTA 17% (ajustado para um pH de 8), ou Solução Salina Tamponada com Fosfato (PBS; Gibco, Paisley, UK). As amostras foram irrigadas com um volume de 300 ml de cada solução, por 10 minutos. A concentração de TGF- β 1 após o condicionamento foi determinada por meio da Técnica de Slot Blot. Os achados dessa pesquisa demonstraram que houve liberação significativamente maior de TGF- β 1 no grupo AC (382 ng), quando comparado ao EDTA (66 ng). Dessa forma, o tratamento com AC mostrou-se superior ao EDTA em relação à liberação de TGF- β 1, assim como no recrutamento, fixação e sobrevivência de células-tronco, o que pode influenciar positivamente os tratamentos regeneradores da polpa (IVICA et al., 2019).

Além da influência do tipo de substância química na liberação de fatores de crescimento da dentina, um estudo do mesmo ano avaliou o efeito da presença de um biofilme bacteriano residual na liberação de TGF- β 1 (CAMERON et al., 2019). Esse estudo utilizou dentes humanos extraídos, de pacientes com menos de 20 anos de idade, nos quais foi induzida a formação de biofilme dental composto pelas espécies bacterianas *Actinomyces naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum* e *Parvimonas micra*. Inicialmente, as bactérias foram cultivadas separadamente e em seguida misturadas em uma proporção de 1: 1: 1 em um volume total de 40 ml, sendo posteriormente transferidos para cultivo nos segmentos de raiz preparados. Após a formação do biofilme, as amostras foram submetidas aos seguintes protocolos de irrigação: a) NaOCl 1,5%, b) EDTA 17% e c) NaOCl 1,5% + EDTA 17%, seguidas por mensuração da quantidade de TGF- β 1 liberada por meio do teste de ELISA. Os resultados desse estudo evidenciaram que na ausência de biofilme as amostras irrigadas com EDTA 17% promoveram significativamente maior liberação de TGF- β 1 da dentina, enquanto a liberação desse fator foi completamente abolida quando a dentina foi irrigada com NaOCl 1,5% sozinho. Por outro lado, quando esses irrigantes foram associados (NaOCl 1,5% + EDTA 17%) houve a reversão total dos efeitos prejudiciais do NaOCl 1,5% sozinho. Além disso, sob condições infectadas a irrigação com EDTA 17% ou a combinação de NaOCl 1,5% + EDTA 17% reduziu significativamente a liberação de TGF- β 1 em comparação com os mesmos irrigantes aplicados a sistemas de canais radiculares estéreis, o que demonstra os efeitos deletérios de um biofilme residual na liberação de fatores de crescimento da dentina (CAMERON et al., 2019).

Outras substâncias químicas também têm sido testadas quanto ao potencial de liberação de fatores de crescimento da dentina como o Ácido Fítico (IP6) e o Ácido Etidrônico (HEDP) (DENIZ et al., 2019). Essas duas substâncias (IP6 e HEDP) apresentam propriedades quelantes, sendo o primeiro um composto de fosfato natural presente em sementes de plantas, enquanto o último, oferece a vantagem de não interferir nas propriedades antimicrobianas do NaOCl (ARIAS-MOLIZ et al., 2014). Diante dessas propriedades, um estudo realizado com discos de dentina de 6 micrômetros de espessura,

