



JULIANA YURI NAGATA

**“EVALUATION OF TRAUMATIZED IMMATURE TEETH
TREATED WITH TWO PULP REVASCULARIZATION
PROPOSALS”**

***“AVALIAÇÃO DE DENTES TRAUMATIZADOS COM
RIZOGÊNESE INCOMPLETA SUBMETIDOS A DUAS
PROPOSTAS DE REVASCULARIZAÇÃO PULPAR”***

PIRACICABA

2013



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

JULIANA YURI NAGATA

**“EVALUATION OF TRAUMATIZED IMMATURE TEETH TREATED WITH TWO PULP
REVASCULARIZATION PROPOSALS”**

Orientadora: Profa. Dra. Adriana de Jesus Soares

Co-Orientadora: Profa. Dra. Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

***“AVALIAÇÃO DE DENTES TRAUMATIZADOS COM RIZOGÊNESE
INCOMPLETA SUBMETIDOS A DUAS PROPOSTAS DE
REVASCULARIZAÇÃO PULPAR”***

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutora em Clínica Odontológica com área de concentração em Endodontia.

Doctorate thesis presented to the Clinical Dentistry Post-Graduate Program of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas to obtain the Ph.D. grade in Clinical Dentistry with major in Endodontics.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DE DOUTORADO DEFENDIDA PELA
ALUNA JULIANA YURI NAGATA, ORIENTADA
PELA PROF^a. DR^a. ADRIANA DE JESUS SOARES.

Assinatura da Orientadora

PIRACICABA
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARILENE GIRELLO – CRB8/6159 - BIBLIOTECA DA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

N131a

Nagata, Juliana Yuri, 1986-
Avaliação de dentes traumatizados com rizogênese
incompleta submetidos a duas propostas de revascularização
pulpal / Juliana Yuri Nagata. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Adriana de Jesus Soares.
Coorientador: Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas,
Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Ápice dentário. 2. Necrose da polpa dentária. 3. Células-
tronco. I. Soares, Adriana de Jesus. II. Gomes, Brenda Paula
Figueiredo de Almeida, 1961- III. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

Informações para a Biblioteca Digital

Título em Inglês: Evaluation of traumatized immature teeth treated with two
pulp revascularization proposals

Palavras-chave em Inglês:

Tooth apex

Dental pulp necrosis

Stem cells

Área de concentração: Endodontia

Titulação: Doutora em Clínica Odontológica

Banca examinadora:

Adriana de Jesus Soares [Orientador]

Mitsue Fujimaki Hayacibara

Patrícia Helena Pereira Ferrari

Francisco José de Souza Filho

Alexandre Augusto Zaia

Data da defesa: 10-06-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Odontológica



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 10 de Junho de 2013, considerou a candidata JULIANA YURI NAGATA aprovada.

Profa. Dra. ADRIANA DE JESUS SOARES

Profa. Dra. MITSUE FUJIMAKI HAYACIBARA

Profa. Dra. PATRICIA HELENA PEREIRA FERRARI

Prof. Dr. FRANCISCO JOSÉ DE SOUZA FILHO

Prof. Dr. ALEXANDRE AUGUSTO ZAIA

*D*EDICATÓRIA

À minha mãe **Clara Nagata**, pela demonstração de amor incondicional, que não cobra, que não machuca, e só ampara. Pelo interesse e prática incessante da minha felicidade e por me ensinar que tudo vale a pena porque estás ao meu lado. Sua força e grandeza me fazem admirá-la mais a cada dia. *Cada passo em minha vida será dado pensando sempre em você!*

Ao meu pai **Hiromitsu Nagata**, por me fazer sentir amada e amparada. Por me ensinar com o mais sincero e verdadeiro amor a importância da honestidade e humildade. Meu amor e admiração por ti são infinitos! Tudo que faço sempre será pensando em você! *És o meu herói que me dá forças e fé para voar...*

*A*GRADECIMENTOS

A Deus...

Pela minha vida, saúde, pelos meus pais, pelos meus irmãos, pelas pessoas maravilhosas que me destinou conhecer e por me iluminar nas decisões e momentos mais difíceis.

Sua presença em minha vida me conferiu segurança e amparo para que eu seguisse pelos melhores caminhos.

*A*GRADECIMENTOS

Às minha orientadoras...

À minha orientadora, **Adriana de Jesus Soares**, por me oportunizar estudar nessa faculdade, pelos ensinamentos valiosos, pela orientação, pela compreensão nos momentos que mais precisei e pela confiança e parceria que com certeza não terminam com essa defesa.

Á minha co-orientadora, **Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes**, pela confiança, pela generosidade em compartilhar seus ensinamentos, por abrir as portas para a realização da minha pesquisa, pela compreensão, pela acolhida e por não medir esforços para me ajudar quando fosse preciso.

AGRADECIMENTOS

À minha família...

Por serem minha motivação de felicidade pessoal e profissional, por estarem ao meu lado e por me fazerem sentir amada.

Aos meus irmãos, **Renato** e **Mariana Nagata**, por me mostrarem a cada dia que na nossa família nunca se está só! Tenho muito orgulho e admiração por vocês pois têm grandiosidade e nobreza de sentimentos e atitudes. Vários momentos da minha vida não me intimidaram pois sabia que teria vocês ao meu lado. Para nós, o amor ultrapassa qualquer distância, pois não há limites para a nossa união! *Vocês para sempre segurarão minha mão e dirão que vai ficar tudo bem.*

À minha avó, **Yassuco Enomoto**, pelo amor e preocupação. Sua presença constante me ensina a cada dia os reais valores da vida. Amo muito você!

AGRADECIMENTOS

Aos meus amigos

À minha grande amiga **Tereza Pedrosa**, a quem as palavras nunca serão suficientes para expressar minha gratidão e carinho. Deus a colocou no meu caminho no momento que mais precisei, como um anjo, um presente. Agradeço por se preocupar, por estar ao meu lado apesar da distância, por ter um coração enorme e por me ensinar o valor de uma amizade! Você nunca mediu esforços para me ajudar, e se hoje estou realizando um sonho, parte disso eu devo à sua amizade! *Raramente na vida, encontramos uma amiga especial. Alguém que muda sua vida simplesmente por estar nela. Uma amizade para sempre, e para sempre não tem fim!*

À minha amiga **Núbia Pini**, por ter se tornado minha irmã em Piracicaba! Nossa convivência, companheirismo e amizade criaram laços tão fortes que ultrapassarão qualquer distância. Você sempre me estendeu a mão nos momentos mais difíceis e esteve presente em uma das melhores fases da minha vida. Isso não tem preço e deixa marcas lindas na vida de uma pessoa. Amo muito tê-la como amiga e vou sentir muito sua falta! *Você me põe para cima e faz com que o mundo escuro e vazio fique bem claro!*

À minha amiga **Thais Miranda**, por continuar sendo a pessoa maravilhosa e amiga que conheci na graduação! O tempo passa mas a nossa amizade não enfraquece, se fortalece pois temos um sentimento que nos une, o amor e a admiração! Você me apoia e torce sinceramente por mim, sem julgamento, apenas por querer minha felicidade. Sinto muito sua falta, mas isso se preenche, pois sei que se olhar para o lado, você sempre estará me seguindo e segurando minha mão.

À minha amiga **Christine Men**, por trazer leveza e diversão à minha vida. Vários dos melhores momentos da minha vida foram compartilhados com você! Amo e considero muito a nossa amizade. As amizades verdadeiras são raras, e isso não me entristece, mas me deixa feliz pelo fato de saber que tenho as melhores pessoas como

você ao meu lado! A distância nunca foi nem será um empecilho para o nosso sentimento de amizade e companheirismo. Amo muito!

À **Simone Pedrosa** e ao **Claudio Albuquerque**, pelo carinho e apoio que dedicaram a mim desde que nos conhecemos. Agradeço por abrirem as portas da sua família para que eu me sentisse segura e amada. Tudo que fizeram por mim foi essencial para a minha felicidade, vocês se tornaram pessoas muito importantes para mim! Espero um dia poder retribuir, pois um muito obrigada nunca será suficiente!

Ao **Gustavo Callado**, pela ajuda sincera e pelo grande coração. Sua bondade, carisma e paciência me tranquilizaram de tal forma que espero poder um dia retribuir tudo que fez por mim, muito obrigada!

Aos meus amigos de Piracicaba

À **Aniele Lacerda**, nossa amizade começou de forma tão natural e verdadeira. Agradeço por ser a pessoa que enxergou meus momentos de desespero e não hesitou em me ajudar! Tens um coração enorme e generoso, que comemora junto nas vitórias e apoia nas dificuldades, isso é uma amizade! Minha vida em Piracicaba se tornou mais fácil e agradável pois tive pessoas como você ao meu lado, nunca conseguirei retribuir tudo que representou para mim!

Ao **Thiago Farias**, pelo grande companheirismo e aprendizado conjunto que tivemos durante esses anos. Você foi a pessoa com quem dividi minhas preocupações, dificuldades e pude contar de olhos fechados. Agradeço pelas suas atitudes grandiosas e por me ensinar a lidar de forma madura com cada obstáculo dessa caminhada. Muito obrigada pela nossa amizade!

À **Thais Mageste**, por me receber tão bem nessa cidade e por ter me ajudado e ensinado de maneira tão generosa. Agradeço pela fidelidade e confiança da nossa amizade, nunca me esquecerei do quanto me apoiou, ouviu e incentivou! Você tem muita força e a compartilhou comigo nos momentos em que fraquejei, muito obrigada por tudo!

Aos grandes amigos **Daniel Herrera, Jefferson Marion, e Tiago Rosa**. Nunca imaginei que pudesse ser tão bem acolhida no laboratório. Penso em vocês e só me lembro de momentos em que me estenderam a mão, me disseram palavras carinhosas e divertidas. O coração de vocês é grandioso e nobre, pessoas assim conquistam sem esforço! Os momentos mais divertidos e as maiores risadas da minha pós-graduação foram compartilhadas com vocês!

Aos meus amigos da Pós-graduação

Aos amigos, **Daniela Miyagaki, Letícia Nóbrega, Andrea Pereira, Ana Carolina Cerqueira, e Marlos Ribeiro** por terem feito minha pós-graduação completa. Vocês são pessoas de bom coração, com quem compartilhei os melhores momentos em Piracicaba! Agradeço sinceramente pela paciência, compreensão e palavras de conforto e parceria que sempre ouvi de vocês! Muito obrigada por tudo!

À amiga **Ana Carolina Mascarenhas Oliveira**, pela ajuda sincera, pela preocupação e pelo companheirismo. Nunca conseguirei retribuir tudo que fez por mim, pois parte da minha tranquilidade de hoje eu devo a você! Muito obrigada!

Aos demais amigos do laboratório de Endodontia da FOP/UNICAMP, **Cimara Barroso, Felipe Anacleto, Ana Pimentel, Claudia Suzuki, Ana Carolina Correia, Carlos Augusto Pantoja, Emmanuel Nogueira, Maria Raquel Figueiredo Penalva Monteiro, Giselle Priscilla Cruz Abi Rached, Marcos Sérgio Endo, Erica Clavijo, e Ariane Marinho**.

À todos os amigos do Curso de Especialização em Endodontia, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, do ano de 2010 a 2012, pelos momentos de aprendizado e comemorações.

AGRADECIMENTOS

Aos mestres...

À minha orientadora de mestrado, **Mitsue Fujimaki Hayacibara**. A senhora me ensinou a gostar da docência, me segurou pelas mãos e me guiou brilhantemente pela minha caminhada da pós-graduação. Sempre me apoiou e acreditou em meu potencial, nunca me esquecerei de toda ajuda e incentivo! A inspiração de professora que me motiva a seguir em frente com certeza tem a senhora como estimuladora. Muito obrigada!

Aos professores **Caio Cezar Randi Ferraz**, **José Flávio Affonso de Almeida** e **Marcos Frozoni**, pela atenção e conhecimento dispensados no exame de qualificação.

Aos demais professores da Área de Endodontia, **Alexandre Augusto Zaia** e **Francisco José de Souza-Filho**, pela convivência diária e pelo conhecimento transmitido.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba** da **Universidade de Campinas**, na pessoa de seu diretor, Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior.

À **Coordenadoria Geral da Pós-Graduação** da FOP/UNICAMP, em nome da Prof. Dra. Renata Cunha Matheus Rodrigues Garcia e da secretária Érica Alessandra Pinho Sinhoreti, por toda atenção dispensada.

Ao **Coordenador de Pós-Graduação** em Clínica Odontológica da FOP/UNICAMP, Prof. Dr. Márcio de Moraes.

Às funcionárias **Ana Cristina Godoy e Helídia Maria**, da Área de Endodontia, pela prontidão em sempre ajudar e solucionar dificuldades na faculdade!

À secretária da Pós-graduação, **Ana Paula Carone** que, com muito carinho e paciência, está sempre pronta para ajudar no que for preciso.

Às **turmas de graduação**, por me permitirem exercitar o aprendizado, e, dessa forma, capacitar ainda mais o meu exercício de cirurgiã dentista!

Ao órgão de fomento **CAPES** pela concessão da bolsa para custear meus gastos durante a pós-graduação.

A todos os pacientes que participaram desse estudo, sem os quais esse trabalho não poderia ser concluído.

A todos que contribuíram para a realização deste projeto... Muito Obrigada!

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos: avaliar os resultados clínicos e radiográficos da utilização da pasta tripla antibiótica e do hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2% para a revascularização pulpar (**capítulo 1**); avaliar a redução microbiana da descontaminação realizada com pasta tripla antibiótica e à base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% na revascularização pulpar, e identificar espécies microbianas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (**capítulo 2**); relatar dois casos clínicos de dentes reimplantados com rizogênese incompleta onde foi proposto o protocolo de revascularização pulpar (**capítulo 3**). Material e Métodos: Treze pacientes (7-17 anos de idade) com incisivos superiores necrosados devido a trauma dental foram divididos em dois grupos: grupo medicado com pasta tripla antibiótica (TAP) (n=7) e grupo medicado com a associação de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% (CHP) (n=6). Os pacientes foram acompanhados por um período de 9 a 19 meses com avaliação dos dados clínicos e radiográficos (**capítulo 1**). Quinze pacientes (7-17 anos de idade) apresentando dentes imaturos foram tratados com revascularização pulpar e divididos em grupo TAP (n=7) e grupo CHP (n=8). As amostras microbianas foram coletadas inicialmente e após cada etapa de descontaminação dos canais radiculares. As bactérias cultiváveis foram contadas e identificadas por meio de PCR (**capítulo 2**). Dois pacientes (7 e 8 anos) foram acometidos por avulsão dentária no incisivo central superior esquerdo e no incisivo lateral superior esquerdo, respectivamente. Os dentes foram submetidos à revascularização pulpar consistindo de descontaminação passiva (hipoclorito de sódio 6%, solução fisiológica e clorexidina 2%), e medicação intracanal (hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%) por 21 dias. Na segunda sessão, a formação de coágulo sanguíneo foi estimulada e uma barreira de Agregado Trióxido Mineral (MTA) foi inserida (**capítulo 3**). Resultados: No **capítulo 1**, os dois grupos demonstraram completa redução da sintomatologia clínica, entretanto, escurecimento coronário foi observado em 6(85.71%) dentes do grupo TAP. Radiograficamente, todos os

dentes do grupo TAP demonstraram reparo de lesão periapical, e apenas um dente do grupo CHP não demonstrou reparo periapical. Fechamento apical foi observado em 5(71,42%) dentes do grupo TAP e em 4(66,67%) dentes do grupo CHP. No **capítulo 2**, ambos os grupos apresentaram redução na contagem microbiana (UFC/mL) significativa entre a amostra inicial e após irrigação com NaOCl 6% ($p < 0.05$). A utilização das medicações intracanaís (grupos TAP ou CHP) não diferiu com relação às contagens de CFU/mL ($p = 0.95$). A espécie bacteriana mais prevalente foi *Actinomyces naeslundii* (66,67%). Uma média de 2,13 espécies por canal foi encontrada. No **capítulo 3**, o primeiro caso apresentou fechamento apical e calcificação do terço apical do espaço do canal radicular no controle de 16 meses. O segundo caso demonstrou reabsorção radicular progressiva, sendo tratado com apicificação. Conclusões: A revascularização pulpar pode ser uma alternativa de tratamento para dentes acometidos por luxações traumáticas leves com rizogênese incompleta. Tanto a pasta tripla antibiótica quanto o hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2% sugerem redução de sinais clínicos, radiográficos e redução microbiana na revascularização pulpar.

Palavras-chave: revascularização pulpar; hidróxido de cálcio; avulsão dentária; pasta tripla antibiótica; reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

This study aims to: evaluate clinical and radiographic outcomes of the use of triple antibiotic paste and calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel paste for pulp revascularization therapy (**chapter 1**); evaluate microbial reduction of pulp revascularization performed with triple antibiotic paste and calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel, and identify bacteria species using Polymerase Chain Reaction (PCR) (**chapter 2**); report two clinical cases of immature replanted teeth which were treated with a protocol of pulp revascularization (**chapter 3**). Methods: Thirteen patients (7-17 years-old) with necrotic upper incisors due to dental trauma were divided in two groups: group treated with triple antibiotic paste (TAP) (n=7) and group dressed with the association of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel (CHP) (n=6). Patients were followed-up for till 9 to 19 months, with evaluation of clinical and radiographic data (**chapter 1**). Fifteen patients (7-17 years-old) presenting immature teeth were treated with revascularization and divided in group TAP (n=7) and group CHP (n=8). Samples were taken initially and after each step of root canal decontamination. Cultivable bacteria recovered at the five stages were counted and identified by means of PCR assay (**chapter 2**). Two patients (7 and 8 years old) suffered tooth avulsion on maxillary left lateral incisor and on maxillary left central incisor, respectively. Treatment consisted of revascularization therapy using passive decontamination (6% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine and sterile saline) and intracanal medication (calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel) for 21 days. In the second session, blood clot was stimulated and Aggregate Trioxide Mineral was used as a cervical barrier of the canal (**chapter 3**). Results: In **chapter 1**, clinical evaluation in both groups (TAP and CHP) observed that there was complete reduction concerning clinical symptomatology, however, crown discoloration was observed in 6(85.71%) teeth of group TAP. In radiographic exam, all teeth of group TAP showed repair of periapical lesions, and only one tooth of group CHP did not show apical repair. Apical closure was observed in 5(71.42%) teeth of group TAP and in 4(66.67%)

teeth of group CHP. In **chapter 2**, both groups presented bacteria counts (CFU/mL) decreasing significantly after irrigation with 6% NaOCl ($p < 0.05$). Intracanal dressing did not differ in relation to CFU counts ($p = 0.95$). The most prevalent bacteria identified was *Actinomyces naeslundii* (66.67%). An average of 2.13 species per canal was found. In **chapter 3**, it was observed apical closure and calcification in the apical third of root canal space at the 16-month follow-up. The second case presented progressive root resorption, being treated with apexification. Conclusions: Pulp revascularization may be an alternative of treatment for mild luxated traumatized immature teeth. Both triple antibiotic paste and calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel paste may be employed in pulp revascularization suggesting clinical, radiographic and microbial reduction after their use.

Key-words: pulp revascularization; calcium hydroxide; tooth avulsion; triple antibiotic paste; polymerase chain reaction.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	1
CAPÍTULO 1 - Clinical and radiographic evaluation of pulp revascularization in traumatized teeth treated with two intracanal medicaments.....	7
CAPÍTULO 2 - Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste and calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel in revascularization therapy	29
CAPÍTULO 3 – Protocol of pulp revascularization for immature replanted teeth: report of cases.....	47
CONSIDERAÇÕES GERAIS	63
Justificativa da pesquisa	63
Conceitos de Revascularização/Revitalização e Regeneração pulpar	64
Descontaminação passiva	66
Substâncias químicas auxiliares	66
Medicações intracanal.....	69
Scaffold – Coágulo sanguíneo	72
Selamento	73
CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS	77
APÊNDICE 1 - MATERIAL E MÉTODOS E ILUSTRAÇÕES DOS EXPERIMENTOS	81
APÊNDICE 2 – MEIO DE TRANSPORTE	93
APÊNDICE 3 – MEIOS DE CULTURA	98
APÊNDICE 4 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	102
ANEXO – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	107

INTRODUÇÃO

O traumatismo dentário pode ser considerado um problema de saúde pública mundial (Rocha & Cardoso, 2001) acometendo 15% dos escolares nos países da América Latina e 20 a 30% das crianças em idade pré-escolar dos países industrializados (Andersson, 2013). Em consequência de um traumatismo, lesões à estrutura do periodonto e polpa podem acontecer provocando danos à estética e função do sistema estomatognático além de causar sérios problemas emocionais e psicológicos ao paciente (Côrtes *et al.*, 2002; Glendor, 2008).

As principais alterações pulpares secundárias ao traumatismo referem-se à necrose pulpar, obliteração ou calcificação e reabsorção radicular (Andreasen, 2003; Andreasen *et al.*, 2007). Considerando que a necrose pulpar é a mais frequente (26.9%), e que a faixa etária de maior prevalência dessas lesões é composta por jovens em estágio de desenvolvimento (Hecova *et al.*, 2010), a formação radicular pode ser comprometida caso algum dano seja provocado ao tecido pulpar. A formação radicular decorre de estímulos provindos da bainha epitelial de Hertwig sobre odontoblastos viáveis de um dente com rizogênese incompleta (Zeichener *et al.*, 2003). Agressões a esse tecido pulpar em desenvolvimento ocasionam interrupção da formação radicular e consequente condição anatômica desfavorável para a funcionalidade normal e para o tratamento endodôntico convencional. Com relação à terapia endodôntica, preconiza-se a realização de protocolos de tratamento visando o reparo da porção apical não desenvolvida.

