

Efecto de los irrigantes sobre la resistencia a la fractura de premolares

Effect of irrigant solutions on fracture resistance of premolars

Constanza Martin Rollan¹, Andrea Kaplan², Gabriela Martin^{1,3}

¹ Universidad Católica de Córdoba. Facultad de Ciencias de la Salud. Carrera de Especialización de Endodoncia

² Universidad de Buenos Aires. Facultad de Odontología. Cátedra de Materiales Dentales.

³ Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Odontología. Cátedra de Endodoncia.

Correspondencia: Gabriela Martín. Universidad Católica de Córdoba. Carrera de Endodoncia, Córdoba, Argentina. Email: ggmartin@hotmail.com

Resumen

INTRODUCCIÓN: La endodoncia regenerativa ha sido definida como procedimientos basados biológicamente y diseñados para reemplazar estructuras perdidas, incluyendo dentina y estructuras radiculares, y células del complejo dentino-pulpar con tejidos vivos. Ha sido considerada una alternativa para el tratamiento de dientes permanentes jóvenes con ápices inmaduros y necrosis pulpar. El procedimiento clínico se basa en la desinfección y posterior formación de un coágulo de sangre en el conducto radicular. Las soluciones irrigantes como el hipoclorito de sodio (NaOCl) y EDTA se usan no sólo para la desinfección sino también para el acondicionamiento de la dentina, con el fin de liberar factores de crecimiento de la matriz dentinaria, que guían la diferenciación celular.

OBJETIVO: Evaluar el efecto de la irrigación sobre la resistencia a la fractura de premolares tratados con el protocolo para endodoncia regenerativa, con hipoclorito de sodio y con irrigación final con EDTA.

MATERIALES Y METODOS: Se seleccionaron 10 pares de premolares humanos extraídos homólogos, a los cuales se tomaron fotografías y radiografías periapicales. Se realizaron las aperturas camerales correspondientes, se prepararon los conductos con ensanchador de Peeso para simular un diente inmaduro con ápice abierto y se envolvieron las raíces con teflón para simular el ligamento periodontal. Los 20 dientes se dividieron en 2 grupos de 10 premolares cada uno (n=10), asegurando que en cada grupo hubiera un premolar homólogo de cada par. Grupo A (control) se irrigó con NaOCl al 2,5% y el grupo B (experimental) se irrigó con NaOCl al 2,5% seguido de EDTA al 17%. Posteriormente, se selló el tercio coronario del conducto y la cavidad de acceso con Biodentine. Las muestras fueron seccionadas transversalmente a 3 mm coronarios al límite amelo cementario y fueron montadas en una resina de composite para mantener los premolares verticales en una máquina universal para ensayos mecánicos (Instron Corp, Canton, MA, USA). Se aplicó una carga compresiva con una velocidad de desplazamiento de cabezal de 1 mm/minuto sobre la raíz apoyada sobre un cono de acero que ejerció un efecto cuña y se determinó la fuerza necesaria para fracturar la raíz. Los resultados fueron analizados estadísticamente con prueba T.

RESULTADOS: La media de la fuerza (N) necesaria para generar la fractura de las raíces en el grupo donde se usó sólo NaOCl fue de 337,84, mientras que para el grupo donde se usó EDTA e NaOCl fue de 345,54. Al comparar ambos grupos con la prueba de t, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

CONCLUSIONES: La irrigación final con EDTA no disminuyó la resistencia a la fractura de premolares con ápices inmaduros previamente irrigados con hipoclorito de sodio al 2,5%.