preparados a partir de molares humanos totalmente impactados recém-extraídos de pacientes com 18 a 25 anos, investigou o efeito de IP6 e HEDP em comparação ao EDTA, sobre a liberação do Fator de Crescimento Transformador (TGF- β) da dentina. Primeiramente, os discos preparados foram imersos em 1 ml de NaOCl 1,5% por 5 min para remover os tecidos orgânicos e em seguida lavados com PBS. Em seguida, os discos de dentina foram imersos em 1 ml das soluções quelantes experimentais por 5 min: EDTA 17% (Werax, Izmir, Turquia), IP6 1% (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EUA), HEDP 9% (Sigma -Aldrich) e Água Destilada como controle e sendo ao final novamente lavados com PBS. Após o condicionamento, os discos foram imersos em 1 ml de PBS e incubados a 37° C por até 28 dias para então serem analisados em diferentes intervalos de tempo (4h, 1, 3, 5, 7, 14 e 28 dias). A quantificação do TGF- β liberado dos discos de dentina foi realizada por meio do teste de ELISA. Os resultados mostraram que a quantidade de TGF- β liberado aumentou gradativamente até o período de 28 dias para todos os grupos, sendo que a maior liberação foi obtida para o grupo HEDP (aproximadamente 240 ng / ml), enquanto grupo IP6 exibiu a menor taxa de liberação (aproximadamente 170 ng / ml). Entretanto, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos (DENIZ et al., 2019).

Diante das propriedades promissoras dessa grande variedade de substâncias químicas, outro estudo também comparou os efeitos do condicionamento da dentina com EDTA, Ácido Cítrico, Ácido Fítico (IP6) e Ácido Fosfórico na liberação de fatores de crescimento, usando discos com espessura de aproximadamente 1 mm que foram preparados a partir de quarenta terceiros molares humanos livres de cárie extraídos de jovens adultos (18-24 anos) (ATESCI et al., 2020). Os protocolos de condicionamento testados incluíram: a) EDTA 17% por 5 min, b) Ácido Cítrico 10% por 5 min, c) IP6 1% por 5 min e d) Ácido Fosfórico 37% por 30 s. Após esse preparo das amostras, a presença dos fatores TGF-b1, BMP-2 (Proteína Morfogênica Óssea 2), FGF-2 (Fator de Crescimento de Fibroblasto Básico) e VEGF (Fator de Crescimento Endotelial Vascular) foram quantificados por ELISA. A partir dessa metodologia, observou-se uma liberação significativamente maior de TGF-b1 no grupo tratado com Ácido Cítrico (aproximadamente 500 pg / mg) seguido pelo grupo do Ácido Fosfórico (aproximadamente 400 pg / mg), mas sem diferença estatística entre esses grupos. Com relação à presença de VEGF, notou-se uma pequena quantidade liberada desse fator, que esteve mais prevalente no grupo do Ácido Fosfórico (aproximadamente 60 pg / mg), porém sem diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. A liberação de BMP-2 foi considerada semelhante em todos os grupos testados, mas com diferenças significantes em relação ao grupo de controle. Por fim, a liberação de FGF-2 da dentina possibilitada pelo condicionamento com EDTA e Ácido Fosfórico pareceram ser mais eficazes, seguido pelos grupos do Ácido Cítrico e IP, porém sem diferenças estatísticas entre eles (ATESCI et al., 2020). Diante da liberação favorável de fatores de crescimento pelas substâncias analisadas (Ácido Cítrico, Ácido Fosfórico e EDTA), pode-se inferir que as mesmas podem ser consideradas alternativas promissoras no tratamento endodôntico regenerativo.