Dentes sem maturação radicular apresentam paredes de dentina radicular finas e susceptíveis a fraturas, mesmo sob forças fisiológicas, e um ápice amplo e aberto que dificulta tecnicamente o tratamento endodôntico (Ansary *et al.*, 2009). Nestes pacientes com ápice aberto e necrose pulpar tem se preconizado um tratamento que vise a maturação e término da formação radicular, por meio da prevenção de invasão microbiana ou eliminação de infecção existente (Whittle,

2000). Considerando a não existência de constrição apical natural que permita o preenchimento com material obturador adequado evitando a reinfecção desse canal, um dos objetivos do tratamento é produzir uma barreira que possa prevenir a extrusão de material para os tecidos periapicais, assim como providenciar uma restauração que reforce as paredes radiculares de dentina frágeis. O tratamento clássico para este objetivo é a apicificação, que envolve a limpeza e preenchimento do canal radicular com uma pasta temporária que estimule a formação de um tecido calcificado no ápice. Entretanto, a apicificação induzida por hidróxido de cálcio apresenta algumas limitações como o tempo requerido para a formação de barreira apical, que varia de 6 a 24 meses; sendo a barreira de consistência porosa e não contínua, e, além disso, não induz o término da formação radicular, mas apenas o fechamento apical (Cvek, 1992; Shah *et al.*, 2008). Além desta técnica, outros métodos têm sido descritos, como o tratamento em uma sessão, por meio da colocação de uma barreira apical composta por Agregado Trióxido Mineral (MTA) para agir como um anteparo para a condensação da obturação definitiva (Desai & Chandler, 2009; Martin *et al.*, 2007).

Apesar da existência desses protocolos de tratamento, ainda não se contornou o problema do enfraquecimento das paredes desses canais e o consequente risco de fratura radicular. Isto se torna importante, considerando que 60% de todos os dentes tratados endodonticamente e com rizogênese incompleta tem sofrido fraturas radiculares devido a pequenos impactos e, às vezes até mesmo fraturas espontâneas têm ocorrido (Trope & Ray, 1992). Além disso, há relatos de que a permanência por longos períodos da medicação à base de hidróxido de cálcio durante o tratamento de apicificação pode enfraquecer as paredes dentinárias (Andreasen *et al.*, 2002).

Dentro deste contexto, a Endodontia Regenerativa tem surgido como uma alternativa promissora para esses casos, com dois conceitos principais que se enquadram no tratamento de dentes não vitais (Bansal & Bansal, 2011). O primeiro se refere à Regeneração Pulpar, no qual se estuda o desenvolvimento de novo tecido pulpar *in vitro* a partir de células indiferenciadas estimuladas por

fatores de crescimento, com o objetivo de regenerar o tecido pulpar perdido (Zhang & Yelick, 2010; Neha *et al.*, 2011; Bansal & Bansal, 2011). Existem vários estudos sobre regeneração, que desenvolveram células pulpares a partir de células mesenquimais indiferenciadas de várias origens, mas ainda não está claro como estimular adequadamente a diferenciação dessas células em odontoblastos no interior do canal radicular, nem como manter uma vascularização desse tecido (Shi & Gronthos, 2003). O segundo conceito, referente à Revascularização Pulpar pode ser definido como a invaginação de células indiferenciadas da região apical de dentes de pacientes jovens com ápice aberto (Zhang & Yelick, 2010). Acredita-se que essas células indiferenciadas possam sobreviver à necrose pulpar, mesmo na presença de infecção perirradicular (Huang *et al.*, 2008). O conceito de revascularização pulpar não é novo e remete a pesquisas das décadas de 50 e 60 com um enfoque diferente da atualidade. Neste período, os estudos abordavam a revascularização do compartimento radicular contendo o tecido pulpar isquêmico de dentes reimplantados ou transplantados (Hale, 1953; Myers & Flanagan, 1958; Pafford, 1956). Observaram que era possível a ocorrência da revascularização desse tecido pulpar após 48 horas por meio de um fenômeno chamado de embebição plasmática. Mais tarde, Nygaard-Ostby e colaboradores (1961) avaliaram o papel do coágulo sanguíneo na terapia endodôntica, em estudo histológico de cães (Nygaard-Ostby, 1961). Observaram que após desinfecção do canal radicular, a presença de sangramento ou coágulo sanguíneo foi essencial para a formação de tecido conjuntivo fibroso no canal vazio. Esses estudos foram de grande relevância para que a partir do ano 2000 a revascularização pudesse ser estudada como uma alternativa à apicificação. No atual conceito, sugere-se que o coágulo sanguíneo invaginado associado aos restos teciduais necróticos pulpares possam atuar como arcabouço de proteínas, que permita o crescimento tridimensional do novo tecido (Neha *et al.*, 2011). Este novo tecido invaginado, de acordo com estudo histológico em cães, parece ser constituído por células semelhantes aos cementoblastos que sintetizam tecido mineralizado contribuindo para o espessamento das paredes dentinárias e para o fechamento apical (Wang

et al., 2010). Vários relatos de caso (Banchs & Trope, 2004; Cotti *et al.*, 2008; Reynolds *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2009; Thibodeau, 2009; Kim *et al.*, 2010; Silva *et al.*, 2010; Iwaya *et al.*, 2011) e alguns estudos clínicos (Shah *et al.*, 2008; Cehreli *et al.*, 2011) demonstraram resultados promissores dessa terapia em dentes com rizogênese incompleta. Dessa forma há grande previsibilidade da terapia quando o ápice radiográfico mostra abertura maior que 1,5 mm, em dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar secundária a um trauma, quando a contaminação bacteriana é eliminada por meio de irrigação copiosa associada ou não à colocação de pasta antibiótica e quando a formação de um coágulo associado ao tecido pulpar necrosado funcionam como um arcabouço para o crescimento do novo tecido (Bansal & Bansal, 2011). Entre as vantagens da revascularização, trata-se de um tratamento que requer menor tempo clínico, pode ser concluída em uma ou duas sessões após o controle da infecção, o custo-benefício é favorável uma vez que não são necessárias muitas visitas clínicas, nem materiais adicionais, e por último, a maior vantagem refere-se ao estímulo ao término da formação radicular com espessamento das paredes radiculares, aumento do comprimento radicular e fechamento apical, com conseqüente fortalecimento das paredes radiculares (Shah *et al.*, 2008). Há na literatura algumas sugestões com relação ao mecanismo de ação da revascularização. Sugere-se que células pulpares vitais possam sobreviver na porção apical da raiz, as quais podem proliferar sobre a matriz formada dentro do canal radicular e se diferenciar em odontoblastos sob estímulo das células dos restos epiteliais de Mallassez (Banchs & Trope, 2004). A segunda possibilidade sugere que células mesenquimais indiferenciadas podem ser abundantes no tecido pulpar de dentes com rizogênese incompleta, as quais podem se aderir às paredes radiculares internas e se diferenciar em odontoblastos que secretariam dentina nesta região (Gronthos *et al.*, 2002). Outra possibilidade poderia ser atribuída à presença de células mesenquimais indiferenciadas no ligamento periodontal, as quais podem proliferar na porção apical e se diferenciar em cementoblastos e depositar tecido mineralizado nas paredes dentinárias (Lieberman e Trowbridge, 1983). O quarto

possível mecanismo poderia ser atribuído às células mesenquimais indiferenciadas da papila apical, as quais quando estimuladas com um instrumento além da extensão do canal radicular por possuírem alta capacidade proliferativa, podem formar tecido mineralizado dentro do canal radicular (Gronthos *et al.*, 2000; Lovelace *et al.*, 2011).

Além da presença de células indiferenciadas, outro ponto crítico se refere à ausência de bactérias no canal radicular, pois o novo tecido cessa seu desenvolvimento no nível em que encontrar bactéria no espaço do canal (Yanpiset & Trope 2000; Windley *et al.*, 2005). A infecção de dentes com rizogênese incompleta foi pouco estudada até o momento, entretanto parece ser bastante semelhante à de dentes completamente formados, ou seja, com presença principal de anaeróbios estritos produtores de pigmento preto e poucos anaeróbios facultativos (Baumotte *et al.*, 2011). Considerando a importância da eliminação bacteriana, da característica polimicrobiana presente no canal radicular infectado, da manutenção de um arcabouço e da preservação das células da região apical, uma das formas de realização dessa técnica é feita por meio de descontaminação sem instrumentação mecânica do canal radicular aliada ou não à colocação de uma pasta antibiótica (Reynolds *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2009). Agentes antimicrobianos com amplo espectro de ação ou uma combinação deles também se fazem necessários para esse objetivo. O protocolo clássico descrito por Hoshino *et al.* (1996), combina ciprofloxacina, metronidazol e minociclina em uma pasta, a qual demonstrou atuar melhor quando associada, eliminando bactérias presentes mesmo nas camadas mais profundas de dentina infectada (Hoshino *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996). A ação antimicrobiana desta pasta tripla antibiótica tem sido relatada *in vitro* na literatura (Hoshino *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996), *in vivo* em estudos com cães (Windley *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2010) e mais recentemente, estudos clínicos têm demonstrado resultados promissores da revascularização pulpar associada a esta pasta (Cotti *et al.*, 2008; Shah *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009). Além do emprego da pasta antibiótica, relatos de caso recentes também obtiveram sucesso na revascularização pulpar de dentes com

ápice aberto utilizando pastas à base de hidróxido de cálcio (Cehreli *et al.*, 2011; Iwaya *et al.*, 2011; Neha *et al.*, 2011), o que facilitaria sua aplicação na rotina clínica considerando a disponibilidade desta medicação. De uma forma geral, a literatura tem demonstrado vários estudos de revascularização pulpar com continuidade no desenvolvimento radicular similar ao dente adjacente e contralateral e aumento da espessura da parede radicular (Iwaya *et al.*, 2001; Thibodeau & Trope, 2007; Cotti *et al.*, 2008; Bose *et al.*, 2009; Thibodeau, 2009; Ding *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2013).

Apesar de vários estudos demonstrarem a efetividade dessa terapia, até o momento, poucas pesquisas conclusivas demonstraram a eficácia antimicrobiana de descontaminação dessa terapia *in vivo*, nem identificou pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) algumas espécies microbianas presentes nestes canais com indicação de revascularização. Aliado a isso, pouco se sabe sobre a utilização das medicações intracanaís conhecidamente eficazes contra microrganismos endodônticos como as à base de hidróxido de cálcio com relação à descontaminação e preservação das células da região apical com consequente estímulo à formação radicular. Além disso, poucos estudos correlacionaram os achados microbianos coletados dos canais radiculares de dentes traumatizados com os dados clínicos e radiográficos encontrados durante os acompanhamentos.

Esta pesquisa foi dividida em três capítulos, tendo como principais objetivos: avaliar os resultados clínicos e radiográficos da utilização da pasta tripla antibiótica e do hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2% para a revascularização pulpar (capítulo 1); avaliar a redução microbiana da descontaminação realizada com pasta tripla antibiótica e à base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% na revascularização pulpar, e identificar espécies microbianas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (capítulo 2); relatar dois casos clínicos de dentes reimplantados com rizogênese incompleta onde foi proposto um protocolo de revascularização pulpar (capítulo 3).

CAPÍTULO 1 - CLINICAL AND RADIOGRAPHIC EVALUATION OF PULP REVASCULARIZATION IN TRAUMATIZED TEETH TREATED WITH TWO INTRACANAL MEDICAMENTS

ABSTRACT

Introduction: Pulp revascularization may be considered a promising alternative for immature traumatized necrotic teeth. The main medications that have been employed to disinfect the root canal space before the revascularization are triple antibiotic paste and calcium hydroxide pastes. The aim of this study was to evaluate clinical and radiographic outcome of triple antibiotic paste and calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel paste as intracanal medicaments for pulp revascularization in traumatized teeth. **Methods:** Thirteen patients (7-17 years-old) with necrotic upper incisors due to dental trauma were divided in two groups: the group treated with triple antibiotic paste (metronidazole, ciprofloxacin and minocycline) (TAP) (n=7) and the group medicated with the association of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel (CHP) (n=6). Patients were followed-up for till 9 to 19 months with evaluation of clinical and radiographic data. **Results:** Most of teeth patients were affected by extrusive luxations (54%) that resulted in pulp necrosis. Clinical evaluation in both groups (TAP and CHP) demonstrated complete reduction concerning clinical symptomatology, however, crown discoloration was observed in 6(85.71%) teeth of group TAP and no patient of group CHP presented pigmentation after revascularization therapy. In radiographic exam, all teeth of group TAP showed repair of periapical lesions and only one teeth of group CHP did not present repair. Apical closure was observed in 5(71.42%) teeth of group TAP and in 4(66.67%) teeth of group CHP. Increase in root length was demonstrated in 4(57.14%) and in 2(33.34%) teeth of groups TAP and CHP, respectively. Thickening of lateral dentinal walls was observed in one tooth of each group. **Conclusion:** Revascularization responses may be influenced by the severity of dental trauma and both medicaments may be used for pulp

revascularization with similar radiographic outcomes and greater crown discoloration for triple antibiotic paste group.

Key-words: pulp revascularization, triple antibiotic paste, calcium hydroxide, intracanal medicament

INTRODUCTION

Most of dental trauma are associated to luxation injuries which may damage periodontal ligament (PDL) attachment as well as may injury the apical neurovascular bundle. Depending on the severity, the tissue may be compressed or disrupted, and both the cells and intercellular structures may be crushed (1). In traumatized immature teeth, this damage to periapical region may also affect apical papilla cells and periodontal ligament cells, and any disruption of these structures may prevent further natural root development (2). In this context, healing following a luxation injury involves reorganization and reestablishment of the continuity of the PDL fibers as well as pulpal revascularization and reinnervation. When reinnervation did not occur, pulp tissue necrosis. Pulp necrosis is the most frequent post-traumatic complication in all types of dental traumas, being more frequent in mature than in immature teeth (3). The most traditional endodontic treatment for immature teeth is apexification through periodic changes of intracanal medicament or using an apical plug of Mineral Trioxide Aggregate (MTA) (4-7).

Recently, pulp revascularization has been studied as an alternative therapy for immature necrotic teeth, with the advantage of inducing root end development (8-10). Most of pulp revascularization studies refer to case reports that employ passive decontamination and an antibiotic paste composed of metronidazole, ciprofloxacin and minocycline as intracanal medicament (11-13). Calcium hydroxide also has been used as intracanal dressing, though still presents controversy in the literature concerning its beneficial properties when used in

contact with undifferentiated cells and dentin root walls (14-18). A recent case report demonstrated success in pulp revascularization performed with the association of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel, showing thickness in dentin walls, increase in root length and apical closure (19).

Pulp revascularization case reports have mostly been evaluated in apical periodontitis and dento-alveolar abscesses (20,21). However, pulp necrosis in immature teeth may also occur in traumatized teeth, which present different mechanism of complications, and physical commitment of the periodontal ligament cells and apical papilla when compared to a pulp necrosis caused by infection. Considering the importance of periodontal ligament cells integrity for revascularization repair, clinical success of the employed protocols should be evaluated. In addition, dental trauma may play a different role in the apical repair of immature teeth, considering the possibility of physical destruction of stem cells. This study planned a prospective clinical evaluation to compare triple antibiotic paste and the association of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel as intracanal medicaments for pulp revascularization therapy in traumatized teeth.

MATERIAL AND METHODS

Sample

Thirteen patients (7-17 years of age) with immature and nonvital maxillary anterior teeth composed the population study. Patients that presented pulp necrosis due to hard tissue dental trauma and/or due to some severe luxation (extrusive luxation, lateral luxation, intrusive luxation, and avulsion) with or without periapical pathology were included in this research. Clinical examination included presence of spontaneous pain, sinus tract, swelling, tenderness, sensibility to palpation, cold and electric pulp tests. All the examinations were performed on the affected tooth and on a control (contralateral but unaffected) tooth. Intraoral

periapical radiographs revealed immature apices, either blunderbuss canals or wide canals with parallel walls and a slight flaring in the apical end, and in a few cases, moderately developed root but with open apex. In addition the presence of periapical lesions was recorded.

This research was approved by Ethics Committee – CEP, of Piracicaba Dental School, UNICAMP. The identities of the patients and of the legal representatives were maintained confidential. Patients received explanations and were informed that both pictures and periapical radiographs would be used for scientific purposes only. Patients and their parents were informed of the treatment alternatives and risks and consented to the revascularization treatment. Teeth were randomly divided in two groups according to intracanal medicament employed in the revascularization therapy: the group that was medicated with triple antibiotic paste (TAP) (n=7) and the group that was medicated with calcium hydroxide paste (CHP) (n=6).

Revascularization procedures

Teeth were anesthetized with 2% lidocaine with vasoconstrictor (Alphacaine, DFL, Rio de Janeiro, Brazil) and isolated with a rubber dam. The access cavity was prepared using a diamond bur (KG Sorensen, Barueri, Brazil) and a high-speed handpiece with copious sterile physiologic solution refrigeration. Root canal systems were slowly and carefully irrigated with 20 mL of 6% sodium hypochlorite, 10 mL of physiological solution and 10 mL of 2% chlorhexidine, 3 mm shorter than the apparent working length. The action of chlorhexidine was neutralized by 5% Tween 80 and 0.07% soy lecithin. The apical third received no treatment for the preservation of stem cells that might be present. For teeth of group TAP, the canal was dried with sterile paper points, and a mixture of the ciprofloxacin 250 mg, metronidazole 400 mg, and minocycline 50 mg, in the proportion of 1:1:1: was prepared as described by Hoshino *et al* (22). The paste

was placed in the root canal, 3 mm shorter than the apparent working length, and left for 21 days. The access cavity was double sealed with Coltisol (Coltene-Whaledent, Langenau, Germany) and composite resin (Z250 Filtek; 3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brazil). For teeth in group CHP, the canal was dried with sterile paper points, and a dressing prepared in the proportion of 1:1 of calcium hydroxide (Biodinâmica, Ibiporã, Brazil) and 2% chlorhexidine gel (Endogel, Itapetininga, São Paulo, Brazil) in a creamy consistency was placed in the root canal, 3 mm shorter than the apparent working length, for 21 days. The access cavity was also double sealed with Coltisol (Coltene-Whaledent, Langenau, Germany) and composite resin (Z250 Filtek; 3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brazil). In the next visit, the teeth of both groups were anesthetized with 2% lidocaine with vasoconstrictor (Alphacaine, DFL, Rio de Janeiro, Brazil), accessed, and irrigated with physiologic solution for intracanal medicament removal. After this, a final irrigation with 3 mL of 17% EDTA solution (Fórmula e Ação, São Paulo, Brazil) for 3 minutes was followed by physiologic solution irrigation because of the known beneficial properties of EDTA on conditioning the dentin for stem cell differentiation (23). Then, a manual K-file (Dentsply-Maillefer, Swiss) was introduced into the root canal and placed at 2 mm beyond the working length to induce bleeding into the canal. The bleeding was allowed to reach a level 3 mm below the cemento-enamel junction, and teeth were left for 5 minutes so that a blood clot was formed. CollaCote (Zimmer Dental, Carlsbad, CA) fibers were placed on the blood clot, and then a 3-mm white MTA (Angelus™, Londrina, Brazil) barrier was placed. The access opening was double sealed with coltisol (Coltene-Whaledent, Langenau, Germany) and with composite resin (Z250 Filtek; 3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brazil).

Clinical and radiographic evaluation

Patients of both groups were followed-up for till 9 to 19 months. Initial exams were compared to the data collected during the follow-up period. It was collected clinical and radiographic aspects. The clinical aspects were assessed by the presence of pulp sensibility, spontaneous pain, tenderness, pain on palpation, sinus tract, swelling and crown discoloration. Pulp sensibility was assessed by the cold thermal test, using carbon dioxide negative test (-50°C) (EndoFrost™ -Roeko, Langenau, Germany) and by electric pulp test (Pulp Tester™, Analytic Technology, Redmond, USA). Radiographic examination evaluated presence of periapical radioluscent image, root resorption, apical closure and increase of root length and thickness. All radiographs were taken with periapical films (Kodak, São José dos Campos, São Paulo, Brazil) associated with impression condensation silicone and an intraoral positioner (Indusbello indústria de instrumentos Odontológicos Ltda., Londrina, Paraná, Brazil), to ensure the quality and standardization of images. Radiographic analyses was performed by 2 trained Endodontic specialists, using a negatoscope (Lumatron, Encor Indústria Fotográfica Ltda., Rio Claro, São Paulo, Brazil) coupled to a lens providing 4X magnification.

RESULTS

Patients of groups medicated with Triple Antibiotic Paste (TAP) and with Calcium Hydroxide Paste associated to 2% chlorhexidine gel (CHP) were affected by extrusive luxation (8/54%), lateral luxation (3/20%), intrusive luxation (2/13%) and avulsion (2/13%). The follow-up of the cases ranged between 9 to 19 months. One case could be followed up for 19 months, 3 for 18 months, 1 for 17 months, 1 for 16 months, 1 for 15 months, 1 for 11 months and 4 for 9 months. In the clinical evaluation it was observed that in both groups (TAP and CHP) there was complete reduction concerning the presence of spontaneous pain, pain on percussion and palpation, sinus tract and swelling after the revascularization therapy. No teeth of both groups recovered pulp sensibility. Crown discoloration was observed in

6(85.71%) patients of group TAP and no patient of group CHP presented pigmentation after revascularization therapy (Table 1). Radiographic evaluation showed that all teeth of group TAP demonstrated repair of periapical lesions, and only one teeth of group CHP did not present repair (Figure 3 E and F). Apical closure was observed in 5(71.42%) teeth of group TAP and in 4(66.67%) teeth of group CHP (Table 2). Increase in root length was demonstrated in 4(57.14%) and in 2(33.34%) teeth of groups TAP and CHP, respectively. Thickening of lateral dentinal walls was observed in one tooth of each group.

Initial and final clinical views of one patient of groups TAP and CHP is shown in the figure 1. Initial and the last follow-up radiographs of groups TAP and CHP may be observed in the figures 2 and 3.

DISCUSSION

Dental trauma occurs more frequently in young people that may present immature root development (3,24). The present study was composed of young patients that suffered severe luxations, most of them affected by extrusive luxations (54%) that resulted in pulp necrosis. Literature demonstrates that lateral luxations are most prevalent (23.3%) than extrusive luxation (13.04%) considering completed formed and immature teeth (3). Pulp necrosis is less prevalent in immature teeth than in completed developed ones (3), however, when pulp tissue necrosis, endodontic treatment brings a challenge, considering the anatomic singularity of these immature teeth. Revascularization emerged as a promising alternative for conventional apexification and was the treatment of choice in the present study, considering its advantages, such as root end development and radicular reinforcement that prevents root fractures.