Palabras claves: premolares, tratamiento de irrigación, EDTA, resistencia a la fractura, endodoncia regenerativa

Abstract

INTRODUCTION: Regenerative endodontic procedures have been defined as biological procedures designed to replace damaged structures including dentin and radicular structures, as well as cells of the dentin complex, with vital tissue. They are considered as an alternative for treatment immature permanent teeth with necrotic pulp. The clinical procedure is based in disinfection and subsequent a blood clot formation in the root canal. Sodium hypochlorite (NaOCL) and EDTA are irrigation solutions frequently used not only for disinfection but also for dentin conditioning, in order to release growth factors from dentin matrix to guide stem cells differentiation. The hypothesis of the present study is that final irrigation of root canal with EDTA decreases fracture resistance in immature human teeth.

OBJECTIVE: Evaluate the effect of irrigation with EDTA on the fracture resistance of premolars with open foramen, previously irrigated with sodium hypochlorite.

MATERIALS AND METHODS: Ten pairs of healthy human premolars were selected, extracted for orthodontic reasons. They were photographed and preoperative radiograph were taken. The access cavity was performed, root canals were instrumented and Peeso drills were used to simulate immature teeth. The external surfaces of the root were covered with teflon band to simulate a periodontal ligament. The twenty teeth were randomly assigned into two groups of ten premolars each (n=10). Group A (control) was irrigated with NaOCL 2.5% and group B (experimental) was irrigated with NaOCL 2.5% followed by 17% EDTA. The access cavity was sealed with Biodentine and the crown was sectioned 3 mm coronal to the CEJ. Samples were mounted in a composite resin, in order to keep them up perpendicularly to support base, placed in an Instron testing machine (InstronCorp, Canton, MA, USA). By displacement of the machine's head, a metal cone produced a wedge effect on the root. The compressive force necessary to result in root fracture was determined with a head speed displacement of 1mm per min. The force required to root fracture was registered as Newton values. Data was statistically analyzed by using T test ($P < 0,05$).

RESULTS: The force required to fracture the roots of premolars irrigated with NaOCL was of 337,84 Newton (mean value); while in the group irrigated with NaOCL followed by EDTA was of 345,54 Newton. The difference was not statistically significant when comparing both groups by the t test ($p > 0,05$).

CONCLUSION: The final irrigation with EDTA did not reduce fracture resistance of premolars with immature apex, previously irrigated with 2.5% sodium hypochlorite.

KeyWords: bicuspid, therapeutic irrigation, EDTA, fracture strength, regenerative endodontic.

Introducción

La terapia endodóntica regenerativa ha sido definida como procedimientos basados biológicamente diseñados para reemplazar estructuras perdidas, incluyendo dentina y estructuras radicales, como así también células del complejo dentino-pulpar con tejidos vivos^{1,2}. Según la Asociación Dental Americana (ADA), la endodoncia regenerativa incluye tratamientos como el recubrimiento pulpar, apexificación, revascularización, regeneración pulpar, terapias con células madre e ingeniería tisular³. Estos procedimientos han surgido como un tratamiento alternativo para dientes permanentes jóvenes con ápice inmaduro y necrosis pulpar, cuyos objetivos son no sólo el tratamiento de la periodontitis apical, sino promover un continuo desarrollo radicular, inmunocompetencia y nocicepción normal del tejido pulpar⁴. Los dientes con ápices inmaduros, con un diagnóstico de necrosis pulpar se han tratado tradicionalmente con

procedimientos de apexificación⁵. Desafortunadamente, estos tratamientos proporcionan poco o ningún beneficio en el desarrollo continuo radicular ya que es cuestionable el pronóstico a largo plazo, por las paredes delgadas y frágiles de dentina y falta de inmunocompetencia. Por lo cual, se aumenta la susceptibilidad a las fracturas y poseen menor tasa de supervivencia⁶.