Mais recentemente, outro estudo investigou os efeitos de diferentes sistemas de ativação de irrigação e agentes quelantes na liberação de quatro diferentes fatores de crescimento da dentina (HANCERLIOGULLARI et al., 2021). Para iniciar a investigação, segmentos de raiz (12 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro apical) foram preparados a partir de 70 pré-molares inferiores com formação radicular estágio 5, raiz única e canal sem quaisquer malformações anatômicas ou cáries. Posteriormente, dez exemplares de segmentos de raiz foram alocados aleatoriamente para o grupo de controle e os sessenta restantes foram colocados em tubos eppendorf usando material de impressão à base de silicone (Zetaplus L Intro Kit; SPA, Roma, Itália). Para seguir os protocolos de irrigação, os segmentos de raiz foram alocados nos seguintes grupos: Grupo de controle: irrigação com NaOCl 1,5% (20 ml/5 min) e 20 mL de solução salina; Grupo 1A (Irrigação com Seringa Convencional/ CSI): Cada segmento radicular foi irrigado com 20 ml de EDTA 17% por 5 min; Grupo 2A (Irrigação com Seringa Convencional/ CSI): Cada segmento radicular foi irrigado com 20 ml de CA 10% por 5 min; Grupo 1B (Irrigação Ultrassônica Passiva/ PUI): Cada segmento radicular foi irrigado com 20 ml de EDTA 17% sob ativação contínua de PUI; Grupo 2B (Irrigação Ultrassônica Passiva/ PUI): Cada segmento radicular foi irrigado com 20 ml de CA 10% sob ativação contínua de PUI, Grupo 1C (Laser Er: YAG com ponta PIPS, 2940 nm): Cada segmento da raiz foi irrigado com 20 mL EDTA 17%, seguido pela aplicação do laser e Grupo 2C (Laser Er: YAG com ponta PIPS, 2940 nm): Cada segmento da raiz foi irrigado com 20mL Ca 10%, seguido pela aplicação de laser. O Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi empregado para medir os níveis de TGF- β 1, IGF-1, BMP-7 e VEGF-A. Os resultados desse estudo mostraram que em relação a liberação de TGF- β 1 no grupo EDTA, houve uma liberação significativamente maior nos grupos de ativação (Grupo 1B e 1C) quando comparado ao CSI (Grupo 1A) em 24 horas (p .05). No 7º dia, a liberação de TGF- β 1 foi significativamente maior para o grupo de ativação do laser Er: YAG (Grupo 1C) do que para os grupos PUI (Grupo 1B) e CSI (Grupo 1A) (p .05). A avaliação do efeito do CA na liberação de TGF- β 1 apresentou-se significativamente maior do que os outros grupos experimentais em ambos os intervalos de tempo (p < .05). Já a liberação de IGF- 1 quando irrigado com EDTA foi significativamente maior com a ativação do laser Er: YAG do que com CIS, enquanto a diferença entre PUI e os outros grupos experimentais não foi significativa (p > .05) para qualquer intervalo de tempo. O CA resultou em liberação significativamente maior de IGF-1 quando comparado aos demais grupos em ambos os intervalos de tempo (p < .05) mas nenhuma diferença significativa foi observada para a liberação de IGF-1 entre os outros grupos (p > .05). Com relação à liberação de BMP-7 observou-se uma quantidade significativamente maior quando a dentina foi condicionada com laser Er: YAG associado ao EDTA em ambos os intervalos de tempo do que nos outros grupos (p < .05). Já o VEGF-A foi liberado em menores quantidades, com as medições de 24 horas demonstrando uma liberação significativamente maior de VEGF-A pela ativação de Er: YAG com EDTA 17% do que pelos outros tratamentos (p .05). O tratamento com ativação Er: YAG e CA 10%

(Grupo 2C) resultou em uma liberação de VEGF-A significativamente maior em ambos os intervalos de tempo quando comparado aos outros tratamentos (p .05). A liberação de VEGF-A apresentou-se significativamente maior com a ativação de Er: YAG com CA 10% do que com EDTA 17% em ambos os intervalos de tempo (p< 0,5). Nessa perspectiva, pode-se notar que a ativação das substâncias químicas promoveu um aumento significativo na liberação de fatores de crescimento (HANCERLIOGULLARI et al., 2021).