The present study employed both NaOCl and chlorhexidine as irrigants and compared the intracanal medicaments. It is well established that NaOCl

presents antimicrobial properties being the most widely employed irrigant. However, passive irrigation with NaOCl alone, without mechanical instrumentation associated to the possibility of long time infection, invading dentinal tubules, suggest that NaOCl may not be sufficient to reduce contamination. In this context, 2% chlorhexidine was also selected based on its extended residual anti-microbial properties, diffusion in dentinal tubules and a relative absence of toxicity (25,26). Recent questions concerning the use of 2% chlorhexidine are related to the potential cytotoxicity on cultured dental pulp stem cells (27), however, in the present study, the action of chlorhexidine was neutralized by 5% Tween 80 and 0.07% soy lecithin, to limit the possibility of cytotoxicity. In addition, it has been reported that interactions between NaOCl and chlorhexidine forms para-chloroaniline (28). The current study used copious irrigation of saline solution to reduce the interaction between NaOCl and chlorhexidine, and it was not observed the formation of this agent. Previous studies associated these irrigants and obtained successful outcomes (29,30). In addition, after decontamination, smear layer is formed and the used irrigants are not capable of removing this layer which might create unfavorable conditions for cell survival, migration, adhesion, and proliferation. In this context, the present study used the chelating agent EDTA to remove smear layer, leaving behind a clean dentin surface with open dentinal tubules to expose collagen fibrils of the organic matrix; and growth factors entrapped in the dentin matrix (31). Recent study also demonstrated that irrigation protocols containing EDTA promoted more survival of apical papilla stem cells (27).

The present study complemented the disinfection using intracanal medicaments. Calcium hydroxide pastes help in the disinfection of pulp necrotic infected root canals through hydroxyl ions dissociation, creating an alkaline environment which is harmful for the majority of endodontic pathogens (32,33). Calcium hydroxide was associated to 2% chlorhexidine gel, and literature demonstrate that this paste increase antimicrobial activity of calcium hydroxide against some endodontic pathogens (34,35), and was also previously reported revascularization therapy with this intracanal medicament (19). In addition, calcium

hydroxide may induce dentinal bridge formation, which may protect the underlying viable tissue from contamination (36). Considering these properties, some researches have demonstrated success in revascularization with this medicament (14,15), a result that was also observed in this study, concerning periapical lesion. On the other hand, some authors do not indicate the use of calcium hydroxide in revascularization therapy because of its high pH, that would necrosis tissue in immediate contact with it, destroying cells with the potential to differentiate into new pulp (18). In this context, literature reports that the position of calcium hydroxide beyond coronal half of root canal may decrease the percentage of thickness of canal diameter after pulp revascularization, probably due to the proximity to apical stem cells (10). In the present study, calcium hydroxide paste was inserted in the cervical and medium thirds, which may have damaged stem cells and consequently the apical repair. Considering it, most authors suggest the use of an antibiotic paste because it would act only against bacteria not affecting human cells. Meantime, the use of antibiotics may generate bacteria resistance and/or allergic reactions, besides clinical collateral effects such as crown discoloration (30,37). Considering the controversy in the literature, the main objective of the present study was to compare the clinical relevance and difference of these medicaments. In overall, teeth medicated with the association of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel demonstrated similar clinical and radiographic results to that treated with triple antibiotic paste.

Considering clinical examination, literature demonstrates that after revascularization treatment, there is generally remission of signals and symptoms (8,38,39), and in some cases it may be observed the return of pulp sensibility (38). In the present study, patients of both groups reported complete remission of spontaneous pain, tenderness, pain on palpation, remission of sinus tract and swelling after revascularization, however, no tooth recovered pulp sensibility. In addition, almost all teeth of group TAP presented some crown discoloration, due to the presence of minocycline in the composition of the paste. Literature recognizes that minocycline caused pigmentation, and they suggested that this antibiotic could

be removed or replaced by amoxicillin, cefaclor, cefroxadin, fosfomycin, or rokitamycin (40). Recent trends also have proposed the use of a bond agent in the inner surfaces of coronal access to avoid undesired crown discoloration, thus preventing any contact between the triple antibiotic paste and the dentinal walls (30). Another factor that may have discolored tooth crown was the use of white Mineral Trioxide Aggregate (MTA) that may also promoted palatal discoloration.

Regarding radiographic examination, periapical lesion repair is a signal that the treatment was effective in controlling the infection. At the same time, the repair of the apical portion of immature teeth would only begin in an organized and uninfected tissue, enabling the occurrence of root end development when properly induced (41). Both protocols of decontamination presented in this study reduced periapical lesions, probably due to antimicrobial properties of the irrigant solution and intracanal medicaments employed. Considering root end development, most of the teeth only presented apical closure, a similar outcome after apexification therapy, and did not achieve increase in root length and narrowing of root canal space. It may be explained because continued root development appears to occur due to the viability of Hertwig Epithelial Root Sheath (HERS), apical papilla or periodontal ligament cells (42,43). In the present study, it is likely that the severity of dental trauma in these immature permanent necrotic teeth destroyed these cells. Teeth with minor luxation injuries such as concussion and subluxation have a very low risk of periodontal healing complications (44). However, damaged zones on the root surfaces of severed luxated teeth may involve an increased risk of periodontal healing complications. In the present study, dental trauma may have disrupted apical papilla cells, preventing root development that is generally promoted by revascularization. Therefore, the HERS must survive in order to regulate root development in immature permanent necrotic teeth after revascularization (45), meantime physical compression or stretch of these cells promoted by dental trauma probably compromised the repair in the present study. Another aspect refers to the duration of the infection. Hypothetically, the longer standing of an infected pulp in immature teeth there is the less survived pulp tissue and stem cells

may not remain (36). Literature also reports that cases of unfavorable revascularization outcome apparently were related to a failure to induce any bleeding into the canal (46). However, it was not present in the current study, considering that all the cases presented blood clot formation. Another possibility is that irrigation with high concentration of sodium hypochlorite solution and association with chlorhexidine might have damaged apical vital tissue (47) and possibly progenitor/stem cells after revascularization procedures.

In addition, the lack of promising results may be explained because revascularization is still happening and continuing follow-ups would maybe demonstrate root thickness and increase in root length that would be produced by the ingrowth tissue. One case demonstrated partial calcification of root canal, which suggests that there was ingrowth of cells responsible of hard tissue deposition inside the canal. This finding was previous reported (39,41) however the mechanism and the cells responsible for this obliteration are not clear. It is also not known whether the outcome of pulp canal calcification (obliteration) in revascularized immature permanent necrotic teeth is similar to pulp canal calcification caused by traumatic injury (48). There was also one case in each group that demonstrated hard tissue barrier formation in the canal space between the coronal MTA plug and the root apex, which may be favorable to prevent bacterial leakage to root canal. It is not known why there is this formation, however according to animal studies, it may be suggested that intracanal cementum had ingrowth root canal and developed a hard tissue deposition (49).

Considering success rate of revascularization, a retrospective study demonstrated significantly greater tooth survival after regenerative treatment (100%) compared with teeth treated with Ca(OH)_2 apexification (77%) (50). A study on dogs demonstrated that after successful disinfection of the root canals, 64.6% of the cases had no radiographic evidence of periapical radiolucencies or showed improvement/healing of previous periapical radiolucencies (51). In the present study, regarding periapical lesion repair, success rate may be considered close to 100%. Meantime, improved root development was not observed in both groups.

Further studies removing or replacing minocycline in the composition of the paste, a greater number of patients enabling statistical analyses and longer periods of follow-up could favor more conclusive findings.

The results of the present study showed that revascularization responses may be influenced by the severity of dental trauma and maybe, the proposed protocols with continuing follow-ups of the cases may demonstrate more advanced root development.

REFERENCES

1. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L, editors. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth, 4th edn. Oxford: Blackwell; 2007. p. 411–27.
2. 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.
3. Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol* 2010;26(6):466-75.
4. Jacobovitz M, de Pontes Lima RK. The use of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on apexification of a replanted tooth: a case report. *Dent Traumatol* 2009;25(3):e32-6.
5. de Jesus Soares A, Yuri Nagata J, Casarin RC, Flávio Affonso de Almeida J, Gomes BP, Augusto Zaia A, Randi Ferraz CC, José de Souza-Filho F. Apexification with a new intra-canal medicament: a multidisciplinary case report. *Iran Endod J* 2012;7(3):165-70.
6. Damle SG, Bhattal H, Loomba A. Apexification of anterior teeth: a comparative evaluation of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide paste. *J Clin Pediatr Dent* 2012;36(3):263-8.

7. Buck CLBP, Soares AJ, Buck A, Nagata JY, Zaia AA, Souza-Filho FJ. Avaliação de dentes reimplantados submetidos a um novo protocolo terapêutico. *Rev assoc paul cir dent* 2012;66(3):200-5.
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: 919–25.
9. Bansal R, Bansal R. Regenerative endodontics: a state of the art. *Indian J Dent Res* 2011; 22(1): 122-31.
10. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2009; 35(10): 1343-9.
11. 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.
12. Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod* 2012;38:411–4.
13. Keswani D, Pandey RK. Revascularization of an immature tooth with a necrotic pulp using platelet-rich fibrin: a case report. *Int Endod J* 2013 (in press).
14. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol* 2011; 27: 55–58.
15. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod* 2011;37:1327-30.
16. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod* 2008;34:611-616.
17. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol* 2002;18:134–7.

18. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? J Endod 2004;30:196–200.
19. Soares Ade J, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. J Endod 2013;39:417-20.
20. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. Aust Dent J 2010;55(4):446-52.
21. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. J Endod 2011;37(4):562-7.
22. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. *In vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. Int Endod J 1996; 29: 125-130.
23. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, *et al.* Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. J Endod 2011;37:1536–41.
24. Lauridsen E, Hermann NV, Gerds TA, Kreiborg S, Andreasen JO. Pattern of traumatic dental injuries in the permanent dentition among children, adolescents, and adults. Dent Traumatol 2012;28(5):358-63.
25. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. J Periodontol. 1986;57:370-7.
26. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. J Endod 1994;20:276-8.
27. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, Diogenes A. 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.

28. Basrani BR, Manek S, Sodhi RN, Fillery E, Manzur A. Interaction between sodium hypochlorite and chlorhexidine gluconate. *J Endod* 2007;33(8):966-9.
29. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009;42:1118-26.
30. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspids using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J* 2009;42:84–92.
31. Verdellis K, Eliades G, Oviir T, Margelos J. Effect of chelating agents on the molecular composition and extent of decalcification at cervical, middle and apical root dentin locations. *Endod Dent Traumatol* 1999;15(4):164-70.
32. Gomes BP, Ferraz CC, Garrido FD, Rosalen PL, Zaia AA, Teixeira FB, de Souza-Filho FJ. Microbial susceptibility to calcium hydroxide pastes and their vehicles. *J Endod* 2002;28(11):758-61.
33. Vianna ME, Gomes BP, Sena NT, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza Filho FJ. In vitro evaluation of the susceptibility of endodontic pathogens to calcium hydroxide combined with different vehicles. *Braz Dent J* 2005;16:175-80.
34. de Souza-Filho FJ, Soares Ade J, Vianna ME, Zaia AA, Ferraz CC, Gomes BP. Antimicrobial effect and pH of chlorhexidine gel and calcium hydroxide alone and associated with other materials. *Braz Dent J* 2008;19(1):28-33.
35. Gomes BP, Montagner F, Berber VB, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, Souza-Filho FJ. Antimicrobial action of intracanal medicaments on the external root surface. *J Dent* 2009;37(1):76-81.
36. Neha K, Kansal R, Garg P, Joshi R, Garg D, Grover HS. Management of immature teeth by dentin-pulp regeneration: a recent approach. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16(7):e997-1004.
37. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, *et al.* Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod* 2010;36:1086-91.

38. 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;35:745-9.
39. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J* 2012;45:294-305.
40. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiol Immunol.* 1993;8:172-6.
41. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YH, Chiang CP. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod* 2009;35:160–4.
42. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T *et al.* Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008; 34:166–71.
43. Seo B-M, Mirura M, Gronthos S *et al.* Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *The Lancet* 2004; 364:149–55.
44. Hermann NV, Lauridsen E, Ahrensburg SS, Gerds TA, Andreasen JO. Periodontal healing complications following extrusive and lateral luxation in the permanent dentition: a longitudinal cohort study. *Dent Traumatol* 2012;28(5):394-402.
45. Zeichner-David M, Oishi K, Su Z *et al.* Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Development Dynamics* 2003;228:651–63.
46. Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy—current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent* 2010; 28: 1-9.
47. Gordon TM, Damato D, Christner P. Solvent effect of various dilutions of sodium hypochlorite on vital and necrotic tissue. *J Endod* 1981;7:466–9.

48. Robertson A, Andreasen FM, Bergenholtz G *et al.* Incidence of pulp necrosis subsequently to pulp canal obliteration from trauma of permanent incisors. *J Endod* 1996;22, 557–60.
49. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010; 36(1): 56-63.
50. Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod* 2012;38(10):1330-6.
51. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod*. 2007;33:680–9.



Figure 1. Clinical views of an upper left central incisor of the group treated with Triple Antibiotic Paste (TAP) before (A), and after revascularization therapy (B). Clinical views of an upper right central incisor of the group treated with Calcium Hydroxide Paste (CHP) before (C), and after revascularization therapy (D).

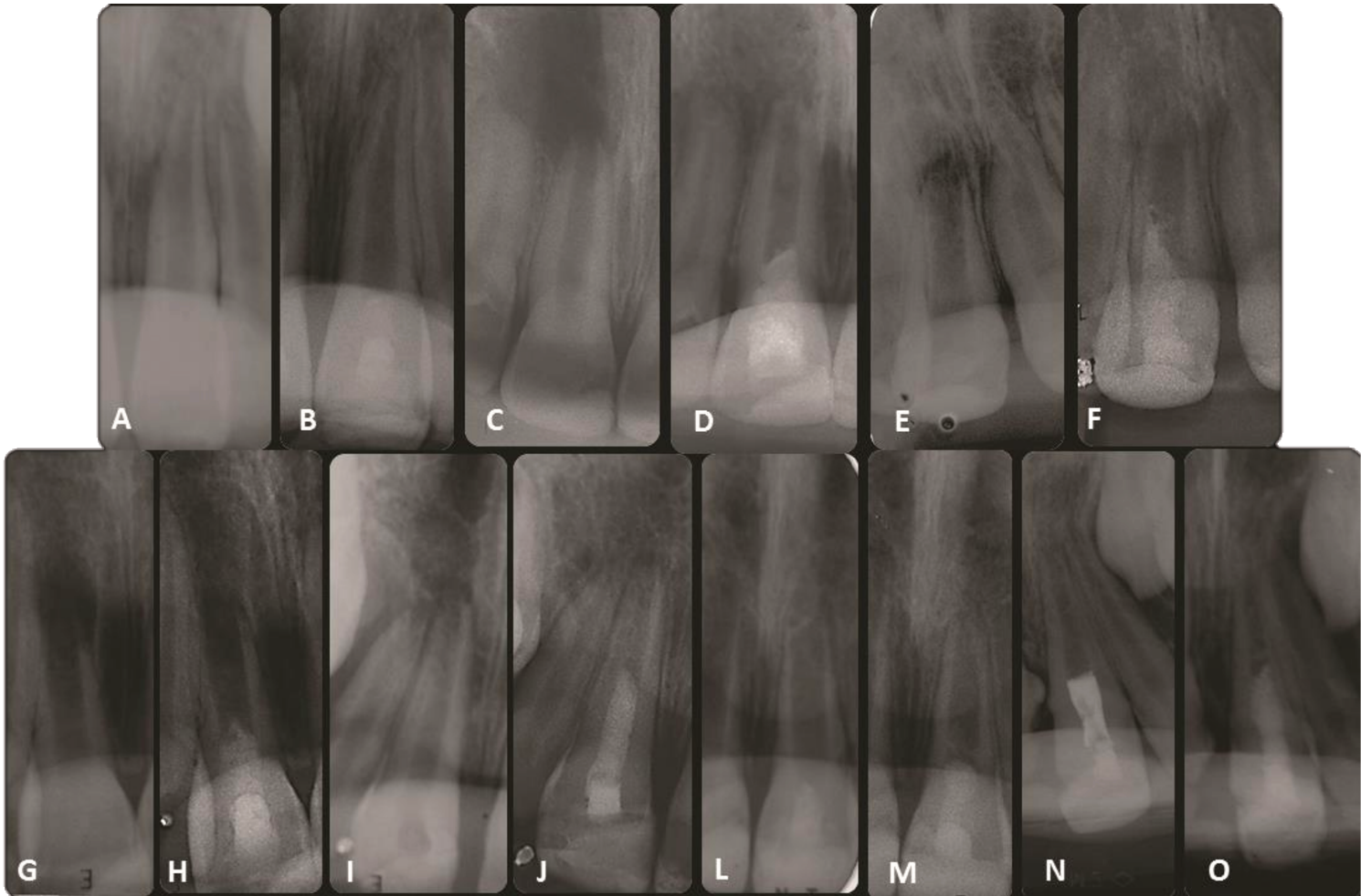


Figure 2. Teeth of the group treated with Triple Antibiotic Paste (TAP), showing initial radiographs before revascularization therapy (A, C, E, G, I, L, N), and final follow-up radiographs (B, D, F, H, J, M, O).

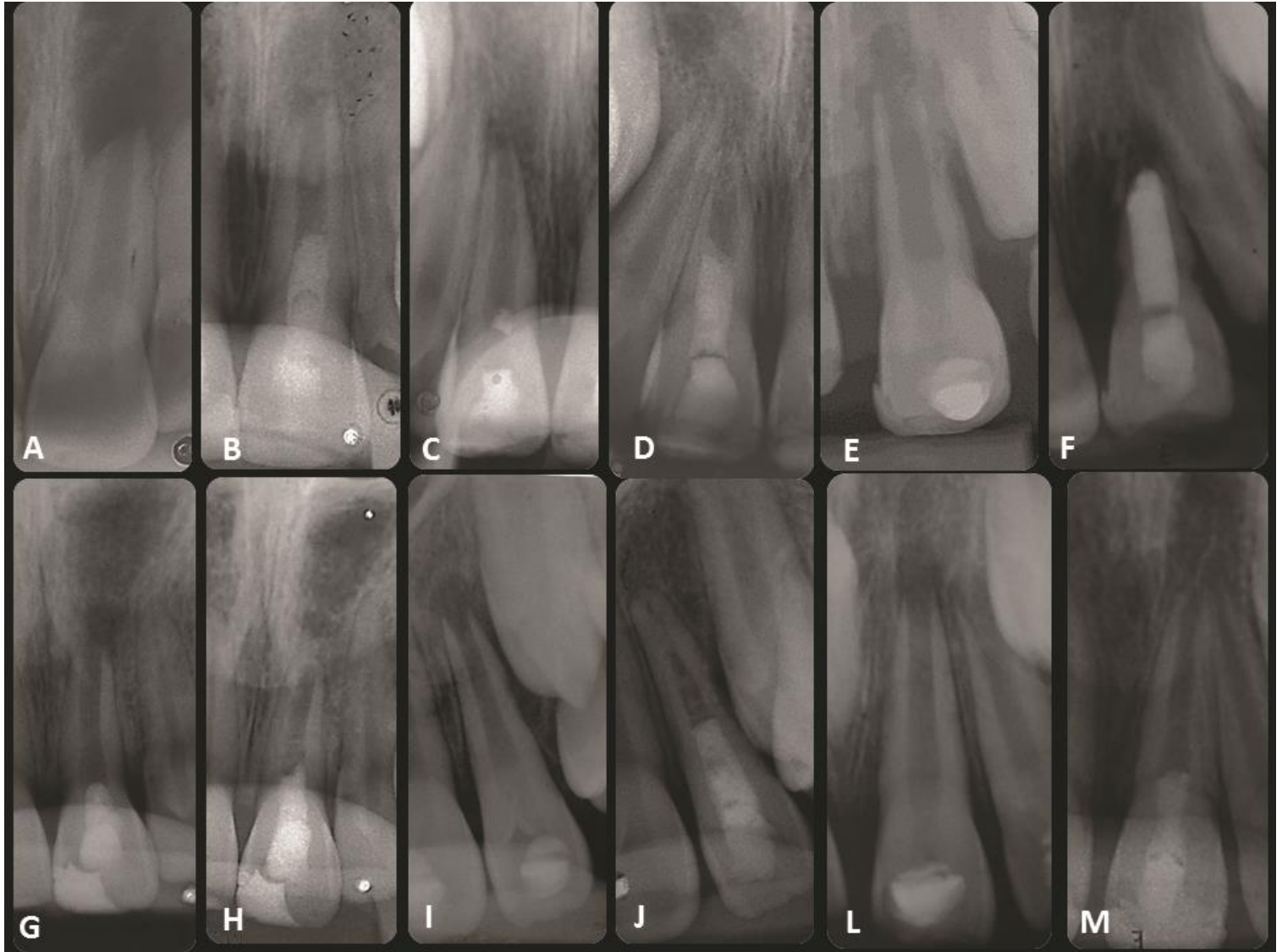


Figure 3. Teeth of the group treated with Calcium Hydroxide Paste (CHP), showing initial radiographs before revascularization therapy (A, C, E, G, I, L), and final follow-up radiographs (B, D, F, H, J, M).

Table 1. Clinical evaluation before and after revascularization therapy in Groups treated with Triple Antibiotic Paste (TAP) and with Calcium Hydroxide Paste (CHP).

Clinical Aspects	Group TAP (n=7)		Group CHP (n=6)	
	Before	After	Before	After
Spontaneous pain	4(57.14%)	0(0%)	3(50%)	0(0%)
Pulp sensibility	0(0%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Pain on percussion	4(57.14%)	0(0%)	3(50%)	0(0%)
Pain on palpation	3(42.85%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Sinus tract	1(14.28%)	0(0%)	1(16.67%)	0(0%)
Swelling	1(14.28%)	0(0%)	0(0%)	0(0%)
Crown Discoloration	1(14.28%)	6(85.71%)	0(0%)	0(0%)

Table 2. Radiographic evaluation observed before and after revascularization therapy in groups medicated with Triple Antibiotic Paste (TAP) and with Calcium Hydroxide Paste (CHP).