La desinfección química del sistema de conductos radicales constituye una de las etapas más importantes para lograr el éxito en endodoncia regenerativa. Tradicionalmente, los irrigantes y medicamentos han sido elegidos por su acción antimicrobiana sin tener en cuenta sus efectos sobre las células madre y el micro entorno del conducto⁷

En este aspecto, la reducción bacteriana es crucial para lograr la regeneración en los conductos radicales con ápices inmaduros que presentan

una pared dentinaria delgada y frágil. Es por ello, que se indica una mínima instrumentación mecánica de las paredes radiculares. En los últimos años, se modificó el protocolo de irrigación de los conductos inmaduros tratados con endodoncia regenerativa. Este protocolo se basa en el uso de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 1,5 % seguido de ácido etilendiaminotetracético al 17% (EDTA)⁸. El NaOCl es la solución de irrigación más utilizada en el tratamiento endodóntico, incluyendo procedimientos de endodoncia regenerativa, por sus propiedades antimicrobiana, lubricante, blanqueante, desodorizante, pero fundamentalmente, por su capacidad de disolver la materia orgánica⁹. El poder solvente dependerá de la cantidad de materia orgánica e NaOCl presente, de la concentración de la solución, de la superficie de contacto entre el tejido y la solución, y la frecuencia de la irrigación. En consecuencia, la irrigación deberá ser abundante, renovando la solución con frecuencia, para obtener el máximo efecto del NaOCl.

La concentración de la solución de NaOCl considerada como la más apropiada ha sido motivo de discusión desde hace ya muchos años. Dada la amplitud del espectro de acción de las diferentes concentraciones sugeridas, parecería más aceptable establecer un balance entre la eficacia para destruir los microorganismos y la tolerancia biológica de los tejidos¹⁰. Esto significa, que cada operador puede seleccionar la concentración de su preferencia, teniendo en cuenta no solamente la capacidad antibacteriana, sino también la toxicidad demostrada por las concentraciones más altas^{9,10}; ya que, a mayor concentración, la solución es más efectiva en menor período de tiempo, sin embargo, presenta mayor citotoxicidad. El NaOCl es usado en diferentes concentraciones que varían de 0,5% a 5,25%, y se ha demostrado que posee acción antimicrobiana sobre bacterias, hongos, esporas y virus.

En los últimos años, el uso de EDTA ha despertado gran interés por su propiedad quelante, ya que remueve el componente inorgánico de la dentina, facilitando la limpieza y remoción de tejido infectado. Hace años, el EDTA era considerado sólo como ensanchador químico para la instrumentación de conductos estrechos, hasta que en un estudio publicado por Orstavick y Haapasalo en 1990¹¹ se demostró que la remoción del barro dentinario con EDTA mejora el efecto antibacteriano de agentes desinfectantes locales en capas profundas de la dentina. Goldberg y col^{12,13} observaron que el EDTA, al actuar sobre la porción inorgánica del barro dentinario, conjuntamente con NaOCl, lo remueve de las paredes dentinarias, eliminando de esta manera los microorganismos presentes en él. En el tratamiento de endodoncia regenerativa, Diógenes y col⁸

demonstraron que las soluciones irrigantes son utilizadas para una adecuada desinfección del conducto, pero a su vez, crean un microambiente propicio para la supervivencia y diferenciación de las células madre. Lovelace y col¹⁴, en un estudio in vitro observaron que un número considerable de células mesenquimales indiferenciadas, son liberadas al sistema de conductos radiculares durante los procedimientos de endodoncia regenerativa. Este hallazgo representó un punto de inflexión porque los protocolos de irrigación utilizados anteriormente en los procedimientos de endodoncia regenerativa apuntaban a proporcionar la máxima desinfección sin tener en cuenta su efecto sobre las células madre.

La endodoncia regenerativa actual se basa en los principios de la bioingeniería tisular con respecto a la interacción entre células madre, matriz biológica y factores de crecimiento¹⁵. El uso de soluciones químicas de irrigación en el conducto radicular, tienen como objetivo no sólo la desinfección del conducto con NaOCl, sino también el acondicionamiento de la dentina con EDTA, para aumentar la liberación de factores de crecimiento y proteínas presentes en la matriz dentinaria^{16,17,18}, constituyéndose en importantes señalizadores moleculares para la proliferación y diferenciación celular^{19,20,21}.