DESTAQUES DOS ESTUDOS DESCRITOS

Danos ao órgão dentário, seja por trauma ou infecção, podem levar a exposição dos túbulos dentinários, favorecendo a difusão de produtos metabólicos de bactérias, que por sua vez passam a afetar as células da polpa dentária. Dentre as células pulpares ativadas por essas agressões encontram-se as células-tronco mesenquimais indiferenciadas (MSCs), que por intermédio de fatores bioativos, estimulam diretamente os mecanismos intracelulares das células danificadas ou aumentam indiretamente a liberação de moléculas sinalizadoras pelas células adjacentes (CAPLAN & DENNIS, 2006; COUVE et al., 2014; MAUMUS et al., 2011; SMITH et al., 1995). Essas moléculas sinalizadoras consistem em citocinas, mediadores inflamatórios, componentes da matriz extracelular e proteínas antimicrobianas que induzem a formação de um microambiente apropriado para o reparo tecidual (YU et al., 2014). Além da liberação em resposta a um estímulo agressor, essas substâncias podem ser excretadas durante o preparo químico-mecânico do canal radicular ou por intermédio do contato com uma medicação intracanal (ZEHNDER, 2006). Diante da relevância dessas substâncias para intermediar os efeitos celulares reparadores da polpa dental, vários estudos têm investigado protocolos e materiais que possam induzir positivamente e acelerar esse processo.

A partir dos resultados apresentados no presente trabalho, pode-se observar que há uma preferência pela quantificação de TGF- β 1 visto que o mesmo representa fator principal nos processos de reparo tecidual, entretanto, outros fatores de crescimento incluindo FGF-2, VEGF e BMP-2 também foram quantificados. Dentre as amostras selecionadas dentro das metodologias, nota-se um maior uso de discos de dentina preparados a partir de molares humanos extraídos (GALLER et al., 2015; IVICA et al., 2019), com maior preferência para terceiros molares humanos livres de cárie, extraídos de jovens adultos (18-24 anos) (ATESCI et al., 2020). Além disso, também foram utilizados dentes permanentes com raiz única, sem fraturas, ou aberrações anatômicas (CHAE et al., 2018; ZENG et al., 2016) e dentes humanos extraídos, de pacientes com menos de 20 anos de idade (CAMERON et al., 2019). Com relação às soluções irrigadoras investigadas, o EDTA 17% foi testado em todos os estudos, sendo comparado a outras soluções incluindo o Ácido cítrico 10%, Ácido fosfórico 10% e 37%, NAOCL 1,5%, IP6 1% e HEDP 9%, e associações como NAOCL 1,5% + EDTA 17%, (ATESCI et al., 2020; CAMERON et al., 2019; CHAE et al., 2018; DENIZ et

al., 2019; GALLER et al., 2015; IVICA et al., 2019). O período de tempo que as amostras de dentina permaneciam em contato com essas substâncias variou de 1 a 20 minutos. Dentre essas soluções condicionantes, seis artigos encontraram melhores resultados de liberação de fatores de crescimento para EDTA (10% ou 17%), principalmente de IGF-1 (CAMERON et al., 2019; DENIZ et al., 2019; GALLER et al., 2015; HANCERLIOGULLARI et al., 2021; WIDBILLER et al., 2017b; ZENG et al., 2016). Por outro lado, três artigos observaram que o Ácido Cítrico 10% apresentou-se superior ao EDTA na liberação de TGF- β 1, no recrutamento, fixação e sobrevivência das células-tronco, e sem aumentar seu efeito citotóxico (ATESCI et al., 2020; CHAE et al., 2018; IVICA et al., 2019). Entretanto, o EDTA 17% liberou mais Fator de Crescimento Semelhante à Insulina tipo 1 (IGF-1) em comparação com AC 10%, o que não ocorreu com os demais fatores de crescimento estudados (HANCERLIOGULLARI et al., 2021).