Radiographic aspects	Group TAP (n=7)		Group CHP (n=6)	
	Before	After	Before	After
Periapical lesion	6(85.71%)	0(0%)	5(83.33%)	1(16.66%)
Apical Closure	0(0%)	5(71.42%)	0(0%)	4(66.67%)
Root canal thickness	0(0%)	1(14.28%)	0(0%)	1(16.66%)
Root length increase	0(0%)	4(57.14%)	0(0%)	2(33.33%)
Root resorption	0(0%)	0(0%)	2(33.33%)	1(16.66%)

CAPÍTULO 2 - MICROBIAL EVALUATION OF TRAUMATIZED TEETH TREATED WITH TRIPLE ANTIBIOTIC PASTE AND CALCIUM HYDROXIDE ASSOCIATED TO 2% CHLORHEXIDINE GEL IN PULP REVASCULARIZATION

ABSTRACT

Introduction: Revascularization outcome depends on microorganism elimination considering that apical repair would not happen in an inflamed and infected tissue. Few studies investigated microbial colonization of immature necrotic teeth and compared intracanal medicaments in revascularization therapy. The aim of this study was to evaluate microbial reduction provided by the use of triple antibiotic paste and calcium hydroxide associated with 2% chlorhexidine gel in revascularization therapy and, investigate the presence of bacterial species using polymerase chain reaction (PCR) analysis. **Methods:** Fifteen patients (7-17 years-old) presenting immature teeth were treated with revascularization and divided in group TAP (n=7) which was medicated with triple antibiotic paste and the group CHP that was treated with calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel (CHP) (n=8). Samples were taken initially, before any treatment (S1), after irrigation using 6% NaOCl (S2), after irrigation with 2% CHX (S3), after intracanal medicament (triple antibiotic paste or calcium hydroxide paste) for 21 days (S4) and after 17% EDTA irrigation (S5). Cultivable bacteria recovered from infected root canals at the five stages were counted and identified by means of PCR assay (16S rDNA). Quantitative data were statistically analyzed using Mann-Whitney and Friedman tests ($p < 0.05$), and qualitative data were correlated using Pearson and Exact Fisher tests ($p < 0.05$). **Results:** Both groups presented CFU counts decreasing significantly from S1 to S2 ($p < 0.05$). No significant difference was found between S2 and S3 ($p = 0.99$) for both groups. In addition, intracanal dressing (groups TAP and CHP) did not differ in relation to CFU counts ($p = 0.95$). The most prevalent bacteria identified were *Actinomyces naeslundii* (66.67%), *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra* and *Fusobacterium nucleatum*

were detected in 33.34% of root canals. Moreover, PCR identified *Porphyromonas gingivalis* in 26.27%, *Prevotella intermedia* in 26.27%, *Tannerella forsythia* in 20%, *Filifactor alocis* in 13.33% and *Treponema denticola* in 13.33%. An average of 2.13 species per canal was found. **Conclusion:** Both pulp revascularization protocols using these intracanal medicaments were efficient in reducing viable bacteria of necrotic immature teeth.

Key-words: pulp revascularization, antibiotic paste, calcium hydroxide, polymerase chain reaction

INTRODUCTION

Immature traumatized teeth may become infected through crown fractures or cracks and through aseptic necrosis (1). Bacteria invasion gradually promotes inflammation of pulp tissue, and if these factors were not treated, it would result in necrosis of pulp tissue. Pulp necrosis promotes the destruction of radicular odontoblasts, resulting in interruption of root development in immature teeth. Treatment for immature teeth with pulp necrosis may be performed through apexification and revascularization (2).

Revascularization therapy brings more advantages than apexification, inducing root end development and reinforcement (3-5). For the observation of the outcomes of revascularization, infection must be eliminated considering that apical repair would not happen in an inflamed and infected tissue. A variety of decontamination protocols for pulp revascularization have been reported and most of them employed sodium hypochlorite as irrigant solution and triple antibiotic paste (metronidazole, ciprofloxacin and minocycline) as intracanal medicament (6-8). Both substances present antimicrobial action against endodontic pathogens (9,10). Recently, alternatives have been studied such as chlorhexidine as irrigant solution and calcium hydroxide as intracanal medicament, with promising results in

revascularization therapy (11-14). Considering the relevance of infection removal and apical repair in immature teeth, it is important to know the bacteria most commonly found in this sort of infection. To date, there are very few studies on the microbial colonization of immature necrotic teeth that suffered dental trauma. In addition, there are not conclusive studies comparing the efficacy of intracanal medicaments that have been employed in the revascularization therapy. Therefore, the aim of this study was to evaluate the microbial composition of immature teeth that suffered pulp necrosis due to dental trauma and to assess their reduction during different stages of the endodontic revascularization therapy performed with triple antibiotic paste and calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel as intracanal medicaments.

MATERIAL AND METHODS

Patient selection

Patients who attended Dental Trauma Service of the Piracicaba Dental School, State University of Campinas – UNICAMP, Piracicaba, SP, Brazil, for dental trauma treatment were included in this research. A detailed dental history was obtained from each patient. Those who had received antibiotic treatment during the last 3 months or who had any general disease were excluded. The Human Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School approved the protocol describing the sample collection for this investigation, and all volunteer guardians signed an informed consent form. The age of the patients ranged from 7-17 years. Inclusion criteria were composed of immature teeth diagnosed with pulp necrosis due to hard tissue dental trauma and/or due to some severe luxation (extrusive luxation, lateral luxation, intrusive luxation, and avulsion). Regarding immature development, teeth should present apical opening larger than 1,1 mm measured through the initial radiograph. Pulp necrosis was verified through

sensibility cold test (Endo Ice, Roeko™, Germany), electric test (Pulp Tester™, Analytic Technology, Redmond, USA) and/or radiographic evidence of periapical lesion and/or presence of sinus tract. In addition, teeth should not present root fractures or periodontal disease.

Microbial samples were collected from fifteen upper incisors teeth with pulp necrosis, all showing radiographic evidence of immature root. The following clinical/radiographic features were collected for further analyses: spontaneous pain (SP), tenderness to percussion (TP), pain on palpation (POP), presence of radiolucent area (PL), sinus tract (ST), mobility (M) and swelling (SW). Teeth were divided in two groups according to intracanal medicament that was employed: the group medicated with triple antibiotic paste (TAP) (n=7) and the group dressed with the association of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel (CHP) (n=8).

Sampling procedures for triple antibiotic paste group (TAP) and for calcium hydroxide group (CHP)

The method used for the disinfection of the operative field has been previously described (15). Briefly, the teeth were anesthetized and isolated with a rubber dam. The crown and surrounding structures were disinfected with 30% H₂O₂ (volume/volume [V/V]) for 30 seconds, followed by 2.5% NaOCl for the same period of time and then inactivated with 5% sodium thiosulfate. The sterility of the samples taken from both external and internal surfaces of the crown and its surrounding structures was checked by taking a swab sample from the crown surface and streaking it on blood agar plates, which were incubated aerobically and anaerobically. The access cavity preparation was made without the use of water spray but under manual irrigation with sterile saline solution and by using a sterile high-speed diamond bur. Before entering the pulp chamber, the access cavity was disinfected according to the protocol described previously. The sterility of the internal surface of the access cavity was checked as previously described, and all procedures were performed aseptically.

Five samples were collected from each of the 15 single-rooted incisors. The microbial sample was taken by introducing 3 sterile paper points (size #30; Dentsply-Maillefer, Ballaigues, Switzerland) into the full length of the canal (determined radiographically) and retaining them in position for 60 seconds. Next, the paper points were pooled in a sterile tube containing 1 mL VMGA III transport medium for microbial cultivation and for DNA extraction to detect target bacteria using the molecular method (16S rDNA).

Clinical procedures (revascularization)

The first microbial sampling (S1) was taken soon after the cavity access, before any treatment. After, root canal systems were irrigated with 20 mL of 6% sodium hypochlorite (NaOCl), which was inactivated with 5 mL of sterile 5% sodium thiosulfate during 1-minute period. Following, the canals were irrigated with 5 mL of sterile saline physiological solution and a second sample was taken (S2). Root canals were then irrigated with 10 mL of 2% chlorhexidine, which was neutralized with 5 mL of 5% Tween 80 and 0.07% soy lecithin (to reduce the carryover effect of chlorhexidine). Following the canals were irrigated with 10 mL of sterile saline physiological solution and a third sample was taken (S3). They were then dried with paper points. In the TAP group (), the teeth were dressed with a mixture of 250 mg ciprofloxacin, 400 mg metronidazole, and 50 mg minocycline, prepared as described by Hoshino *et al* (16), which was left in the canals for 21 days. For teeth in group CHP, the canals were dressed with a paste composed of calcium hydroxide (Biodinâmica, Ibiporã, Brazil) and 2% chlorhexidine gel (Endogel, Itapetininga, São Paulo, Brazil) in the proportion of 1:1 in a creamy consistency, also left in the canals for 21 days. The access cavities of all teeth were sealed with Coltosol (Coltene-Whaledent, Langenau, Germany) and composite resin (Z250 Filtek; 3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brazil). After a period of 21 days, after rubber dam isolation, the canals were re-assessed. The intracanal medicament was removed with 10 mL of physiologic solution irrigation and the

fourth sample was taken (S4). After this, a final irrigation with 3 mL of 17% EDTA solution (Fórmula e Ação, São Paulo, Brazil) for 3 minutes was done, followed by 5 mL irrigation with physiological solution. Then a final sample was collected (S5). Then, a manual K-file (Dentsply-Maillefer, Swiss) was introduced into the root canal and placed at 2 mm beyond the working length to induce bleeding into the canal. The bleeding was allowed to reach a level 3 mm below the cemento-enamel junction, and teeth were left for 5 minutes so that a blood clot was formed. CollaCote (Zimmer Dental, Carlsbad, CA) fibers were placed on the blood clot, and then a 3-mm white MTA (Angelus™, Londrina, Brazil) barrier was placed. The access opening was sealed with coltosol (Coltene-Whaledent, Langenau, Germany) and restored with composite resin (Z250 Filtek; 3M ESPE, Sumaré, São Paulo, Brazil).

Microbiological cultivation

Inside an anaerobic chamber, the samples were vortexed for 60 seconds and diluted in fastidious anaerobe broth (FAB) (Lab M, Bury, UK) by 10-fold serial dilution to 10^{-4} . A volume of 50 μ L of each dilution was spread onto 5% defibrinated sheep blood (Fastidious Anaerobe Agar [FAA], Lab M) containing 5 mg/mL of hemin (final concentration of 5 mg/mL) and 1 mg/mL of vitamin K1 (final concentration of 1 mg/mL). The plates were incubated at 37°C in an anaerobic atmosphere for up to 7 days. After this period, the colony forming units (CFUs) grown were counted and then transformed into actual counts based on the known dilution factors.

DNA extraction

Microbial DNA from all stages of revascularization samples (S1, S2, S3, S4 and S5) and control sample, as well as from ATCC bacteria, were extracted

and purified by using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The DNA concentration (absorbance at 260 nm) was determined with a spectrophotometer (Nanodrop 2000; Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

PCR assay

The PCR reaction was performed in a thermocycler (MyCycler; Bio-Rad, Hercules, CA, USA) with a total volume of 25 μ L containing 2.5 μ L of 10 \times Taq buffer (1 \times) (MBI Fermentas, Mundolsheim, France), 0.5 μ L of dNTP mix (25 μ M of each deoxyribonucleoside triphosphate: dATP, dCTP, dGTP and dTTP) (MBI Fermentas, Hanover, MD, USA), 1.25 μ L of 25 mM MgCl₂, 0.25 μ L of forward and reversal universal primers (0.2 μ M) (Invitrogen, Eugene, OR, USA), 1.5 μ L of sample DNA (1 μ g/50 μ L), 1.5 μ L of Taq DNA polymerase (1 U) (MBI Fermentas), and 17.25 μ L of nuclease-free water.

Statistical Analysis

The data collected from microbial cultivation were typed onto a spreadsheet and statistically analyzed using SPSS for Windows (SPSS Inc, Chicago, IL). The Friedman test evaluated significance reduction of CFU/mL after each decontamination step of revascularization therapy, and Mann Whitney test examined microbial reduction differences between the groups ($P < 0.05$). Besides it, the Pearson chi-square test or the one-sided Fisher exact test, as appropriate, was chosen to examine the null hypothesis that there is no relationship between endodontic symptoms and signs, and the presence of specific bacterial species. Fisher's Exact test was applied to test the null hypothesis that there was no relationship between any pair of bacterial species recovered from the root canal ($P < 0.05$). When there was a significant difference, indicating that the relationship

between the pair of species was present, the odds ratio was calculated. Positive associations were those with an average odds ratio >2.0 and negative associations were those with an average odds ratio <0.5 .

RESULTS

All disinfection control samples yielded no growth, confirming effective disinfection of the tooth surfaces by culture and PCR technique (16s rDNA).

The bacterial counting at each stage of revascularization therapy is shown in table 1. Most of S1 sample produced high bacterial counting. Of these, the quantity of microorganisms recovered ranged from 5.56 to 6.11 log (CFU/mL) (with median of 5.84 log [CFU/mL]). After irrigation with 6% NaOCl (S2), all cases showed significant reduction in CFU/mL ($p<0.05$) nevertheless two cases presented microbial growth ranging from 0 to 5.77 log (CFU/mL) (with median of 1.11 log [CFU/mL] for group TAP, and 0.88 log [CFU/mL] for group CHP). Irrigation with 2% chlorhexidine promoted reduction in bacterial counts, without significant difference between S2 and S3 ($p=0.99$) for both groups, with only one case in each group presenting microbial growth. After intracanal dressing (groups TAP and CHP) (S4) cultures of one tooth of group TAP and two teeth of group CHP were positive (median of 0.96 log [CFU/mL] for group TAP, and median of 1.09 log [CFU/mL] for group CHP). These counts after intracanal dressing of both groups did not differ in relation to CFU counts ($p=0.95$). The final irrigation with EDTA (S5) demonstrated no viable bacteria in both groups without statistical differences between the groups.

Considering microbial identification, the target species were mostly detected in 13 of the 15 cases (86.67%) of the initial sample (S1). Of the species studied, *Actinomyces naeslundii* was the most prevalent species in canals of immature teeth, being detected in 10 of 15 cases (66.67%). The prevalence values of the other microbial species were as follows: *Porphyromonas endodontalis* (5/15,

33.34%), *Parvimonas micra* (5/15, 33.34%), *Fusobacterium nucleatum* (5/15, 33.34%), *Porphyromonas gingivalis* (4/15, 26.27%), *Prevotella intermedia* (4/15, 26.27%), *Tannerella forsythia* (3/15, 20%), *Filifactor alocis* (2/15, 13.33%) and *Treponema denticola* (2/15, 13.33%). The microbial findings and clinical features of each case are presented in Table 2. An average of 2.13 species per canal was found. No statistical correlation was observed between bacteria species and clinical/radiographic features.

DISCUSSION

Revascularization therapy has emerged as a promising alternative to apexification, stimulating root end development and reinforcing root walls of immature teeth. For this outcome, infection should be eliminated, disrupting the microbial ecosystem without the use of mechanical files for the preservation of undifferentiated cells. A variety of decontamination protocols has been proposed (19-22). In the present study, the association of two potent irrigant solution (NaOCl and chlorhexidine) was performed to achieve maximum elimination of microorganisms considering that no mechanical instrumentation was performed. Both solutions have demonstrated efficacy to disinfect immature root canals in the revascularization therapy, and protocols associating these substances showed promising results (11,12). The decontamination with NaOCl reduced significantly CFU/mL counts, which will contribute to apical repair. It may be explained due to the well-known antimicrobial properties of NaOCl which is proportional to the employed concentration and was previous recommended for some case reports in the literature (23,24). Chlorhexidine solution was also associated based on its extended residual anti-microbial properties and the potential to act inside contaminated dentinal tubules (25,26).

Considering the use of antibiotic paste and calcium hydroxide paste, both intracanal medicaments showed reduction on bacterial counts without

statistical difference, which was also observed in previous studies reported in the literature with the use of these medicaments (27-30). Despite similar results concerning bacterial reduction, antibiotic paste promoted crown discoloration due to the presence of minocycline in its composition. Recent trends have proposed the use of a bond agent in the inner surfaces of coronal access to avoid undesired crown discoloration, thus preventing any contact between the triple antibiotic paste and the dentinal walls. (12). Despite similar results of both intracanal medicaments, the bacterial reduction promoted by the first session may suggest that pulp revascularization may be concluded in single visit without the necessity of an inter appointment dressing. One step revascularization therapy was already described in the literature, with completion of root maturation (11).

The present study also investigated microbiologic design of young teeth, and observed that it presents similarities with primary endodontic infection seen in completely formed teeth. It is well established that if bacteria and their byproducts promote pathological alterations in immature pulp tissue, root development may stop. Necrotic environment associated to decrease in oxygen availability, create anaerobic conditions for bacteria colonization. PCR-based analyses of primary infection in completed formed teeth show predominance of strict anaerobes and some facultative anaerobes species (31,32). Black pigmented bacteria such as *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* and *Prevotella intermedia*, generally are related with primary root canal infection and these species were also identified in the present study. This finding is in accordance with previous microbial identification study with immature teeth (33). In the present study, the most frequent specie was *Actinomyces naeslundii*, a facultative bacteria that is associated to failed asymptomatic endodontic therapy (37). These bacteria may be eliminated when in contact with sodium hypochlorite and the interappointment use of calcium hydroxide (35). Despite it, in the present study, *Actinomyces naeslundii* could not be completely eliminated from all root canals. In addition, strict anaerobic bacteria such as *P. endodontalis* and *P. micra* were

detected in five initial samples and literature frequently associates these microorganisms with primary infection (32).

PCR-based identification, not being dependent on bacterial viability, may not be as technique-sensitive as anaerobic culture. In this context, bacterial counts were associated to evaluate viability of microorganisms after each step of revascularization therapy, which demonstrated statistical reduction of viable bacteria. In addition, despite the use of VMGA III as a transport medium, which contains agar and other ingredients that could affect the DNA extraction, the amplification with universal primers detected the presence of DNA in all samples. The PCR method used in this study only detects targeted microbial species and the results showed that the target species were not detected in two cases. It is possible that species other than those studied could have been present in the examined teeth, considering that universal primer detected the presence of bacterial DNA.

In addition, molecular techniques allow a more reliable identification of diverse bacterial species, especially some difficult-to-grow bacteria. Fastidious bacterial species such as *T. forsythia*, *F. alocis*, and *T. denticola* were detected in respectively, 20%, 13.33% and 13.33% of the teeth. However, completed formed teeth with primary infection have demonstrated higher percentages of these bacteria (36). Most samples collected after passive decontamination and intracanal medicament revealed efficient destruction of bacterial species, considering they were not identified by PCR. These molecular data associated to microbial counting reinforced the benefits of the antimicrobial properties of employed agents, which would benefit apical repair. Further studies, using another bacteria species and different PCR analyses are necessary to better evaluate the microbiota of immature teeth.

In conclusion, this study showed that the irrigant solutions employed in the first session were efficient to reduce viable bacteria in revascularization therapy. Considering intracanal medicaments, no difference related to bacterial reduction was observed.

REFERENCES

1. Sundqvist G, Figdor D. Life as an endodontic pathogen. *Endod Topics* 2003;6:3–28.
2. Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB. Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2013; 39:S30-43.
3. 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: 919–25.
4. Bansal R, Bansal R. Regenerative endodontics: a state of the art. *Indian J Dent Res.* 2011; 22(1): 122-31.
5. Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K. A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod.* 2009; 35(10): 1343-9.
6. 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.
7. Lenzi R, Trope M. Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod* 2012;38:411–4.
8. Keswani D, Pandey RK. Revascularization of an immature tooth with a necrotic pulp using platelet-rich fibrin: a case report. *Int Endod J* 2013 (in press).
9. Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005; 31(6): 439-443.
10. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004; 37(7): 438-46.

11. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009; 42: 1118–26.
12. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J* 2009; 42: 84–92.
13. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol* 2011; 27: 55–58.
14. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod* 2011;37:1327-30.
15. Martinho FC, Chiesa WM, Leite FR, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod* 2010;36:1467–74.
16. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. *In vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996; 29: 125-130.
17. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, *et al.* Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:1536–41.
18. Martinho FC, Chiesa WMM, Leite FRM, Cirelli JA, Gomes BPFA. Antigenic activity of bacterial endodontic contents from primary root canal infection with periapical lesions against macrophage in the release of interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha. *J Endod* 2010;36:1467–1474.
19. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196–200.
20. Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod* 2008;34:876–87.

21. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010;36:536–41.
22. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009;42:1118–26.
23. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J* 2010;55(4):446-52.
24. Yang J, Zhao Y, Qin M, Ge L. Pulp revascularization of immature dens invaginatus with periapical periodontitis. *J Endod* 2013;39(2):288-92.
25. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol* 1986;57(6):370-7.
26. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20(6):276-8.
27. 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): 611-616.
28. Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J* 2013 (in press).
29. Cehreli ZC, Sara S, Aksoy B. Revascularization of immature permanent incisors after severe extrusive luxation injury. *J Can Dent Assoc.* 2012;78:c4.
30. Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod* 2011;37(4):562-7.
31. Gomes BP, Montagner F, Jacinto RC, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Polymerase chain reaction of *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia* in primary endodontic infections. *J Endod* 2007;33:1049-52.

32. Gomes BP, Pinheiro ET, Gadê-Neto CR, Sousa EL, Ferraz CC, Zaia AA, Teixeira FB, Souza-Filho FJ. Microbiological examination of infected dental root canals. *Oral Microbiol Immunol* 2004;19:71-6.
33. Baumotte K, Bombana AC, Cai S. Microbiologic endodontic status of young traumatized tooth. *Dent Traumatol* 2011;27(6):438-41.
34. Xia T, Baumgartner JC. Occurrence of Actinomyces in infections of endodontic origin. *J Endod* 2003;29:549-52.
35. Radcliffe CE, Potouridou L, Qureshi R, Habahbeh N, Qualtrough A, Worthington H, Drucker DB. Antimicrobial activity of varying concentrations of sodium hypochlorite on the endodontic microorganisms *Actinomyces israelii*, *A. naeslundii*, *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Int Endod J* 2004;37:438-46.
36. Gomes BP, Jacinto RC, Pinheiro ET, Sousa EL, Zaia AA, Ferraz CC, Souza-Filho FJ. Molecular analysis of *Filifactor alocis*, *Tannerella forsythia*, and *treponema denticola* associated with primary endodontic infections and failed endodontic treatment. *J Endod* 2006;32:937-40.