Por otra parte, ha sido demostrado el efecto de la secuencia de los irrigantes sobre las propiedades mecánicas de la dentina radicular, observándose erosión dentinaria cuando se usó en forma alternada el NaOCl con EDTA; y más aún, cuando se irrigó con NaOCl a altas concentraciones posterior al uso de EDTA^{22,23}.

Objetivo

Evaluar el efecto de la irrigación con EDTA sobre la resistencia a la fractura de premolares con forámenes abiertos, previamente irrigados con hipoclorito de sodio.

Material y métodos

Tipo de Investigación: Prospectivo experimental

Características generales: 10 pares de premolares homólogos superiores e inferiores humanos sanos. Los mismos se obtendrán de pacientes que concurren a la Cátedra de Cirugía de Carrera de Odontología de Universidad Católica de Córdoba. Los mismos firmaron el correspondiente consentimiento informado que se encuentra en la historia clínica.

Criterios de inclusión: premolares superiores e inferiores, homólogos sanos de un mismo paciente, unirradiculares, con un solo conducto, con

indicación para la extracción por razones de ortodoncia.

Criterios de exclusión: premolares que presenten caries en porción coronaria, conductos radiculares estrechos o curvas pronunciadas.

Criterios de eliminación: dientes que no presenten su homólogo, pares con anatomías radiculares complejas.

Método y diseño

El presente estudio se realizó en dos etapas:

Primera Etapa: Selección y preparación de los especímenes.

Inmediatamente extraídos, los dientes fueron desinfectados con solución de iodopovidona, se limpió la superficie externa radicular con curetas para eliminar tejido blando adherido y se conservaron en solución fisiológica estéril, según el protocolo de desinfección propuesto por Martin y col²¹. Se procedió a tomar fotografías con microscopio Newton y se realizaron radiografías periapicales en sentido ortorradiar y proximal.

Posteriormente, se tallaron las aperturas camerales con piedra troncocónica (Microdont 2067). Se realizó cateterismo con lima K #20 (Dentsply-Maillefer-Suiza). Con ensanchador de Peeso #2 y #3 se ensanchó el conducto radicular para simular un diente inmaduro con ápice abierto, pasando a través del foramen con el ensanchador.

Se determinó la longitud de trabajo, 1 mm más corto del ápice radicular, para lo cual se atravesó con lima K#20 (Dentsply-Maillefer-Suiza) el foramen; y apenas se observó la punta de la lima, se registró esa longitud. Posteriormente, se restó 1 mm a la misma. Se envolvieron las raíces con cinta teflón para simular el ligamento periodontal y que el líquido de irrigación no extruya a través del foramen.

Los 20 premolares se dividieron en 2 grupos experimentales de 10 elementos cada uno (n=10), conteniendo cada grupo un premolar homólogo de cada par. Esta forma se aplicó para cada par de premolares y se tomaron fotografías con microscopio estereoscópico (Newton, Buenos Aires, Argentina). Cada Pieza dentaria se colocó en tubo de eppendorf y a su vez cada par en un recipiente con alginato para mantenerlos fijos. En el grupo experimental se aplicó el protocolo de irrigación propuesto por Diógenes y col en 2014³ para endodoncia regenerativa

Grupo Control (A): los conductos se irrigaron con 20 ml de NaOCl 2.5% durante 10 minutos, seguido de 40 ml de solución fisiológica.

Grupo Experimental (B): los conductos se irrigaron con 20 ml de NaOCl 2.5% durante 10 minutos. Seguido de 5 ml de solución salina. Luego 20 ml EDTA 17% durante 10 min.

Finalmente, se irrigaron con 20 ml solución salina. Se secaron con conos de papel.