Outro aspecto abordado foi em relação a ativação da irrigação, comparando o uso de Seringa Convencional, Ultrassom de forma Passiva, Laser Er: YAG com ponta PIPS (HANCERLIOGULLARI et al., 2021) e Ativação Ultrassônica (WIDBILLER et al., 2017), demonstrando que essa otimização da irrigação parece contribuir para maior liberação desses fatores de crescimento. Como forma de quantificar a liberação dos fatores de crescimento, o Sistema de Teste de Ensaio Imunoenzimático (ELISA) foi utilizado em todos os estudos. A partir dessa metodologia, demonstrou-se que a liberação de TGF- β 1 foi significativamente maior no grupo do Ácido Cítrico 10% do que no grupo do EDTA 17% (ATESCI et al., 2020; CHAE et al., 2018; IVICA et al., 2019). O Ácido Cítrico também promoveu uma liberação significativamente maior de TGF- β 1 quando comparado ao Ácido fosfórico, mas não houve diferença estatística entre eles (ATESCI et al., 2020). Quando diferentes concentrações de EDTA foram analisadas observou-se diferenças relevantes entre elas e o grupo do EDTA 10% (pH=7) por 20 minutos resultou na liberação de maiores quantidades de TGF- β 1 (923 pg / mL), enquanto EDTA 10% (pH=6) e EDTA 17% (pH=7) foram menos eficazes (449 pg / mL e 827 pg / mL, respectivamente). Outra observação dos estudos refere-se ao fato que a liberação do fator de crescimento apresentou-se dependente do tempo, no qual o aumento do tempo de exposição resultou em maiores quantidades de TGF- β 1 liberadas (GALLER et al., 2015). Esse mesmo estudo também notou que quando o condicionamento por EDTA é precedido pela utilização de Clorexidina durante 5 minutos há um aumento na quantidade de TGF- β 1, porém quando as amostras eram irrigadas com NaOCl antes do condicionamento com EDTA havia uma redução significativa na liberação de TGF- β 1 (GALLER et al., 2015). Adicionalmente, observou-se que sob condições infectadas havia uma redução significativa na liberação de TGF- β 1 em comparação com os mesmos irrigantes aplicados em amostras estéreis (CAMERON et al., 2019). Já a liberação de outros fatores, como o FGF-2 e VEGF após condicionamento da dentina mostrou-se também dependente do tempo, mas em níveis mais baixos quando comparado ao TGF- β 1 (GALLER et al., 2015). Outro achado relevante destaca o aumento significativo da liberação dos fatores de crescimento após a

ativação das substâncias químicas por meio de Ultrassom de forma Passiva, Laser Er: YAG com ponta PIPS (HANCERLIOGULLARI et al., 2021; ERDEMIR & KISA, 2021; WIDBILLER et al., 2017). De uma forma geral, observou-se o potencial de ação de soluções irrigadoras condicionantes na liberação de fatores de crescimento fossilizados na dentina. A maioria dessas substâncias parecem ser compostas por ácidos que atuam desmineralizando a dentina e permitindo a extração de fatores de crescimento da dentina. Entretanto, mais estudos que possam esclarecer o melhor protocolo de condicionamento bem como investigar outros aspectos que possam interferir na ação desses fatores de crescimento se fazem necessários para possibilitar que tratamentos conservadores e regenerativos a partir de componentes presentes naturalmente na dentina possam ser mais especificamente utilizados.

Diante desses resultados, observa-se a relevância do emprego de materiais bioativos na liberação de fatores de crescimento que irão atuar no processo de reparo e regeneração tecidual tanto em terapias vitais da polpa (capeamentos pulpare, pulpotomias) quanto em tratamentos endodônticos regenerativos. Entretanto, mais estudos são necessários para se estabelecer o protocolo de soluções irrigadoras e materiais reparadores que seja mais efetivo na liberação de fatores de crescimento, bem como diferentes tipos de fatores de crescimento mais específicos para cada tratamento poderiam ser investigados.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