Table 1. Descriptive statistics of the colony forming units - CFU/ml (log10) - mean values and standard deviations (SD).

Group	N	Initial (S1)	NaOCl (S2)	CHX (S3)	MIC (S4)	EDTA (S5)
TAP	8	5.84 (0.17)Aa	1.11 (2.08)Ba	0.41 (1.17)Ba	0.96 (1.78)Ba	0 (0)Ba
CHP	7	5.80 (0.63)Aa	0.88 (0)Ba	0.53 (1.36)Ba	1,09 (1.86)Aa	0 (0)Ba

Means values followed by different letters (uppercase in horizontal and lowercase in vertical comparing bacteria counts within each step of revascularization therapy) differ ($p < 0.05$, Friedman test). There was no difference between the groups in relation to each step of revascularization protocol ($p = 0.7723$, Man Whitney test).

Table 2. Clinical Features and Bacterial Findings in 15 immature pulp necrotic teeth.

P	G	T	A	GR	TR	SP	TP	POP	F	M	AB	PL	PCR
1	TAP	21	7	F	Extrusive luxation	Y	Y	Y	N	N	Y	Y	<i>Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas gingivalis, Actinomyces naeslundii, Parvimonas micra</i>
2	CHP	21	7	M	Avulsion	Y	Y	Y	N	Y	N	N	<i>Fusobacterium nucleatum, Actinomyces naeslundii</i>
3	TAP	11	16	M	Extrusive luxation	N	N	N	N	N	N	Y	<i>Fusobacterium nucleatum, Actinomyces naeslundii</i>
4	CHP	21	16	M	Extrusive luxation	N	N	N	N	N	N	Y	<i>Tannerella forsythia, Actinomyces naeslundii</i>
5	CHP	21	8	M	Intrusive luxation	Y	Y	Y	Y	N	Y	Y	<i>Filifactor alocis, Fusobacterium nucleatum, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Actinomyces naeslundii, Parvimonas micra</i>
6	TAP	11	9	F	Intrusive luxation	N	Y	N	N	N	N	Y	<i>Filifactor alocis, Porphyromonas endodontalis, Tannerella forsythia, Treponema denticola, Actinomyces naeslundii, Parvimonas micra</i>
7	CHP	11	17	F	Extrusive luxation	N	N	N	N	N	N	Y	NONE
8	CHP	22	8	M	Avulsion	N	N	N	N	N	N	N	<i>Fusobacterium nucleatum, Porphyromonas endodontalis, Actinomyces naeslundii</i>
9	TAP	21	9	F	Lateral luxation	Y	N	Y	N	N	N	N	<i>Porphyromonas gingivalis, Actinomyces naeslundii, Parvimonas micra</i>
10	CHP	11	11	F	Extrusive luxation	N	N	N	N	N	N	Y	<i>Porphyromonas endodontalis, Actinomyces naeslundii, Prevotella intermedia,</i>
11	TAP	21	8	M	Extrusive luxation	N	Y	Y	N	N	N	Y	<i>Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia</i>
12	CHP	21	8	M	Extrusive luxation	N	Y	Y	N	N	N	Y	NONE
13	TAP	11	8	F	Lateral luxation	N	N	N	N	N	N	Y	<i>Prevotella intermedia, Parvimonas micra</i>
14	TAP	21	7	M	Extrusive luxation	Y	Y	Y	N	N	Y	N	<i>Porphyromonas endodontalis, Actinomyces naeslundii, Prevotella intermedia,</i>
15	CHP	11	7	F	Extrusive luxation	N	Y	N	N	N	N	Y	<i>Porphyromonas endodontalis, Porphyromonas gingivalis</i>

P= patient; G= group; T= tooth; A= age; GR= gender; TR= type of trauma; SP= spontaneous pain; TP= tenderness to percussion; POP= pain on palpation; ST= sinus tract; M= mobility; SW= swelling; PL= periapical lesion; PCR= Polymerase Chain Reaction. There was no statistical difference between bacteria species and intracanal medicament used (Pearson chi-square test and the one-sided Fischer exact test).

CAPÍTULO 3 – PROTOCOL OF PULP REVASCULARIZATION FOR IMMATURE REPLANTED TEETH: REPORT OF CASES

ABSTRACT

Introduction: Some pulp revascularization studies report success in luxated dental trauma cases and avulsed teeth usually are not indicated considering the possibility of complications. Meantime, appropriate disinfection of root canal associated to the use of an alkaline intracanal medicament may enable the application of revascularization. The aim of this report was to describe two clinical cases of immature replanted teeth which were treated with the protocol of pulp revascularization with calcium hydroxide associated to 2% chlorhexidine gel.

Methods: The first patient, an 8-year-old boy suffered an avulsion on his maxillary left lateral incisor. Tooth was replanted after 30 minutes. The second case refers to a 7-year-old boy that suffered an avulsion in the upper central left incisor, and the tooth was replanted after 150 minutes. Both patients presented immature teeth which were diagnosed with pulp necrosis. The treatment consisted of revascularization therapy using irrigation with 6% sodium hypochlorite, 2% chlorhexidine and sterile saline, in addition to intracanal medication with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel for 21 days. In the second session, blood clot was stimulated up to the cervical third of the root canal. MTA was used as a cervical barrier of the canal. Coronal sealing was performed with temporary filling material and composite resin restoration. **Results:** During the follow-up period, the first case demonstrated apical closure and calcification in the apical third. In the second case, root resorption progressed after revascularization treatment, being performed apexification therapy with an obturation paste. **Conclusion:** Avulsed immature tooth replanted in shorter extra-alveolar time and maintained in viable storage medium may be alternatively treated with revascularization therapy.

Key-words: pulp revascularization; tooth avulsion; immature teeth

INTRODUCTION

Pulp revascularization may be a promising alternative to immature teeth diagnosed with pulp necrosis (1-3). Studies in this area are not recent, and began with the objective of pulp revascularization on replanted and transplanted teeth (4-6). These researches showed revascularization of the pulp tissue in some cases and root resorption complications in others, demonstrating the unpredictability of this procedure (7,8). Recently, pulp revascularization has been reported to promote root development with increasing in length, apical closure and narrowing of root canal space in necrotic immature teeth, as an alternative for apexification (9-12). The treatment protocol generally involves passive decontamination complemented with intracanal dressing composed of antibiotic paste (13,14). Besides antibiotic intracanal medicament, some reports also showed favorable results with calcium hydroxide dressing, considering its antimicrobial properties, and efficacy in stimulation of tissue deposition (10,15,16).

Some pulp revascularization studies report success in luxated dental trauma cases (17,18), however, in avulsed teeth this treatment are not indicated considering the possibility of complications. Tooth avulsion is generally associated to pulp and periapical sequels and the gravity of these complications are directly related to the time till the replantation, tooth storage medium and treatment of root surface (19,20). The high possibility of complications and the unfavorable conditions till replantation in dental avulsion may contra-indicate pulp revascularization therapy. Meantime, appropriate disinfection of root canal associated to the use of an alkaline intracanal medicament may enable the application of revascularization. With this, revascularization therapy composed of appropriate decontamination associated to intracanal dressing may be a promising alternative for avulsed immature teeth promoting good advantages concerning root development and reinforcement.

The aim of this report was to describe two cases of replantation that were treated with pulp revascularization therapy associated to calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel intracanal medicament.

CASE 1

An 8-year-old boy was referred to the Dental Trauma Service of the Piracicaba Dental School – State University of Campinas/Brazil having fallen at school one week ago. Clinical examination revealed that the upper left lateral incisor had sustained avulsion without crown fracture. Trauma history revealed that tooth was replanted approximately 30 minutes later, after being storage in saline solution. At the Dental Trauma Service it was observed that the replanted tooth presented mobility which was stabilized with a flexible splint, and was symptomatic to percussion test. Radiographic examination showed incomplete root formation of the affected tooth (Figure 1A). During this first visit, cold pulp test (Endo-Frost, Roeko™, Langenau, Germany) and electric test (Pulp Tester™, Analytic Technology, Redmond, USA) were performed and presented questionable responses. No endodontic procedure was accomplished, considering the recent occurrence of trauma, questionable pulp tests and possibility of pulp revascularization of an immature tooth. After three weeks, cold test (Endo-Frost, Roeko™, Langenau, Germany) and electric pulp test (Pulp Tester™, Analytic Technology, Redmond, USA) were repeated, and the lateral left incisor showed negative response. Periapical tests showed no pain on percussion neither to palpation, besides remission of mobility, which led to the decision of removal of the flexible splint after one month. In addition, periapical radiographic demonstrated slight external inflammatory resorption at the distal root surface (Figure 1B). Considering the presence of resorption and negative response to pulp tests, it was decided to perform endodontic treatment. After complete explanation of the treatment procedure, risks and benefits, an informed consent was obtained from

the patient's legal guardians, and the treatment of choice was pulp revascularization in two sessions.

CASE 2

A 7-year-old boy was referred to the Dental Trauma Service of the Piracicaba Dental School – State University of Campinas/Brazil having fallen from bicycle one week ago. Clinical examination revealed that the upper left central incisor had sustained avulsion with enamel-dentin crown fracture. Trauma history revealed that tooth was replanted approximately 150 minutes later, after being maintained for 120 minutes in dry conditions and for 30 minutes storage in physiological solution. At the Dental Trauma Service it was observed that the replanted tooth presented mobility which was stabilized with a flexible splint, and was symptomatic to percussion test. Radiographic examination showed incomplete root formation of the affected tooth (Figure 2A). During this first visit, cold pulp test (Endo-Frost, Roeko™, Langenau, Germany) and electric test (Pulp Tester™, Analytic Technology, Redmond, USA) were performed and presented questionable responses. No endodontic procedure was accomplished, considering the recent occurrence of trauma, and questionable pulp tests. After three weeks, cold test (Endo-Frost, Roeko™, Langenau, Germany) and electric pulp test (Pulp Tester™, Analytic Technology, Redmond, USA) were repeated, and the central left incisor showed negative response. Periapical tests showed no pain on percussion neither to palpation, however tooth still presented mobility, being maintained the flexible splint for one week more. In addition, radiograph examination showed the presence of external inflammatory resorption (Figure 2B). Considering the presence of root resorption and negative response to pulp tests, it was decided to perform revascularization therapy, according to an informed consent obtained from patient's legal guardians.

TREATMENT

Both teeth received the same treatment protocol. Teeth were anesthetized (2% lidocaine, Alphacaine, DFL, Rio de Janeiro, Brazil), isolated with a rubber dam and access cavity was prepared using a diamond bur (KG Sorensen™, Barueri, Brazil) with copious sterile physiologic solution irrigation, without bleeding from the pulp tissue in both teeth. Access cavity and surrounding rubber dam were disinfected with a 2% chlorhexidine gel on a cotton swab. Working length was determined with a periapical radiograph with the use of a #35 Kerr file (Dentsply/ Maillefer, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil) in the canal. The decontamination protocol included a slow and careful irrigation with 20 mL of 6% sodium hypochlorite (Drogal, Piracicaba, SP, Brazil), 10 mL of sterile saline solution, 10 mL of 2% chlorhexidine (Drogal, Piracicaba, SP, Brazil) and then a final irrigation of 10 mL of sterile saline solution, all of the irrigation 3 mm back from working length. The root canals were dried with large paper points until they were removed without evidence of fluid being and filled with a intracanal medicament prepared in the proportion of 1:1 of calcium hydroxide (Biodinâmica™, Ibioporã, Brazil) and 2% chlorhexidine gel (Endogel, Itapetininga, Brazil) in a creamy consistency. The intracanal medicament was inserted into cervical and middle thirds of root canal with a lentulo spiral (Dentsply Maillefer™, Tulsa, OK). The teeth were sealed with coltosol (Coltene/Whaledent™, New Jersey, USA) and composite resin (Filtek 3M Espe™, Sumaré, Brazil). The dressing was left in the root canals for 21 days. At the second visit, teeth were anesthetized (2% lidocaine, Alphacaine, DFL, Rio de Janeiro, Brazil), accessed and irrigated with approximately 10 mL of sterile saline solution for dressing removal. After this, irrigation with 3 mL of 17% EDTA solution (Fórmula e Ação™, São Paulo, Brazil) for 3 minutes was followed by sterile saline solution irrigation, considering the beneficial properties of EDTA on conditioning the dentin for stem cells differentiation (21). After this, root canal space of both teeth were properly dried and manual k-files (Maillefer/Dentsply™, Balaigues, Swiss) was introduced into the root canal and placed at 2 mm beyond the working length to induce bleeding into

the canal. CollaCote (Zimmer Dental, Carlsbad, CA) fibers were placed on the blood clot, and then a 3-mm white MTA barrier (Angelus™, Londrina, Brazil) was placed in the cervical third of root canal (Figure 1C). The accesses were double sealed with Coltosol (Coltene/Whaledent™, New Jersey, USA) and composite resin (Filtek 3M Espe™, Sumaré, Brazil).

FOLLOW-UP

For case 1, it was observed that in all the follow-up visits (at intervals of 1, 3, 6, 9, 12 and 16 months), clinical tests showed no signs and symptoms related to spontaneous pain, pain on percussion and on palpation, and the radiographic examinations demonstrated health healing of periodontal tissues, and stabilization of root resorption. Tooth failed to respond to thermal and electrical stimulation throughout the follow-up period. Standard radiographic examinations demonstrated evidence of periapical bone healing, apical closure, and calcification of the apical third of the root canal (Figures 1D-H).

For case 2, during the follow-up period, patient did not complain about clinical signs and symptoms, and tooth failed to respond to cold and electric tests. Radiographic examination showed that inflammatory root resorption did not stabilize and progressed mainly in the cervical and apical root surfaces (Figures 2C and D). Considering this observation, it was decided to perform apexification therapy in the 6-month follow-up. For this treatment, tooth was accessed; MTA was removed with diamond burs (KG Sorensen™, Barueri, Brazil) under copious sterile physiologic solution irrigation. Root canal was gently instrumented to remove the residual tissue and blood clot that were present. Chemical substances employed during the instrumentation consisted of 2% chlorhexidine gel and sterile physiological solution. After, root canal was dried with sterile paper points and filled with an obturation paste composed of calcium hydroxide (Biodinâmica™, Ibitiporã, Brazil), 2% chlorhexidine gel (Endogel, Itapetininga, Brazil) and zinc oxide

(Biodinâmica, Iporã, Paraná, Brazil) in a 2:1:2 proportion (Figure 2E). This intracanal medicament was previously described in the literature (22,23). Then, tooth was followed-up for 12 months and demonstrated stabilization of root resorption (Figure 2F).

DISCUSSION

Studies demonstrate that traumatized teeth with a completed root formation generally present a higher prevalence of pulp necrosis than teeth with an incomplete root formation (24). Considering tooth avulsion, one study demonstrated only 34% of pulpal healing in replanted immature permanent teeth (25), and another one, reported an 8% revascularization rate (6). In the present study, the immature teeth did not respond positively to sensitivity tests, being diagnosed with pulp necrosis. Another complication that frequently affects avulsed teeth is root resorption (26), and both cases showed inflammatory root resorption after one month of dental trauma episode, probably due to the time elapsed to replant the avulsed tooth and due to the unfavorable storage medium. Considering the diagnosis of pulp necrosis associated to root resorption, endodontic therapy would be required. Literature and clinical practice have described some options for immature teeth therapy, and apexification in one or multiple visits have been the most used and predictable types of treatment for avulsed teeth (27,28). Pulp revascularization has not been indicated for replanted teeth considering the high possibility of root resorption, requiring long periods of dressing with an alkaline intracanal medicament for prevention and stabilization of root resorption. Pulp revascularization therapy was chosen in the present report considering the presence of incomplete root formation and that the use of a medicament composed of calcium hydroxide associated to chlorhexidine gel 2% could promote an alkaline environment to prevent and stabilize root resorption during the period of 21 days. Previous case report had demonstrated the use of this intracanal medicament in

pulp revascularization therapy of a tooth that suffered intrusive luxation, a severe dental trauma with almost the same post-traumatic complications of avulsion (29). In addition, calcium hydroxide intracanal dressing may be a promising alternative, due to its antimicrobial properties (30,31), unlikelihood of crown discoloration (32), possible release of growth factors and biomolecules from dentin (33), and the availability of this medication in routine clinical practice.

Most of pulp revascularization case reports promote decontamination with one irrigant (18,35,36), and few studies employ association of sodium hypochlorite and chlorhexidine (3,14). In the present case reports, root canals were also disinfected with the use of two potent chemical solutions (sodium hypochlorite and chlorhexidine) to ensure maximum bacteria elimination since it would not be used mechanical instrumentation to prevent weakening of the thin root walls. In addition, 2% chlorhexidine was selected based on its extended residual antimicrobial properties, diffusion in dentinal tubules and a relative absence of toxicity (37,38). These irrigants were successful in its goal since it was observed repair in the periapical region and apical closure in the first case.

In the first case, the performed therapy resulted in apical closure and development of calcification inside the root canal after 16-month follow-up. The observed apical repair occurred due to creation of favorable conditions, such as decontamination and removal of pulp tissue debris that could act as substrate to bacteria development. In addition, calcium hydroxide medicament could have stimulated mineral tissue deposition in the apical region. This calcification may present a favorable aspect, promoting strengthening of root structure and avoiding microleakage to periapical tissues. The mechanism of pulp canal calcification (obliteration) in revascularized immature permanent necrotic teeth is not clear. During the follow-up period, patient did not complain about pain neither crown discoloration nor tooth mobility.

On the other hand, case 2 showed unfavorable response to the therapy, with progressive inflammatory root resorption mainly in the cervical and apical thirds. This difference, when compared to the first case, may be explained due to

the unsatisfactory conditions of replantation that occurred after 150 minutes with the tooth being maintained in dry conditions and in physiological solution. It is well-established that periods longer than 30 minutes for replantation inviabilize periodontal ligament cells survive (39), generally conducing to inflammatory root resorption or ankylosis followed by replacement root resorption (40). International Association of Dental Traumatology recommends for the treatment of replanted teeth the use of an alkaline intracanal medicament for one month before definitive obturation (41). Considering the progression of root resorption, it was decided for apexification with an obturation paste that was previous reported in the literature (22,23). This obturation paste presents high radiopacity and did not need periodic exchanges for mineralizing barrier formation (22,23,40).

The first case demonstrated that revascularization therapy may also be an alternative of treatment for replanted immature tooth with pulp necrosis, when favorable conditions of replantation were present. In these cases, the use of an intracanal medicament composed of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel may act as an alternative in pulp revascularization therapy. However, when there is high possibility of post-traumatic complications due to unfavorable replantation conditions, pulp revascularization therapy may not be indicated. In these conditions, longer periods giving time for alkaline intracanal medicament actuation may be necessary for the elimination of bacteria and prevention or stabilization of root resorption.

It may be concluded that the choice of the treatment for avulsed immature teeth diagnosed with pulp necrosis should be carefully indicated. Favorable conditions of replantation may lead for a pulp revascularization therapy with intracanal medicament composed of calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. Meantime, longer time for replantation and unfavorable storage medium of an avulsed tooth with high possibility of post-traumatic complications may not indicate pulp revascularization, making the apexification therapy the first choice.

REFERENCES

1. Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J* 2013 (in press).
2. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J* 2012;45(3):294-305.
3. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009;42(12):1118-26.
4. Pafford EM. Homogenous transplants of preserved frozen teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1956;9(1):55-70.
5. Myers HI, Flanagan VD. A comparison of the results obtained from transplantation and replantation experiments using Syrian hamster teeth. *Anat Rec* 1958;130:497-313.
6. Kling M, Cvek M, Mejare I. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endod Dent Traumatol* 1986;2(3):83-9.
7. Johnson DS, Burich RL. Revascularization of reimplanted teeth in dogs. *J Dent Res* 1979;58(2):671.
8. Sheppard PR, Burich RL. Effects of extra-oral exposure and multiple avulsions on revascularization of reimplanted teeth in dogs. *J Dent Res* 1980;59(2):140.
9. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001;17:185–7.
10. Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol* 2011;27:55–58.

11. 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.
12. Yang J, Zhao Y, Qin M, Ge L. Pulp revascularization of immature dens invaginatus with periapical periodontitis. *J Endod* 2013;39(2):288-92.
13. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196–200.
14. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J* 2009;42:84–92.
15. Cehreli ZC, Sara S, Aksoy B. Revascularization of immature permanent incisors after severe extrusive luxation injury. *J Can Dent Assoc.* 2012;78:c4.
16. Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative Endodontic Treatment (Revascularization) of Immature Necrotic Molars Medicated with Calcium Hydroxide: A Case Series. *J Endod* 2011;37:1327-30.
17. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod* 2008;34:611-616.
18. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, *et al.* Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod* 2010;36:1086-91.
19. Donaldson M, Kinirons MJ. Factors affecting the onset of resorption in avulsed and replanted inisor teeth in children. *Dent Traumatol* 2001; 17(5): 205-9.
20. Andreasen JO, Borum MK., Jacobsen HL. Andreasen FM Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11(2): 76-89.
21. Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, *et al.* Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:1536–41.

22. Soares AJ; Nagata JY, Casarin RCV, Almeida JFA, Gomes BPFA, Zaia AA, Ferraz CCR, Souza-Filho FJ. Apexification by using a new intra-canal medicament: a multidisciplinary case report. *Iranian Endodontic Journal* 2012;7(3):165-170.
23. Soares AJ, Lima TF, Lins FF, Herrera DR, Gomes BPFA, de Souza-Filho FJ. Un nuevo proto-colo de medicación intraconducto para dientes con necrosis pulpar y rizogénesis incompleta. *Rev Estomatol Herediana* 2011;21(3):145-49.
24. Hecova H, Tzigkounakis V, Merglova V, Netolicky J. A retrospective study of 889 injured permanent teeth. *Dent Traumatol* 2010;26(6):466-75.
25. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors: 1—diagnosis of healing complications. *Endod Dent Traumatol* 1995;11:51–8.
26. Petrovic B, Marković D, Peric T, Blagojevic D. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol*. 2010; 26(1): 52-9.
27. Villa P, Fernández R. Apexification of a replanted tooth using mineral trioxide aggregate. *Dent Traumatol* 2005;21(5):306-8.
28. Jacobovitz M, de Pontes Lima RK. The use of calcium hydroxide and mineral trioxide aggregate on apexification of a replanted tooth: a case report. *Dent Traumatol* 2009;25(3):e32-6.
29. Soares Ade J, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Souza-Filho FJ. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *J Endod* 2013;39(3):417-20.
30. Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, *et al*. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod* 2001;27:765–7.
31. Lana PE, Scelza MF, Silva LE, *et al*. Antimicrobial activity of calcium hydroxide pastes on *Enterococcus faecalis* cultivated in root canal systems. *Braz Dent J* 2009;20:32–6.
32. Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, *et al*. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. *J Endod* 2009;35:160–4.

33. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, *et al.* The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentine matrix components. *Biomaterials* 2006;27:2865–73.
34. Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J* 2012;45(3):294-305.
35. Thomson A, Kahler B. Regenerative endodontics--biologically-based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J* 2010;55(4):446-52.
36. 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.
37. Greenstein G, Berman C, Jaffin R. Chlorhexidine. An adjunct to periodontal therapy. *J Periodontol.* 1986;57:370-7.
38. Jeansonne MJ, White RR. A comparison of 2.0% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite as antimicrobial endodontic irrigants. *J Endod* 1994;20:276-8.
- 39.
40. Trope M. Clinical management of the avulsed tooth. *Dent Clin North Am* 1995;39(1):93-112.
41. Soares Ade J, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, de Souza-Filho FJ. Relationship between clinical-radiographic evaluation and outcome of teeth replantation. *Dent Traumatol.* 2008 Apr;24(2):183-8.
42. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, *et al.* International Association of Dental Traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2012;28(2):88-96.

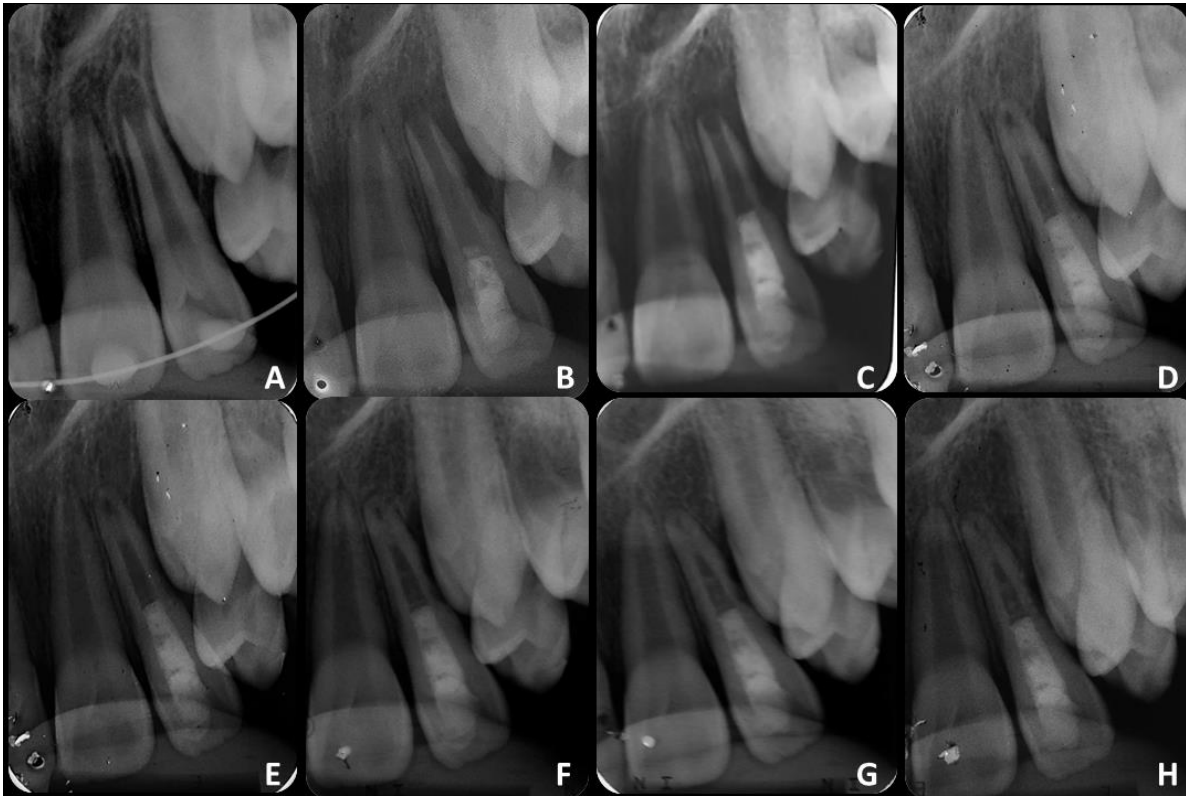


Figure 1. Case 1: (A) The initial radiograph showing the open apex of the replanted left lateral incisor. (B) Distal root resorption and intracanal dressing with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. (C) Pulp revascularization sealed with MTA, coltosol, and composite resin after 21 days. (D) The 3-month follow-up. (E) The 6-month follow-up. (F) The 9-month follow-up. (G) The 12-month follow-up. (H) The 16-month follow-up.

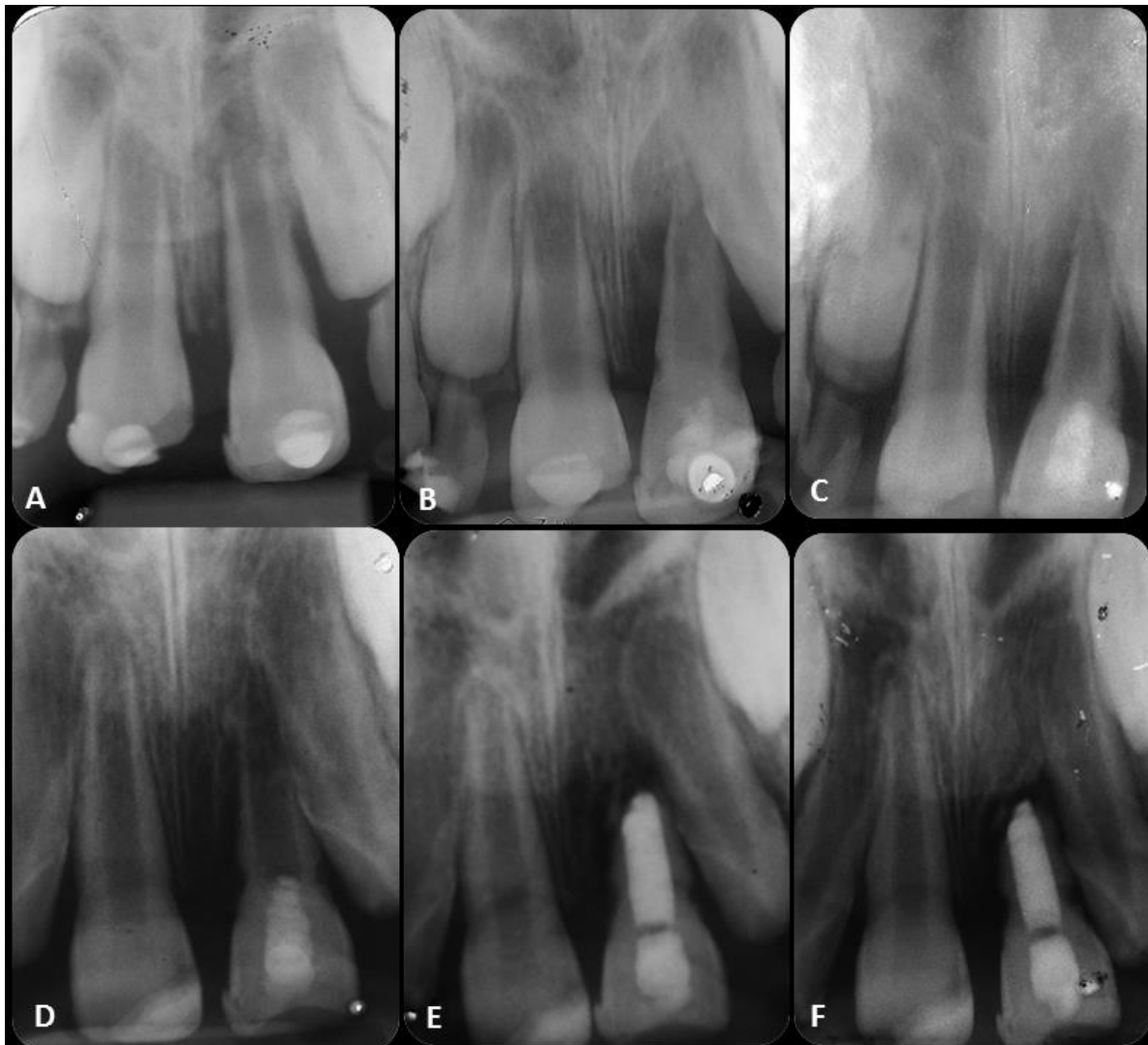


Figure 2. Case 2: (A) The initial radiograph showing the open apex of the replanted left central incisor. (B) Root resorption in the cervical and apical thirds. Intracanal dressing with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. (C) Pulp revascularization sealed with MTA, coltosol, and composite resin after 21 days. (D) The 3-month follow-up showing the progression of root resorption. (E) In the 6-month follow-up, tooth was treated with apexification. (F) The 12-month follow-up showing stabilization of root resorption.

CONSIDERAÇÕES GERAIS

Justificativa da pesquisa

Considerando a importância do traumatismo dentário como um problema de saúde pública mundial com grande probabilidade de acometer dentes com rizogênese incompleta, torna-se necessário estudar alternativas conservadoras para o seu tratamento, como a utilização de protocolos que visem a máxima conservação da estrutura dentária. Pensando nisso, a revascularização pulpar, quando corretamente indicada, pode ser uma alternativa que visa essa prevenção. Sabendo da grande prevalência de traumatismo dentário em jovens com rizogênese incompleta, e que estes podem resultar em necrose pulpar, este trabalho pesquisou tratamentos que prolonguem a sobrevivência desses dentes que passaram a se tornar frágeis e com prognóstico duvidoso.

Este tratamento oferece promissora possibilidade de substituir, quando adequadamente indicado, a apicificação com hidróxido de cálcio ou a confecção de barreira artificial de MTA que não aumentam a espessura das paredes radiculares, permitindo o estabelecimento de reforço a essas paredes. Permite também a restauração natural da função dentária sem a necessidade da reabilitação com implantes dentários.

Além disso, estudos mais aprofundados dos fatores microbianos associados à necrose de dentes traumatizados e com rizogênese incompleta conduzem a uma melhoria das técnicas de combate à infecção e, conseqüentemente, diminuem a ocorrência de reabsorções radiculares. Os resultados obtidos auxiliam na terapia endodôntica, ajudando a entender a ação da medicação e do sucesso, que acontecem após o emprego desta técnica. Com esta pesquisa puderam ser verificados e identificados alguns microrganismos presentes em canais radiculares de dentes traumatizados com rizogênese incompleta. Os achados microbiológicos podem agregar informações para a melhor compreensão da sintomatologia clínica e radiográfica observada.

Conceitos de Revascularização/Revitalização e Regeneração pulpar

A regeneração pulpar pode ser definida como a substituição do tecido danificado, por células idênticas às anteriormente perdidas, levando ao restabelecimento das funções biológicas desse tecido (Lin & Rosenberg, 2011). Já o reparo tecidual, ao contrário da regeneração pulpar, refere-se à substituição do tecido comprometido por um tecido diferente deste, como uma fibrose ou uma cicatriz. Portanto, a cicatrização de uma lesão não necessariamente leva à regeneração do tecido, uma vez que apenas um embrião nos primeiros meses de gestação (até a 24^a semana) é capaz de se regenerar completamente quando danificado e qualquer lesão tecidual em tecidos pós-natais sempre será acompanhada da formação de uma pequena cicatriz (Colwell *et al.*, 2003). Desta forma, a cicatrização de uma pulpite irreversível, necrose pulpar ou periodontite apical, após a realização de tratamento endodôntico, não implicam em completa regeneração do tecido lesionado (Lin & Rosenberg, 2011). Já a regeneração do tecido pulpar mediada pelo desenvolvimento celular *in vitro*, a partir de células-tronco, pode no futuro ser algo viável, pois o tecido se formaria a partir de células indiferenciadas com alto potencial de diferenciação e adequadamente direcionadas por fatores de crescimento (Shi & Gronthos, 2003).

Considerando a impossibilidade de regeneração completa na região periapical de dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar, a remoção do agente agressor (infecção) pode criar um ambiente favorável para a ocorrência de reparo com tecido cicatricial. Dentro desse contexto, a revascularização/revitalização pulpar pode ser inserida.

A revascularização é definida como a invaginação de células periodontais indiferenciadas da região apical de dentes de pacientes jovens com ápice aberto (Zhang & Yelick, 2010; Bansal & Bansal, 2011). Essa invaginação se direcionaria para o compartimento pulpar após sua descontaminação passiva que

remove parcial ou totalmente o seu conteúdo e, em alguns protocolos terapêuticos, preenchimento prévio por coágulo sanguíneo. Essas células periodontais seriam as responsáveis pelo término do desenvolvimento radicular e fechamento apical. Diante do exposto, o presente estudo sugere ter observado o reparo da porção apical de dentes com rizogênese incompleta e não sua regeneração, sendo então empregada a terminologia revascularização por considerá-la mais adequada para a forma de cicatrização observada. Além do termo revascularização, tem-se discutido também o emprego da terminologia revitalização, pois a mesma representaria melhor o processo de recomposição do canal radicular por tecido vivo (Lenzi & Trope, 2012). Entretanto, essa denominação poderia incorrer em conflito conceitual, uma vez que a polpa apresenta características histológicas típicas sendo que o tecido resultante da invaginação de células periodontais indiferenciadas no canal radicular pode apresentar características diferentes. Além disso, a revitalização poderia gerar o entendimento de que a polpa ainda estava presente, mas necrosada ou inviabilizada, ou, ainda, que estaria ocorrendo uma regeneração pulpar (preenchimento do compartimento pulpar com tecido idêntico à polpa dental). Além dessa denominação, recentemente, o processo de reparo tem sido discutido também como uma metaplasia tecidual, ou seja, quando um novo tecido substitui o lesionado por outro tipo tecidual, como, por exemplo, quando o tecido pulpar inviabilizado é substituído por osso, cemento ou ligamento periodontal (Andreasen, 2012).

Considerando a revascularização pulpar, Hargreaves e colaboradores (2008) relatam a importância da presença de três componentes principais para o sucesso desse procedimento. Estes incluem a presença de células indiferenciadas capazes de formar tecido mineralizado, moléculas sinalizadoras para a estimulação e proliferação celular, descontaminação do canal radicular e por último a presença de um *scaffold* tridimensional que possibilite o crescimento e diferenciação celulares.

Descontaminação passiva

O primeiro passo fundamental para o tratamento endodôntico de canais radiculares infectados é a desinfecção desse sistema por meio da utilização de substâncias químicas auxiliares e instrumentação mecânica (Bystrom & Sundqvist, 1981). Entretanto, em dentes imaturos a remoção de microrganismos por meios mecânicos é limitada devido à fina espessura das paredes dentinárias, fazendo com que a limpeza seja obtida por meio de irrigação e medicação intracanal (Zhang & Yelick, 2010).

Substâncias químicas auxiliares

As substâncias químicas auxiliares mais utilizadas atualmente são o hipoclorito de sódio (NaOCl) e a clorexidina (CHX), sendo a primeira a de maior aceitação mundial (Clarkson & Moule, 1998). De acordo com a literatura, o NaOCl apresenta propriedades antimicrobianas contra os principais patógenos endodônticos (Bystrom & Sundqvist, 1985), e no tratamento endodôntico convencional pode ser utilizado em concentrações que variam de 0,5 a 6%. Na terapia de revascularização pulpar, os relatos de caso têm demonstrado o emprego dessa substância em concentrações variadas, sendo mais comum a sua utilização em concentrações elevadas de 2,5% a 6% obtendo-se resultados clínicos satisfatórios (Nosrat *et al.*, 2011). Com relação à clorexidina, os relatos de revascularização tem utilizado esse irrigante nas concentrações de 2% (Reynolds *et al.*, 2009; Shin *et al.*, 2009) e 0,12% (Petrino *et al.*, 2010). Apesar das propriedades antimicrobianas satisfatórias, estas substâncias não são biocompatíveis, podendo inviabilizar as células-tronco presentes no tecido pulpar impedindo as mesmas de se aderirem à superfície dentinária intraradicular (Ring *et al.*, 2008). Além das substâncias químicas auxiliares, faz-se necessário também

o uso de agentes quelantes para a remoção da *smear layer* sendo os mais comuns o EDTA, o ácido cítrico e MTAD. Esta última é composta por solução de tiosulfato 3%, ácido cítrico 4,25% e o detergente Polisorbato 0,5%, sendo relativamente nova no mercado e introduzida por Torabinejad e colaboradores (2003). Acredita-se que o EDTA, por possuir ação quelante, seja capaz de liberar vários fatores de crescimento presentes na matriz dentinária humana (Graham *et al.*, 2006). Entretanto, não se sabe se a irrigação do canal radicular com EDTA pode interferir na proliferação das células indiferenciadas responsáveis pela revascularização (Hargreaves *et al.*, 2008).

Considerando a importância dessas substâncias químicas auxiliares e agentes quelantes sobre as células indiferenciadas, alguns estudos avaliaram a citotoxicidade e a interferência dessas substâncias na adesão de células pulparemesenquimais indiferenciadas (Ring *et al.*, 2008). Os agentes irrigantes e quelantes avaliados foram o NaOCl, CHX, Aquatine Endodontic Cleanser® (AquatineEC), Morinda Citrifolia® (MCJ), Solução salina fisiológica, EDTA, e o MTAD®. Os mesmos foram testados individualmente ou em associação a algum dos agentes quelantes. Este estudo demonstrou que tanto o NaOCl quanto a CHX apresentaram efeitos citotóxicos diminuindo a capacidade de adesão das células-tronco pulparemes às paredes dentinárias, e que a *smear layer* não influenciou na adesão destas células. Sugeriu ainda que ao final de todo o processo de irrigação com as substâncias químicas auxiliares fosse realizada uma irrigação com solução fisiológica para ajudar na adesão das células-tronco pulparemes às paredes dentinárias.

Pesquisou-se também uma substância irrigadora nova, o AquatineEC® que é utilizada para irrigar, limpar e desbridar o sistema de canais radiculares (Ring *et al.*, 2008). O seu componente ativo é o ácido hipocloroso (HOCl), que é biocompatível e possui ação antimicrobiana contra uma grande quantidade de microrganismos (Fukuzaki, 2006). Nesse estudo, esta substância apresentou menor citotoxicidade que o NaOCl e a CHX além de permitir que as células indiferenciadas pulparemes se aderissem à parede do canal radicular. Entretanto, por

se tratar de uma substância nova, mais estudos são necessários para estudá-la como uma alternativa para o tratamento endodôntico regenerativo.

Diante do exposto e da importância da eliminação bacteriana para o reparo apical de dentes com rizogênese incompleta, o presente trabalho preconizou a associação de duas substâncias químicas auxiliares (NaOCl 6% e clorexidina 2%). Isto se justificou devido à não realização de instrumentação mecânica no protocolo convencional de revascularização pulpar, o que poderia limitar a descontaminação apenas passiva. Além disso, a ação em profundidade da clorexidina nos túbulos dentinários, poderia potencializar a descontaminação em casos de infecções endodônticas de mais longa data. Ao final, empregou-se também irrigação com EDTA 17%, considerando as propriedades acima citadas que podem favorecer o desenvolvimento, adesão e diferenciação das células indiferenciadas invaginadas. De uma forma geral, o protocolo de descontaminação empregado produziu remissão clínica da sintomatologia presente e reparou radiograficamente as lesões periapicais, o que demonstra o controle da infecção proporcionado por esse protocolo de descontaminação. Entretanto, a não observação de resultados satisfatórios quanto ao desenvolvimento radicular pode ter sido causado pela ação citotóxica das soluções irrigadoras empregadas em contato com as células indiferenciadas responsáveis pelo reparo. Microbiologicamente, o emprego de apenas uma substância química auxiliar pareceu ser suficiente na eliminação de bactérias viáveis após contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC/mL). Sugere-se que em estudos futuros, a descontaminação passiva do sistema de canais radiculares possa ser realizada com uma das substâncias estudadas, e talvez sem necessariamente associá-las, o que garantiria uma redução microbiana satisfatória. Além disso, a irrigação final com EDTA necessita ser mais profundamente estudada e parece ser promissora com relação à redução microbiana uma vez que eliminou as contagens microbianas em ambos os grupos.

Medicações intracanal

O processo de revascularização pulpar é mais favorável em ambiente livre de bactérias (Turkistani & Hanno, 2011), assim é necessário que o sistema de canais radiculares seja devidamente limpo e desinfetado. A infecção presente nos sistemas de canais radiculares é polimicrobiana, sendo improvável que apenas um antibiótico seja eficaz contra esses microrganismos para tornar o ambiente estéril (Thibodeau *et al.*, 2007). Sendo assim, Hoshino e colaboradores (1996), avaliaram a ação de antibióticos sozinhos e associados sobre microrganismos presentes em dentina radicular, polpa dental e lesões periapicais. Observaram que a associação de três antibióticos (Metronidazol, Ciprofloxacina e Minociclina) eliminou bactérias presentes nas superfícies de dentina. Além disso, esta pasta foi capaz de destruir os microrganismos mesmo das camadas mais profundas de dentina (Sato *et al.*, 1996).