Todos los dientes fueron irrigados con jeringa Tipo Lúer con aguja calibre 21 G. Para ello cada irrigante se fue descargando 2 ml, se dejó actuar 1 min y se continuó renovando el irrigante con 2 ml más y así sucesivamente hasta completar 20 ml en 10 min. Se secaron los conductos con conos de papel.

Luego de realizar el protocolo de irrigación se llevó al conducto una membrana de colágeno con la finalidad que sirva de tope para la posterior colocación del material de sellado. Se procedió a preparar y colocar Biodentine (Septodont), en los 3 mm coronarios del conducto radicular y en la cavidad de acceso coronario. El mismo se compactó con el condensador de Machtou azul, hasta que no quedaran espacios vacíos. Se tomaron radiografías periapicales de control.

Segunda Etapa: Prueba de la resistencia a la fractura.

Las muestras se colocaron en tubos eppendorf y fueron enviados a la Cátedra de Materiales Dentales UBA donde se le realizó la segunda etapa, la prueba a la resistencia a la fractura, según el protocolo publicado por Goldberg y col 2002²⁴. Las muestras fueron montadas en una resina de composite para mantener los premolares verticales, perpendiculares a la base de soporte. Se fijó un cono de acero inoxidable (de 1,5 cm de base por 3 cm de altura) a la máquina Instron (InstronCorp, Canton, MA, USA). Se desplazó el cabezal de la máquina y el cono de acero ejerció un efecto cuña sobre la raíz. La fuerza compresiva necesaria para fracturar la raíz fue determinada con una velocidad de desplazamiento del cabezal de 1 mm por minuto.

Análisis estadístico

Los datos fueron recolectados en una "Hoja de Captura de Datos". Para el análisis estadístico, los datos fueron evaluados con la prueba T.

Consideraciones éticas

El estudio se realizó cumpliendo con la normativa de la Declaración de Helsinki, Buenas Prácticas Clínicas de ANMAT y Ley Provincial de investigación en salud N° 9694. Se asegura protección de datos personales de los pacientes según la Ley 25.326. Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

Resultados

Cada una de las piezas dentarias fue sometida a una fuerza de compresión de 1 mm/min en la máquina

Intrón, en la cual se registró la fuerza ejercida en el momento de la fractura (Figura 1 y 2).

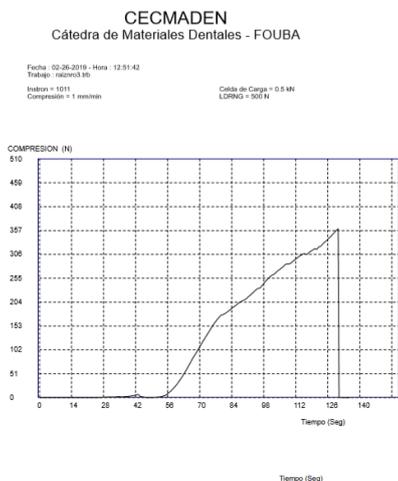


Figura 1. Gráfico generado por el ensayo mecánico sobre el grupo control.

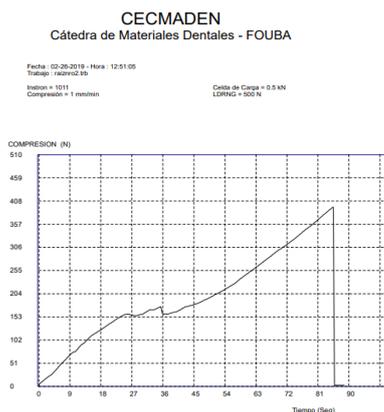


Figura 2. Gráfico generado por el ensayo mecánico en el grupo experimental.