De uma forma geral, observou-se o potencial de ação das substâncias químicas rotineiramente utilizadas no tratamento endodôntico como condicionantes na liberação de fatores de crescimento fossilizados na dentina. A maioria dessas substâncias parecem ser compostas por ácidos que atuam na desmineralização da dentina e permitindo a extração de fatores de crescimento. Esses fatores de crescimento poderão atuar no processo de reparo e regeneração tecidual tanto em terapias vitais da polpa (capeamentos pulpare, pulpotomias) quanto em tratamentos endodônticos regenerativos. Entretanto, mais estudos que possam esclarecer o melhor protocolo de condicionamento bem como investigar outros fatores que possam interferir na ação desses fatores de crescimento se fazem necessários para possibilitar que tratamentos conservadores e regenerativos a partir de componentes presentes naturalmente na dentina possam ser mais especificamente utilizados. Além disso, estudos clínicos que contribuam para se estabelecer um protocolo mais efetivo na liberação de fatores de crescimento, bem como diferentes tipos de fatores de crescimento mais específicos para cada tratamento poderiam ser investigados visando uma Endodontia minimamente invasiva.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, Panuroot; LINSUWANONT, Pairoj. *Vital pulp therapy in vital permanent teeth with cariously exposed pulp: A systematic review*. **Journal of Endodontics**. [S.l: s.n.], 2011

AKSEL, Hacer *et al.* Dentin Conditioning Protocol for Regenerative Endodontic Procedures. **Journal of Endodontics**, 2020.

ALGHILAN, M. A. *et al.* Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. **International Endodontic Journal**, 2017.

ATESCI, Alp Abidin *et al.* Effect of Different Dentin Conditioning Agents on Growth Factor Release, Mesenchymal Stem Cell Attachment and Morphology. **Journal of Endodontics**, 2020.

CAMERON, Ritter *et al.* Effect of a Residual Biofilm on Release of Transforming Growth Factor β 1 from Dentin. **Journal of Endodontics**, 2019.

CAPLAN, Arnold I.; DENNIS, James E. *Mesenchymal stem cells as trophic mediators*. **Journal of Cellular Biochemistry**. [S.l: s.n.], 2006

CHAE, Y.; YANG, M.; KIM, J. Release of TGF- β 1 into root canals with various final irrigants in regenerative endodontics: an in vitro analysis. **International Endodontic Journal**, 2018.

COUVE, E.; OSORIO, R.; SCHMACHTENBERG, O. Reactionary dentinogenesis and neuroimmune response in dental caries. **Journal of Dental Research**, 2014.

DENIZ SUNGUR, D. *et al.* Effect of dentine conditioning with phytic acid or etidronic acid on growth factor release, dental pulp stem cell migration and viability. **International Endodontic Journal**, 2019.

ENDODONTISTS, American Association of. Glossary of Endodontic Terms 2016. **Glossary of Endodontic Terms**, 2015.

GALLER, K. M. *et al.* EDTA conditioning of dentine promotes adhesion, migration and differentiation of dental pulp stem cells. **International Endodontic Journal**, 2016.

GALLER, Kerstin M. *et al.* Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. **Journal of Endodontics**, 2011.

GALLER, Kerstin M. *et al.* Influence of root canal disinfectants on growth factor release from dentin. **Journal of Endodontics**, 2015.

GOLDBERG, Michel *et al.* Inflammatory and immunological aspects of dental pulp repair. **Pharmacological Research**, 2008.

GOLDBERG, Michel *et al.* *The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry*. **Dental Clinics of North America**. [S.l: s.n.], 2006

GRAHAM, Lee *et al.* The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. **Biomaterials**, 2006.