A partir daí os estudos e casos clínicos sobre revascularização passaram a empregar esta pasta antibiótica como padrão-ouro de medicação intracanal, visando conseguir o controle da infecção no interior do sistema de canais radiculares que permita a invaginação de um novo tecido e que este possa dar continuidade ao desenvolvimento radicular. Essa pasta antibiótica é manipulada utilizando-se Metronidazol 400mg, Ciprofloxacina 250mg e Minociclina 50mg pulverizadas e manipuladas com veículo propilenoglicol, em consistência cremosa. Sua inserção pode ser feita por meio de espiral lentulo, agulhas de pequeno calibre ou limas manuais. Apesar de se mostrar eficiente, esta pasta apresenta alguns efeitos colaterais como a possibilidade de escurecimento da coroa dental devido à presença da minociclina (Kim *et al.*, 2010), um derivado semi-sintético da tetraciclina que é eficaz contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Windley *et al.*, 2005). Na tentativa de diminuir esses efeitos, alguns artigos têm sugerido a diminuição do tempo de aplicação da pasta para prevenir a descoloração associada ao seu uso (Kim *et al.*, 2010), considerando que sua ação antimicrobiana pode se dar dentro de 24 a 48 horas (Hoshino *et al.*, 1996; Sato *et*

al., 1996). Entretanto, ainda não se sabe se a diminuição do período de sua aplicação é suficiente para prevenir a descoloração já que, sugere-se que logo nas primeiras 24 horas após a inserção, já se pode notar o escurecimento da coroa radicular (Kim *et al.*, 2010).

O desenvolvimento da resistência microbiana é outro fator relevante sobre a utilização da pasta antibiótica, porém não há estudos que comprovem que esta pasta cause resistência bacteriana. Sugere-se apenas que a utilização dessa pode também diminuir a probabilidade do desenvolvimento de cepas bacterianas resistentes (Mohammadi & Abbott, 2009).

Considerando as limitações da utilização desta pasta, os pesquisadores começaram a testar alternativas de medicações com propriedades antimicrobianas para conseguir obter a desinfecção do sistema de canais radiculares. O hidróxido de cálcio é utilizado tradicionalmente nos casos de apicificação (Cvek, 1972), além de ser bastante utilizado como medicação intracanal na rotina endodôntica devido à sua propriedade antimicrobiana, que impede a proliferação microbiana (Chueh & Huang, 2006). Com isso, recentemente tem sido pesquisado o seu uso nos casos de revascularização pulpar, sendo observado sucesso clínico e radiográfico (Bose *et al.*, 2009; Iwaya *et al.*, 2011). Esse resultado pode ser justificado já que pesquisas demonstram que o hidróxido de cálcio é capaz de solubilizar moléculas bioativas, inclusive fatores de crescimento da matriz de dentina humana, que por sua vez podem estimular células pulpares indiferenciadas a se diferenciar em células semelhantes aos odontoblastos e estes produzirem tecido mineralizado (Graham *et al.*, 2006), além disso a presença de hidróxido de cálcio pode não interferir na sobrevivência das células da bainha epitelial de Hertwig (Shimizu *et al.*, 2012). Por outro lado, outro estudo enfatizou que a utilização de hidróxido de cálcio prejudicaria qualquer remanescente viável do tecido pulpar e os restos epiteliais de Mallassez (Banchs & Trope, 2004). Avaliando essas duas medicações, Bose e colaboradores (2009), mostraram que tanto o hidróxido de cálcio quanto a pasta tripla antibiótica, quando utilizadas como medicação intracanal, foram eficazes em auxiliar o desenvolvimento do complexo dentino-

pulpar. Esses resultados foram observados quando a inserção do hidróxido de cálcio ficou limitada ao terço cervical do canal radicular.

Os casos de revascularização pulpar geralmente são realizados em duas sessões. Na primeira ocorre a limpeza do sistema de canais radiculares por meio de irrigação abundante com alguma substância química auxiliar, seguido da inserção de medicação intracanal que permanece por aproximadamente 3 semanas. Na segunda sessão, sangramento é induzido para o interior do canal radicular, o qual é selado com Agregado Trióxido Mineral (MTA) e compostos resinosos.

Apesar da maioria dos estudos demonstrarem a terapia em duas sessões, Shin e colaboradores (2009) realizaram o tratamento de revascularização pulpar em sessão única, por meio de descontaminação do canal com hipoclorito de sódio 6%, solução fisiológica e clorexidina 2% sem instrumentação, seguida de selamento com MTA e resina composta sem a colocação da pasta. Os autores relataram sucesso no caso com término do desenvolvimento radicular e o espessamento das paredes dentinárias.

Apesar dos numerosos estudos, a literatura ainda apresenta-se escassa em relação a protocolos de controle de infecção capazes de prevenir a resistência de cepas bacterianas, também de um material biológico capaz de induzir a angiogênese, e que permita a formação de uma matriz mais previsível e por fim, que consiga promover a regeneração tecidual (Reynolds *et al.*, 2009). Dessa forma, o presente estudo objetivou comparar os resultados clínicos e microbiológicos do emprego da pasta tripla antibiótica e da pasta que associa hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%. A redução de sintomatologia clínica e das contagens microbianas sugerem não haver diferença quanto à escolha da medicação intracanal. Entretanto, o escurecimento coronário promovido pela pasta tripla antibiótica, desencoraja sua utilização dessa forma, e estimula a busca por alternativas como a substituição da minociclina, a retirada da mesma na composição da pasta ou o emprego de adesivos dentinários para diminuir o contato com a superfície dentinária.

Scaffold – Coágulo sanguíneo

Outro componente essencial para a revascularização pulpar se refere aos *scaffolds*. Para atuar como um *scaffold*, o material deve possibilitar a aderência, proliferação e diferenciação das células que irão se desenvolver. Considerando a revascularização pulpar, o *scaffold* ideal deveria também possibilitar uma vascularização e inervação adequadas ao tecido pulpar (Zhang & Yelick, 2010). Neste contexto, a maioria dos protocolos propostos na literatura para a revascularização pulpar envolve a manipulação dos tecidos periapicais, com o objetivo de induzir a formação de um coágulo sanguíneo no espaço do canal radicular (Cotti *et al.*, 2008; Cehreli *et al.*, 2011; Soares *et al.*, 2013). Esse coágulo estimulado da porção periapical de dentes necrosados com rizogênese incompleta tem a função de atuar como um *scaffold* natural para a aderência, proliferação e diferenciação celular. Além disso, contribuiria para a invaginação de células indiferenciadas da papila apical ou do ligamento periodontal que atuarão na deposição de tecido mineralizado nas paredes internas radiculares. A relevância da presença de coágulo sanguíneo para o sucesso da revascularização tem sido sugerido por estudos que relataram a expressão de marcadores específicos de células indiferenciadas em coletas de sangue do canal radicular durante procedimento de revascularização (Lovelace *et al.*, 2011). Portanto, acredita-se que o sangramento invaginando o espaço do canal radicular após o estímulo dos tecidos periapicais pode transportar células indiferenciadas para o espaço do canal radicular. Por outro lado, relatos de casos clínicos de pacientes tratados com revascularização pulpar observaram término da formação radicular sem indução de formação de coágulo sanguíneo no interior do canal radicular (Chueh *et al.*, 2006). Mais estudos conclusivos são necessários para se conhecer a importância da presença de um *scaffold* para o desenvolvimento de células indiferenciadas no espaço do canal radicular. Considerando as prováveis

vantagens da presença de um *scaffold*, o presente trabalho também estimulou os tecidos periapicais de todos os dentes tratados, obtendo com isso a formação de coágulo sanguíneo.

Em algumas situações, pode não ser possível a invaginação de sangue via forame apical. Estudos tem relatado o emprego de Plasma Rico em Plaquetas (PRP) como um *scaffold* potencialmente ideal para o tratamento de revascularização pulpar (Torabinejad & Turman, 2011). Relata-se que o PRP apresenta fatores de crescimento, produz agentes anti-inflamatórios, inicia a vascularização, induz diferenciação celular, controla a resposta inflamatória local, e melhora o reparo por tecido mole e duro (Whitmann *et al.*, 1997). Entretanto, apresenta as desvantagens da necessidade de coleta de sangue de pacientes jovens, aquisição de equipamentos especiais, aumento do custo do tratamento (Torabinejad & Turman, 2011).

Selamento

O último passo da terapia de revascularização envolve o selamento cervical do canal radicular. Esse selamento deverá ser feito por meio do emprego de uma substância biocompatível capaz de selar adequadamente o terço cervical do canal radicular, mesmo sob presença de umidade. O material mais utilizado tem sido o Agregado Trióxido Mineral (MTA) devido à sua boa capacidade seladora, impedindo a recontaminação do canal radicular. A maioria dos relatos de caso da literatura demonstraram sucesso da terapia de revascularização selada com MTA (Shah *et al.*, 2008; Ding *et al.*, 2009). Este deve ser inserido 1 a 2 mm abaixo da junção cimento-esmalte. Sua extensão no interior do canal radicular dependerá do grau de desenvolvimento radicular, uma vez que quanto mais desenvolvida uma raiz, mais apicalmente deverá ser posicionado o MTA, e da altura de formação do coágulo sanguíneo (Petrino *et al.*, 2010). Além disso, a inserção de MTA sobre um coágulo sanguíneo pode ser tecnicamente difícil,

fazendo com que alguns autores sugiram a colocação de uma barreira reabsorvível para atuar como anteparo à colocação do MTA (Petrino *et al.*, 2010). Essa barreira pode ser representada pelo CollaPlug ou CollaCote. No presente estudo, a barreira de MTA empregada foi anteparada pela matriz colágena CollaCote, o que facilitou a inserção e limitou a condensação do MTA apenas no terço cervical dos canais radiculares. A presença dessa matriz tornou-se principalmente importante nos casos com maior amplitude do diâmetro do canal, uma vez que se observou tecnicamente maior dificuldade na limitação da altura do MTA.

Recentemente, uma alternativa ao uso do MTA tem sido pesquisada, ou seja, uma Mistura Enriquecida de Cálcio (CEM) (Nosrat *et al.*, 2010). Trata-se de uma substância com características de selamento e biocompatibilidade muito semelhantes ao MTA, sendo capaz de promover a formação de hidroxiapatita, induzir a diferenciação de células-tronco e induzir a formação de tecido mineralizado (Asgary *et al.*, 2009).

CONCLUSÃO

1. Os achados clínicos e radiográficos deste estudo demonstraram que a resposta da revascularização pulpar pode ser influenciada pela severidade do trauma dental e que os dentes jovens tratados com os protocolos propostos podem demonstrar um desenvolvimento radicular mais avançado nos controles subsequentes **(Capítulo 1)**.

2. Os protocolos de revascularização pulpar utilizando pasta tripla antibiótica e hidróxido de cálcio associado a clorexidina gel 2% produziram redução microbiana com resultados similares. Além disso, as soluções irrigadoras empregadas na primeira sessão foram eficientes na redução das bactérias viáveis na revascularização pulpar **(Capítulo 2)**.

3. A revascularização pulpar deve ser cuidadosamente indicada em casos de avulsão dentária e pode ser uma alternativa de tratamento em condições de reimplante mais favoráveis. Nessas condições, a terapia de revascularização pode ser realizada com medicação intracanal à base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% **(Capítulo 3)**.

REFERÊNCIAS

1. Andersson L. Epidemiology of traumatic dental injuries. *Pediatr Dent*. 2013;35(2):102-5.
2. Andreasen FM. Transient root resorption after dental trauma: the clinician's dilemma. *J Esthet Rest Dent*. 2003; 15(2): 80-92.
3. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol*. 2002;18:134–7.
4. Andreasen JO. Pulp and periodontal tissue repair - regeneration or tissue metaplasia after dental trauma. A review. *Dent Traumatol*. 2012;28(1):19-24.
5. Ansary MADA, Day PF, Duggal MS, Brunton PA. Interventions for treating traumatized necrotic immature permanent anterior teeth: inducing a calcific barrier & root strengthening. *Dent Traumatol*. 2009; 25: 367-379.
6. Asgary S, Eghbal M, Parirokh M, Ghoddusi J, Kheirieh S, Brink F. Comparison of mineral trioxide aggregate's composition with Portland cements and a new endodontic cement. *J Endod*. 2009;35:243–50.
7. Bystrom A, Sundqvist G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Res*. 1981;89:321–8.
8. Bystrom A, Sundqvist G. The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J*. 1985;18(1):35-40.
9. Chueh LH, Huang GTJ. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod*. 2006;32:1205–13.
10. Clarkson RM, Moule AJ. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent J*. 1998;43:250–6.
11. Colwell AS, Longaker MT, Lorenz HP. Fetal wound healing. *Frontiers Bioscience* 2003;8:S1240–8.
12. Cortes MIS, Marcenes W, Sheiham A. Impact of traumatic injuries to the permanent teeth on the oral health-related quality of life in 12–14-year-old children. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2002; 30: 193–8.

13. Cvek M. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide I. Follow-up of periapical repair and apical closure of immature roots. *Odontol Revy.* 1972;23:27–44.
14. 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.
15. Desai S, Chandler N. The restoration of permanent immature anterior teeth, root filled using MTA: a review. *J Dent.* 2009;37(9):652-7.
16. Fukuzaki S. Mechanisms of actions of sodium hypochlorite in cleaning and disinfection processes. *Biocontrol Sci.* 2006;11:147–57.
17. Glendor U. Epidemiology of traumatic dental injuries – a 12 year review of the literature. *Dent Traumatol.* 2008; 24:603-611.
18. 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.
19. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, *et al.* Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002; 81: 531–5.
20. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 2000; 97:13625–30.
21. Hale MS. Autogenous Transplants. *J Am Dent Assoc.* 1954;49:193.
22. Hargreaves K, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod.* 2008;34:S51–6.
23. Lieberman J, Trowbridge H. Apical closure of non-vital permanent incisor teeth where no treatment was performed: case report. *J Endod.* 1983; 9: 257–60.
24. Lin LM, Rosenberg PA. Repair and regeneration in endodontics. *Int Endod J.* 2011; 44: 8891-906.
25. 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;37:133–8.

26. Martin RL, Monticelli F, Brackett WW, Loushine RJ, Rockman RA, Ferrari M, *et al.* Sealing Properties of Mineral Trioxide Aggregate orthograde apical plugs and root fillings in an in vitro apexification model. *J Endod.* 2007;33(3): 272-5.
27. Mohammadi Z, Abbott PV. On the local applications of antibiotics and antibiotic-based agents in endodontics and dental traumatology. *Int Endod J.* 2009;42(7):555-67.
28. Ostby BN. The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. *Acta Odontol Scand.* 1961;19:324-53.
29. Ring KC, Murray PE, Namerow KN, Kuttler S, Garcia-Godoy F. The comparison of the effect of endodontic irrigation on cell adherence to root canal dentin. *J Endod.* 2008;34:1474–9.
30. Rocha MJC, Cardoso M. Traumatized permanent teeth in Brazilian children assisted at the Federal University of Santa Catarina, Brazil. *Dent Traumatol.* 2001; 17: 245-9.
31. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J.* 1996; 29: 118–24.
32. Shi S, Gronthos S. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res.* 2003;18:696–704.
33. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *J Endod.* 2012; 38(9): 1293-7.
34. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2007;33:680–9.
35. Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent.* 2009;31(2):145-8.
36. Torabinejad M, Khademi AA, Babagoli J, Cho Y, Johnson WB, Bozhilov K, *et al.* A new solution for the removal of the smear layer. *J Endod.* 2003;29(3):170-5.

37. Trope M, Ray HL Jr. Resistance to fracture of endodontically treated roots. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1992;73:99–102.
38. Turkistani J, Hanno A. Recent trends in the management of dento alveolar traumatic injuries to primary and young permanent teeth. *Dent Traumatol.* 2011;27(1):46–54.
39. Whittle M. Apexification of an infected untreated immature tooth. *J Endod.* 2000;26: 245–7.
40. Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod.* 2005;31:439–43.
41. Yanpiset K, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after different treatment methods. *Endod Dent Traumatol.* 2000;16(5):211-7.

APÊNDICE 1 - MATERIAL E MÉTODOS E ILUSTRAÇÕES DOS EXPERIMENTOS

Os procedimentos envolvidos nesta tese estão de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, conforme certificado (Anexo 1).

Revascularização pulpar e procedimentos de coleta

Foram realizadas cinco coletas microbiológicas do canal radicular, durante as sessões de revascularização pulpar. Essas coletas foram divididas em duas sessões odontológicas. A primeira coleta (C1) foi realizada após acesso coronário ao dente, antes que qualquer limpeza fosse realizada, a segunda (C2), durante a descontaminação passiva logo após a irrigação com hipoclorito de sódio, tiosulfato de sódio e solução fisiológica, a terceira (C3), durante a descontaminação passiva logo após a irrigação com clorexidina e Tween 80 ambas na primeira sessão, a quarta (C4) após a retirada da pasta ou medicação com solução fisiológica, e a quinta (C5), após a remoção da pasta ou medicação com EDTA e solução fisiológica, ambas na segunda sessão. Os pacientes foram divididos em dois grupos com sete pacientes em cada, de acordo com a pasta ou medicação que foi utilizada:

Tabela 1. Divisão dos grupos experimentais.

GRUPO I	<ul style="list-style-type: none">- Descontaminação passiva do canal radicular (20 mL de hipoclorito de sódio a 6%, 10 mL de tiosulfato de sódio 5%, 10 mL de solução fisiológica e 10 mL de clorexidina 2%), sem instrumentação.- Medicação com pasta tripla antibiótica (minociclina, metronidazol e ciprofloxacina) por 21 dias
----------------	---

GRUPO II	<p>- Descontaminação passiva do canal radicular (20 mL de hipoclorito de sódio a 6%, 10 mL de tiosulfato de sódio 5%, 10 mL de solução fisiológica e 10 mL de clorexidina 2%), sem instrumentação.</p> <p>- Medicação com pasta à base de hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% (Endogel, Itapetininga, SP) por 21 dias.</p>
-----------------	---

O método utilizado neste estudo foi descrito por Gomes *et al.* (1996) e alguns princípios foram pré-estabelecidos para coletas microbiológicas, os quais serão adaptados para este estudo, como descrito a seguir:

- a) Bochecho com clorexidina 0,12 % (Periogard, Colgate®, Brasil).
- b) Anestesia local.
- c) Polimento coronário com pedra pomes.
- d) Isolamento absoluto com auxílio do Cianoacrilato (Super Bonder®, Loctite, SP) para evitar uma possível infiltração salivar.
- e) Desinfecção do campo operatório: descontaminação do grampo, lençol de borracha, arco e da face externa da coroa com swabs estéreis umedecidos, primeiramente, em água oxigenada 30v, NaOCl 2,5% por 30 segundos cada e subsequente neutralização com solução estéril de tiosulfato de sódio 5% para evitar que a descontaminação química da face externa da coroa interfira no material a ser coletado (Möller, 1966).
- f) Abertura coronária – forma de contorno e conveniência.
- g) Coleta 1 (C1) – logo após o acesso coronário, antes de qualquer intervenção ou desinfecção do canal, cones de papel absorvente estéreis apirogênicos (Maillefer/Dentsply®, Balaigues, Suíça) no comprimento aparente do dente estabelecido pela radiografia inicial foram utilizados na coleta. Os cones de papel foram mantidos em posição por 60 segundos, e depois armazenados em eppendorfs contendo 1,0 mL de meio de transporte VMGA III – Viability Medium Göteborg Agar (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993).

h) Os eppendorfs contendo as amostras microbiológicas (VMGA III) foram imediatamente transportados para o laboratório de Microbiologia da Área de Endodontia.

Protocolo de descontaminação do canal radicular nos grupos I e II e coletas microbiológicas

Após abertura coronária e a primeira coleta (C1), os dentes tiveram seus canais irrigados com 20 mL de hipoclorito de sódio a 6% e 10 mL de clorexidina 2%, sem instrumentação. Para se evitar a interação dessas substâncias, foi realizada irrigação com 10 mL de soro fisiológico e 10 mL de tiosulfato de sódio 5% quando se efetuar a troca do agente irrigante. Durante a descontaminação, a segunda coleta (C2) foi realizada após irrigação com hipoclorito de sódio, tiosulfato de sódio e solução fisiológica, e a terceira coleta (C3) logo após a irrigação com clorexidina e solução fisiológica, ambas da mesma forma como a primeira (Figura 1).

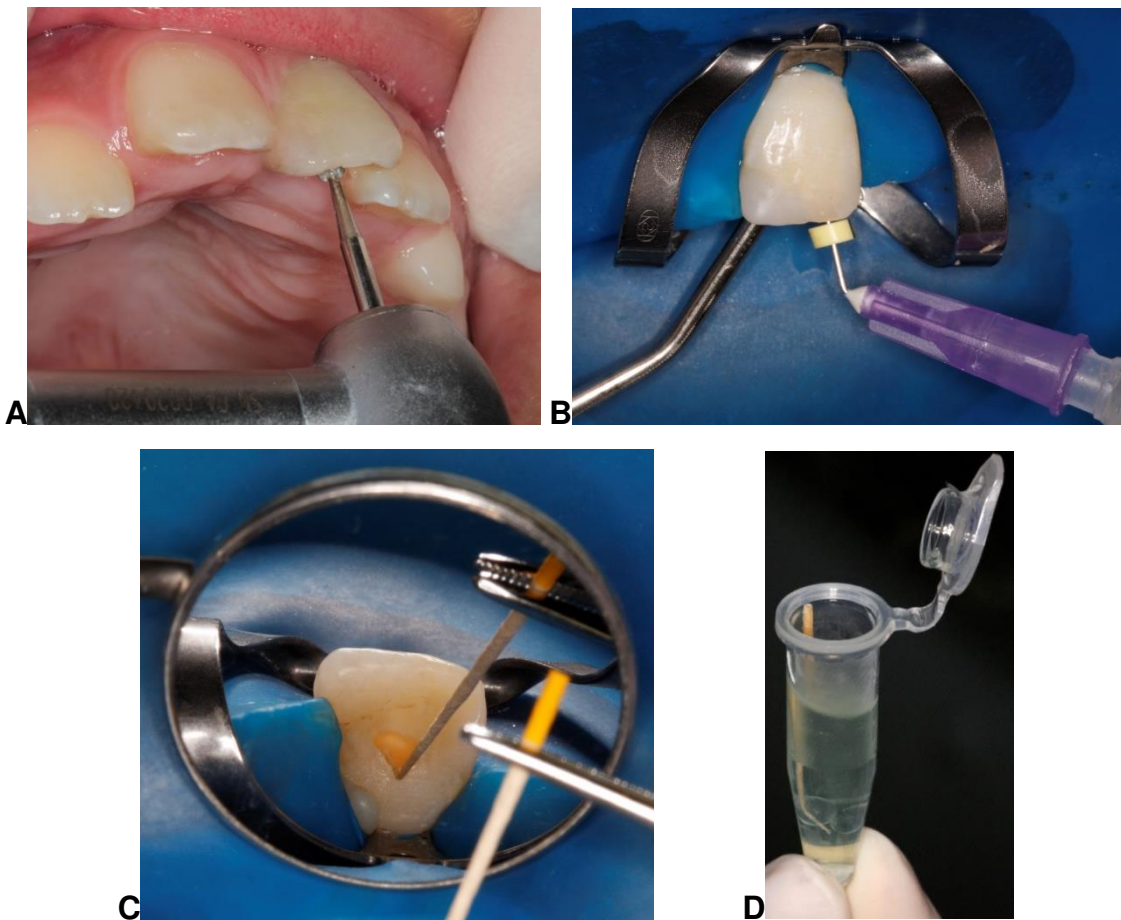


Figura 1. (A) Abertura coronária. (B) Descontaminação passiva. (C) Coleta microbiológica com cones de papel absorvente. (D) Cone de papel absorvente em VMGAIII.