Tabla 1. Media y DE: desviación estándar (expresada en N) de la fuerza necesaria para fracturar la pieza dentaria

	Grupo A	Grupo B
Media	337,84	345,54
DE	100,26	72,61

En la (Tabla 1) se expresan los valores correspondientes a la fuerza necesaria para generar la fractura de las raíces, expresada en Newton (N). Al comparar ambos grupos con la prueba de t, las diferencias no resultaron estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

Discusión

La utilización de soluciones irrigantes en las etapas de limpieza y conformación de los conductos radiculares de dientes permanentes jóvenes con ápices inmaduros es crucial no sólo para la desinfección del conducto, con NaOCl, sino también, para el acondicionamiento de la dentina con EDTA, para aumentar la liberación de factores de crecimiento y proteínas presentes en la matriz dentinaria^{16,17,18}, constituyéndose en importantes señalizadores moleculares para la proliferación y diferenciación celular^{19,20}. Martín y col²¹ evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de NaOCl sobre la sobrevivencia de células madre de papila apical y observaron que hubo una importante reducción celular cuando se usó NaOCl al 6%. Sin embargo, aumentó la proliferación celular cuando se irrigó con EDTA al 17% posterior a NaOCl. Los mejores resultados se observaron cuando se usó NaOCl al 1,5% seguido de EDTA al 17%. Del mismo modo, Bracks y col. en 2019²⁵ en un estudio in vitro, concluyeron que el uso del EDTA en la etapa final del tratamiento endodóntico, promovió una mayor expresión de factores de crecimiento, que tienen el potencial de aumentar la proliferación y diferenciación celular en el tratamiento de regeneración pulpar. Por otro lado, Niu W y col en 2002²⁶ estudiaron la erosión dentinaria causada por la irrigación final con EDTA e NaOCl, con microscopía electrónica de barrido; y observaron que cuando el conducto radicular fue irrigado sólo con EDTA, los orificios de los túbulos dentinarios fueron regulares. Mientras que cuando se irrigó con NaOCl al 6%, posterior al uso de EDTA al 15% en la irrigación final, dejó orificios de los túbulos dentinarios irregulares y rugosos. Del mismo modo, Mai y col. en 2010²⁷ comprobaron una acción agresiva del EDTA causando erosión en la pared del conducto radicular por el uso prolongado de NaOCl. La inmersión de bloques dentinarios en NaOCl durante 60 minutos, previo al uso de EDTA, disminuyó significativamente la fuerza flexural, que cuando fueron sumergidos durante 10 minutos. En ambos grupos, la irrigación con EDTA durante 2 minutos creó una capa de desmineralización de 0,5 micrómetros, similar para ambos grupos. Sin embargo, la erosión extensiva de la dentina radicular se observó sólo cuando fueron inmersos en NaOCl durante 60 minutos, demostrando un efecto directo del tiempo de exposición de la dentina al NaOCl sobre la fuerza flexural de la dentina. Los resultados de nuestro estudio concuerdan con estos hallazgos, donde la irrigación de las piezas dentarias con NaOCl durante 10 minutos, seguido de una irrigación final con EDTA no disminuyó la resistencia a la fractura.

Conclusiones

En las condiciones en que se realizó este trabajo puede concluirse que la irrigación final con EDTA no afectaría significativamente la fuerza necesaria para producir la fractura de premolares con ápices inmaduros, previamente irrigados con hipoclorito de sodio al 2,5%.