- HANCERLIOGULLARI, Dilek; ERDEMIR, Ali; KISA, Ucler. The effect of different irrigation solutions and activation techniques on the expression of growth factors from dentine of extracted teeth. **International Endodontic Journal** n. September 2020, p. 1–10, 2021.
- HARGREAVES, Kenneth M.; DIOGENES, Anibal; TEIXEIRA, Fabricio B. Treatment options: Biological basis of regenerative endodontic procedures. 2013, [S.l.: s.n.], 2013.
- HOWARD, Cameron; MURRAY, Peter E.; NAMEROW, Kenneth N. Dental pulp stem cell migration. **Journal of Endodontics** , 2010.
- IVICA, Anja *et al.* Biomimetic Conditioning of Human Dentin Using Citric Acid. **Journal of Endodontics** , 2019.
- KAUSHIK, Sagar N. *et al.* Biomimetic microenvironments for regenerative endodontics. **Biomaterials Research**. [S.l.: s.n.] , 2016
- L., Sadaghiani *et al.* Growth Factor Liberation and DPSC Response Following Dentine Conditioning. **Journal of dental research** , 2016.
- LI, Yucheng *et al.* Odontoblast-like cell differentiation and dentin formation induced with TGF- β 1. **Archives of Oral Biology** , 2011.
- MAGLOIRE, H. *et al.* Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. **Advances in dental research**. [S.l.: s.n.] , 2001
- MARTIN, David E. *et al.* Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. **Journal of Endodontics** , 2014.
- MAUMUS, Marie *et al.* Mesenchymal stem cell-based therapies in regenerative medicine: Applications in rheumatology. **Stem Cell Research and Therapy**. [S.l.: s.n.] , 2011.
- NIWA, Takahiko *et al.* The dynamics of TGF- β in dental pulp, odontoblasts and dentin. **Scientific Reports** , 2018.
- RUFAS, Pierre *et al.* Complement C3a Mobilizes Dental Pulp Stem Cells and Specifically Guides Pulp Fibroblast Recruitment. **Journal of Endodontics** , 2016.
- RUPAREL, Nikita B. *et al.* Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. **Journal of Endodontics** , 2012.
- SALEHI, Satin *et al.* Dentin matrix components extracted with phosphoric acid enhance cell proliferation and mineralization. **Dental Materials** , 2016.
- SLOAN, A. J.; SMITH, A. J. *Stem cells and the dental pulp: Potential roles in dentine regeneration and repair*. **Oral Diseases**. [S.l.: s.n.] , 2007
- SMITH, A. J. *et al.* Reactionary dentinogenesis. **International Journal of Developmental Biology** , 1995.
- SMITH, Anthony J. *et al.* Exploiting the Bioactive Properties of the Dentin-Pulp Complex in Regenerative Endodontics. **Journal of Endodontics**. [S.l.: s.n.] , 2016

TAKAHASHI, M. *et al.* The importance of size-exclusion characteristics of type I collagen in bonding to dentin matrices. **Acta Biomaterialia** , 2013.

TREVINO, Ernesto G. *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. **Journal of Endodontics** , 2011.

VIOLICH, D. R.; CHANDLER, N. P. *The smear layer in endodontics - A review*. **International Endodontic Journal**. [S.l.: s.n.], 2010

WATTANAPAKKAVONG, Kuntada; SRISUWAN, Tanida. Release of Transforming Growth Factor Beta 1 from Human Tooth Dentin after Application of Either ProRoot MTA or Biodentine as a Coronal Barrier. **Journal of Endodontics** , 2019.

WIDBILLER, M. *et al.* Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. **Clinical Oral Investigations** , 2017a.

WIDBILLER, M. *et al.* Ultrasonic activation of irrigants increases growth factor release from human dentine. **Clinical Oral Investigations** v. 21, n. 3, p. 879–888 , 2017b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00784-016-1824-1>>.

YU, Bo; ZHANG, Xiaomin; LI, Xiaorong. *Exosomes derived from mesenchymal stem cells*. **International Journal of Molecular Sciences**. [S.l.: s.n.], 2014

ZANINI, Marjorie; HENNEQUIN, Martine; COUSSON, Pierre Yves. *A Review of Criteria for the Evaluation of Pulpotomy Outcomes in Mature Permanent Teeth*. **Journal of Endodontics**. [S.l.: s.n.], 2016

ZEHNDER, Matthias *et al.* Cytokine gene expression - Part of host defence in pulpitis. **Cytokine** , 2003.
ZEHNDER, Matthias. *Root Canal Irrigants*. **Journal of Endodontics**. [S.l.: s.n.], 2006

ZENG, Qian *et al.* Release of Growth Factors into Root Canal by Irrigations in Regenerative Endodontics. **Journal of Endodontics** , 2016.