Bibliografía

1. Murray P.E, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod.*, 2007, 33(4), 377-90.
2. Martín G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod.* 2013 Jan;39(1):138-44.
3. Gracia-Godoy F, Murray P.E. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dental Traumatol.*, 2011,28(1), 33-41.
4. Lin M, Kim S, Martín G, Kahler B. Continued root maturation despite persistent apical periodontitis of immature permanent teeth after failed regenerative endodontic therapy. *Australian Endodontic Journal*, 2018 Dec;44(3):292-299. doi: 10.1111/aej.12252.
5. Vidal K, Martín G, Lozano O, Salas M. Apical closure in apexification: a review and case report of apexification treatment of an immature permanent tooth with Biodentine. *J Endod*, 2016, 42(5), 730-4.
6. Jeeruphan T, Jantarat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves K.M. Mahidol Study 1: Comparison of Radiographic and Survival Outcomes of Immature Teeth Treated with Either Regenerative Endodontic or Apexification Methods: A Retrospective Study. *J Endod.*, 2012, 38(10), 1330-1336.
7. Diogenes A.R; Ruparel N; Teixeira F. 2014. Translational Science in Disinfection for Regenerative Endodontics. *J Endod.*, 2014, 40(4), 52-57.
8. Diogenes A.R, Henry M.A, Teixeira F.B, Hargreaves K.M. 2014. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics*, 201328(1), 2-23.
9. Azuero M, Herrera C. Irrigantes De Uso Endodóntico. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia.2003.
10. Blomfield S.F, Miles GA. (1979). The antibacterial properties of sodium hypochlorite formulations. *J ApplBacteriol.* 1979,46, 65-73
11. Orstavik D, Haapasalo M. Disinfection by endodontic irrigants and dressings of experimentally infected dentinal tubules. *Dental Traumatology*, 1990 6(4), 142-149.
12. Goldberg F, Abramovich A. Analysis of the effect of EDTA on the dentinal walls of the root canal. *J Endod*, 19770, 3, 101-105.
13. Goldberg F, Artaza L, Alfie D. Capacidad de diferentes procedimientos de irrigación para la remoción del barro dentinario del orificio pulpar de conductos laterales simulados. *RAOA*, 2010. 98:113-118.
14. Lovelace T.W, Henry M.A, Hargreaves K.M. 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, 133-8.
15. Langer R, Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science* 1993, 260, 920-6.
16. Arany PR, CHO A, Hunt CD. Photoactivation of endogenous latent transforming growth factor- β 1 directs dental stem cell differentiation for regeneration. *Sci Transl Med*, 2014, 6: 238-69.
17. Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta 1(TGF- β 1) in dentine matrix: ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci*, 1998, 106: 179-84.
18. Sloan AJ, Moseley R, Dobie K, Wadlington RJ, Smith AJ. TGF- β latency-associated peptides (LAPs) in human dentin matrix and pulp. *Conn Tiss Res.* 2002, 43, 381-6.
19. Treverino EG, Patwrdhan AN, Henry MA. 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, 1109-15.
20. Galler KM, DE Souza RN, Federlin M. Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod*, 2011,37: 1536-41.
21. Martin DE, DE Almeida JF, Henry M, Khaing

- Z. Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *J Endod*, 2014, 40, 51-55.
22. Marending M, Paque F, Fischer J, Zehnder M. Impact of Irrigant Sequence on Mechanical Properties of Human Root Dentin. *J Endod*, 2007, 33(11), 1325-1328.
23. Qjan W, Shen Y, Haapasalo M. Quantitative Analysis of the Effect of Irrigant Solution Sequences on Dentin Erosion. *J Endod*, 2011, 37(10), 1437-1441.
24. Goldberg F, Kaplan A, Roitman M, Manfré S, Picca M. Reinforcing effect of a resin glass ionomer in the restoration of immature roots in vitro. *Dent Traumatol*. 2002 Apr;18(2):70-2.
25. Bracks IV, Espaladori MC, Barros P, DE Brito LCN, Vieira LQ, Ribero Sobrinho AP. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid irrigation on immune-inflammatory response in teeth submitted to regenerative endodontic therapy. *Int Endod J*. 2019 Oct;52(10):1457-1465.
26. Niu W, Yoshioka T, Kobayashi C, Suda H. A scanning electron microscopic study of dentinal erosion by final irrigation with EDTA and NaOCl solutions. *Int Endod J*, 2002 35(11), 934-939.
27. Mai S, Kim Y, Arola D, GU, Kim J.R, Pashley D, Tay F. Differential aggressiveness of ethylenediamine tetraacetic acid in causing canal Wall erosion in the presence of sodium hypochlorite. *J Dentistry*, 2010, 201-206.