Método de manipulação e inserção da pasta tripla antibiótica no grupo I

Os canais foram secos com cones de papel absorvente, e preenchidos com a pasta tripla antibiótica. Esta pasta foi descrita por Hoshino *et al.*, (1996), e apresenta em sua composição 200 mg de Ciprofloxacina, 500 mg de Metronidazol e 100 mg de Minocilina. A pasta foi preparada na consistência cremosa em veículo propilenoglicol e foi inserida por meio de espiral lentulo nos terços cervical e médio do canal (Figura 2).

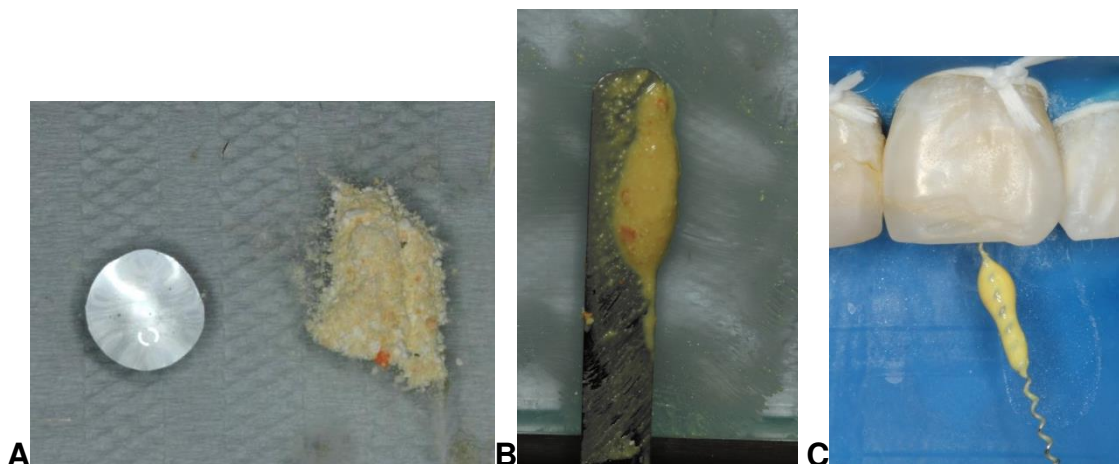


Figura 2. (A) Antibióticos pulverizados e propilenoglicol. (B) Manipulação da pasta tripla antibiótica. (C) Inserção da pasta tripla antibiótica com espiral lentulo.

Método de manipulação e inserção da medicação nos grupos II

Os canais foram secos com cones de papel absorvente, e preenchidos com a medicação intracanal. Esta medicação é composta por hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2% (Endogel, Itapetininga, SP), e foi manipulada em porções de 3 medidas de hidróxido de cálcio para 0,2 mL de clorexidina gel 2%, que se refere à empregada na Clínica de Especialização da FOP/UNICAMP e em algumas instituições do país. Esta foi inserida por meio de espiral lentulo nos terços cervical e médio do canal (Figura 3).

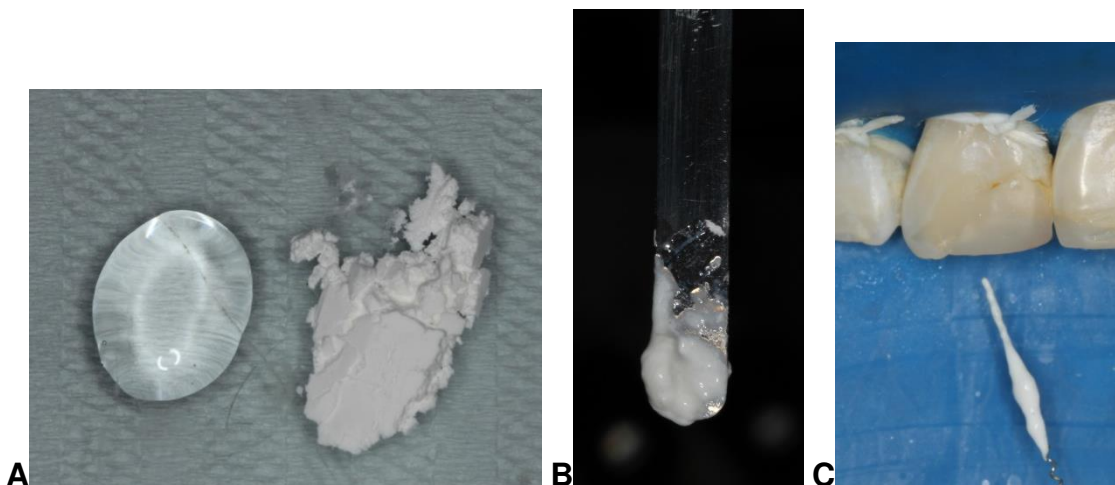


Figura 3. (A) Hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%. (B) Manipulação da pasta de hidróxido de cálcio. (C) Inserção da pasta de hidróxido de cálcio com espiral lentulo.

Selamento coronário

Todos os grupos permaneceram com a pasta ou medicação intracanal por 21 dias. Sobre a medicação, uma camada de aproximadamente 2 mm de Coltosol® foi colocada como selamento cervical, e o dente restaurado com aplicação de ácido fosfórico 37% por 15 segundos, adesivo Single Bond 3M (3M Dental Products, St Paul, USA) e aproximadamente 3 mm de resina fotopolimerizável Z 250 (3M Dental Products, St Paul, USA).

Coleta microbiológica e 2ª sessão de Revascularização Pulpar

Windley *et al.* (2005) observaram *in vitro* a efetividade antimicrobiana da pasta tripla antibiótica por um período de 21 dias. Sendo assim, após este período, na segunda sessão, os dentes foram abertos assepticamente, usando brocas e soro apirogênicos, como já descrito anteriormente, e irrigados com 10 mL de solução fisiológica com o intuito de remover a pasta ou medicação e abrir espaço

para a quarta coleta (C4) microbiana. Após essa coleta, o canal foi irrigado com EDTA e solução fisiológica e nova coleta (C5) foi realizada. Da mesma forma, 3 cones de papel foram colocados individualmente no interior do canal radicular, pelo tempo de 60 segundos, e depositados em tubos tipo “ependorf” contendo VMGAIII. As amostras foram processadas da mesma maneira já descrita anteriormente e os microrganismos foram isolados, identificados, as unidades formadoras de colônias contadas e as amostras contendo os cones de papel e o meio de transporte VMGAIII estocados no freezer -70°C para análise posterior por PCR.

Após a quinta coleta (C5), o protocolo de revascularização pulpar dos dentes utilizados neste estudo foi realizado para os dois grupos (I e II). Para isso, o sangramento no interior do canal foi estimulado por meio de um lima tipo K #30 (Dentsply Maillefer®, Ballaigues, Suíça) para formação de coágulo. Após isso, MTA (Ângelus®, Londrina, PR) foi inserido no terço cervical do canal por meio de condensadores verticais “medium” e “fine-medium”. Feito isso, os dentes foram selados e restaurados como descrito anteriormente (Figura 4).

Nesta segunda sessão, as características clínicas e radiográficas também foram coletadas e anotadas na ficha clínica.

Todos os procedimentos realizados durante as coletas 1, 2, 3, 4 e 5 foram empregados durante o protocolo de revascularização pulpar, não necessitando de visitas excedentes, nem qualquer dano ao paciente.

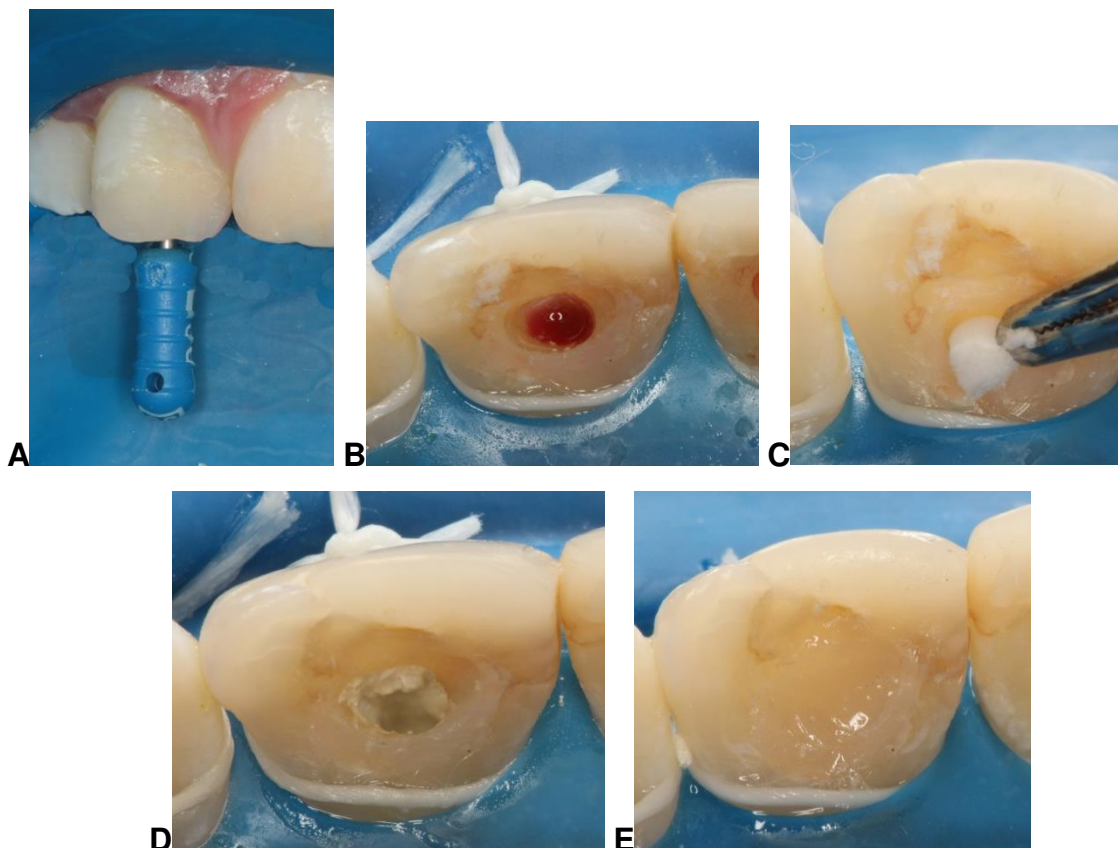


Figura 4. (A) Estímulo ao sangramento com lima manual. (B) Formação de coágulo. (C) Inserção de matriz colágena (CollaCote). (D) Inserção de MTA. (E) Selamento com resina composta.

Processamento das amostras

O processamento das amostras foi realizado no laboratório de Microbiologia da disciplina de Endodontia da FOP-UNICAMP. Os meios de cultura foram utilizados na forma de pó desidratado, e suplementos seletivos pré-fabricados foram preparados de acordo com as orientações do fabricante. O meio de transporte (VMGA III) foi preparado de acordo com a fórmula original (Möller, 1966; Dahlén *et al.*, 1993). As coletas realizadas foram processadas pelo método de cultura e PCR, descritos a seguir.

Contagem microbiológica

Os eppendorfs contendo as amostras do canal radicular foram agitados por 60 segundos dentro da câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, UK), a 37°C numa atmosfera de 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂. Diluições seriadas (10⁻¹; 10⁻²; 10⁻³; 10⁻⁴) do conteúdo dos eppendorfs coletados foram realizados em “Fastidious Anaerobic Broth” (FAB - Lab M, Bury, UK). Alíquotas de 50 µL das diluições 10⁻² e 10⁻⁴ foram inoculadas em placas de petri e incubadas em diferentes condições gasosas, como descritos a seguir:

- Placas contendo BHI Agar* (Brain Heart Infusion Agar) + 5% de sangue de carneiro, incubadas em estufa de O₂ (aerobicamente), a 37°C, por 2 dias, para detecção de anaeróbios facultativos.

- Placas pré-reduzidas de FAA* - “Fastidious Anaerobe Agar” (Lab M, Bury, UK) contendo 5% de sangue de carneiro + 600 µL de Menadione (Vitamin K3; 2-Methyl-1,4-naphthoquinone - SIGMA M5625) + 600 µL de Hemina (Hemin Bovine Minimum 80% – SIGMA H5533) que favorecem o crescimento das bactérias produtoras de pigmento negro, a 37°C numa atmosfera anaeróbica com 10% H₂, 10% CO₂ e 80% N₂ até 14 dias, para permitir a detecção de microrganismos de crescimento mais lento.

Cultivo, isolamento, incubação e identificação dos microrganismos

Após a incubação, foi feita contagem e análise da morfologia das colônias nas placas iniciais (Placa mãe) em estereomicroscópio (Lambda Let 2. Atto Instruments Co., Hong Kong), aumento de 3 vezes. Cada colônia diferente foi subcultivada para a obtenção de culturas puras. Todos os tubos de eppendorf contendo VMGAIII e os cones de papel absorvente, imediatamente após a retirada das alíquotas para diluição, foram estocados em freezer – 70 °C para análise de PCR.

Análise por PCR

O PCR (Técnica da reação em cadeia da Polimerase) foi utilizado para a análise da presença de *Actinomyces naeslundii*, *Enterococcus faecalis*, *Treponema denticola*, *Tanerella forsythia*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Filifactor alocis*, *Parvimonas micra* nas coletas dos canais radiculares nas mesmas etapas de tratamento.

Extração do DNA bacteriano

A extração de DNA foi realizada com o QIA amp DNA kit (QIAGEN, Chatsworth, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante.

Reação de PCR

A reação de PCR foi processada na quantidade de 25 µL de uma mistura de reagentes (Master Mix) contendo as quantidades especificadas no quadro 1 para 1,5 µL do DNA da amostra.

Quadro 1. Proporções dos reagentes no Master Mix

Reagentes	Quantidade (µL)
Tampão (10 x Reaction <i>buffer</i> Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	2,5 µL
DNTPs (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil):	0,5 µL
MgCl ₂ (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	1,25 µL
H ₂ O MiliQ	17,625 µL
Primer Forward 100µM (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,75 µL
Primer Reverse 100µM (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,75 µL

<i>Taq Platinum</i> (Invitrogen [®] - Life Technology do Brasil)	0,125 µL
---	----------

A Taq DNA Polimerase escolhida foi a Platinum®Taq DNA Polymerase (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) que não se degrada com o aumento gradativo da temperatura, podendo ser acrescentada diretamente na mistura (Mix) da reação evitando a necessidade de hot start.

Para determinar a temperatura de anelamento ideal, reações de PCR contendo primers espécie-específicos (Quadro 2) foram realizadas em um aparelho termociclador convencional e submetidas a vários gradientes de temperatura (MJ96G, Biocycler, termocicladores, Curitiba, SC, Brasil) utilizando amostras ATCCs correspondentes e baseadas na literatura de suporte.

Tabela 1. Primers da Reação em Cadeia da Polymerase (PCR) e os parâmetros dos ciclos utilizados para detecção de espécies bacterianas em dentes necrosados com rizogênese incompleta.

Espécies bacterianas	Pares de Primers (5'-3')	Tamanho	Ciclos
Universal (16S rDNA)	Forward: TCC TAC GGG AGG CAG CAG T Reverse: GGA CTA CCA GGG TAT CTA ATC CTG T	466 bp	Initial denaturation at 95 °C for 10 min and 40 cycles of 95 °C for 10 s, 60 °C for 10 s, and a final extension step at 72 °C for 25 s
Prevotella intermedia	Forward: TTT GTT GGG GAG TAA AGC GGG Reverse: TCA ACA TCT CTG TAT CCT GCG T	575 bp	Initial denaturation at 95 °C for 2 min and 36 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final step at 72 °C for 10 min
Tannerella forsythia	Forward: GCG TAT GTA ACC TGC CCG CA Reverse: TGC TTC AGT GTC AGT TAT ACC T	641 bp	Initial denaturation at 95 °C for 1 min and 36 cycles of 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final step at 72 °C for 2 min
Treponema denticola	Forward: TAA TAC CGA ATG TGC TCA TTT ACA T Reverse: TCAAAGAAGCAT TCC CTC TTC TTC TTA	316 bp	Initial denaturation at 95 °C for 2 min and 36 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final step at 72 °C for 10 min
Fusobacterium nucleatum	Forward: AGT AGC ACA AGG GAG ATG TAT G Reverse: CAA GAA CTA CAA TAG AAC CTG A	1000 bp	Initial denaturation at 95 °C for 5 min and 30 cycles of 94 °C for 30 s, 40 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final step at 72 °C for 10 min
Actinomyces naeslundii	Forward: GCGC CTT TTT TGG TGT TTT TGG Reverse: CAC CCA CAA ACG AGG CAG GCC TG	274 bp	Initial denaturation at 94 °C for 1 min and 35 cycles of 94 °C for 1 min, 60 °C for 1 min, 72 °C for 90 s, and a final step at 72 °C for 10 min

Filifactor alocis	Forward: CAG GTG GTT TAA CAA GTT AGT GG Reverse: CTA AGT TGT CCT TAG CTG TCT CG	594 bp	Initial denaturation at 95 °C for 2 min and 26 cycles of 95 °C for 30 s, 58 °C for 1 min, 72 °C for 1 min, and a final step at 72 °C for 2 min
Porphyromonas gingivalis	Forward: AGG CAG CTT GCC ATA CTG CG Reverse: ACT GTT AGC AAC TAC CGA TGT	404 bp	Initial denaturation at 95 °C for 2 min and 36 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final step at 72 °C for 2 min
Porphyromonas endodontalis	Forward: GCT GCA GCT CAA CTG TAG TC Reverse: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	672 bp	Initial denaturation at 95 °C for 2 min and 36 cycles of 94 °C for 30 s, 58 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final step at 72 °C for 10 min
Parvimonas micra	Forward: AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG Reverse: ATA TCA TGC GAT TCT GTG GTC TC	207 bp	Initial denaturation at 95 °C for 2 min and 36 cycles of 94 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, 72 °C for 2 min, and a final step at 72 °C for 10 min
Enterococcus faecalis	Forward: CCG AGT GCT TGC ACT CAA TTG G Reverse: CCG CTT CAT GTC ACC ATG TC	138 bp	Initial denaturation at 95 °C for 15min and 35 cycles of 94 °C for 1 min, 68 °C for 1 min, 72 °C for 15 s, and a final step at 72 °C for 7 min

Além das amostras, foram utilizados como controles positivos o DNA genômico purificado dos microrganismos investigados e como controle negativo água MiliQ esterilizada.

Eletroforese

As amostras após a reação de PCR (produtos da amplificação) foram analisadas imediatamente por eletroforese. Utilizou-se gel de agarose a 1% (Invitrogen® - Life Technology do Brasil) em tampão de Tris-borato EDTA (pH 8,0) e corado com brometo de etídio (5ug/mL-Invitrogen® - Life Technology do Brasil).

Em cada gel foi incluído um padrão de peso molecular de 100 bp (DNA ladder, Invitrogen® - Life Technology do Brasil). Após o término de cada corrida (60 volts por 1 hora), as bandas foram observadas com auxílio de um transiluminador de luz ultravioleta. A documentação fotográfica dos géis foi obtida com o sistema Image Master-VDS (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) e a captura das imagens foi realizada pelo programa LISCAP Image Capture software.

APÊNDICE 2 – MEIO DE TRANSPORTE

VMGA III (VIABILITY MEDIUM GÖTEMBORG AGAR)

Descrição

O meio de transporte VMGAIII (Viability Medium Göteborg Agar) foi descrito inicialmente por Moller (1966) e por Dahlén *et al.* (1993) e é preparado para suportar a sobrevivência de organismos anaeróbios estritos e aeróbios sem ocorrer crescimento. É aplicado para amostras pequenas, como as coletadas por pontas de papel absorvente. Se armazenado em recipiente bem fechado e sem contato com oxigênio, pode ser guardado por longo tempo. Deve ser protegido da luz. O indicador de oxi-redução é o azul de metileno e sua função é consumir o oxigênio, mantendo o meio reduzido. A solução protetora é a peptona 0,1% e a gelatina 5%. Sua consistência é semi-sólida em temperatura ambiente e semi-fluido acima de 30°C.

Preparo do meio

Componentes necessários

- a) Acetato de fenilmercúrio;
- b) Glicerofosfato de sódio;
- c) CaCl anidro ou CaCl₂.6H₂O
- d) KCl
- e) MgSO₄.7H₂O
- f) NaOH
- g) Agar bacteriológico
- h) Gelatina (DIFCO, Detroit, EUA)
- i) Triptose (DIFCO, Detroit, EUA)

- j) Thiotona e Peptona (BBL, Cockeyville, EUA) 78
- k) L-cisteína-dihidroclorito (Sigma, St. Louis, EUA)
- l) Ácido tioglicólico (Sigma, St. Louis, EUA)

Autoclavar previamente:

- a) Frascos de Eppendorf ou vidros pequenos com 3 bolinhas de vidro (Glass beads). A quantidade de Eppendorfs é determinada de acordo com o volume que será preparado do meio. Neste caso, para o preparo 250 mL de VMGA III, autoclavar cerca de 130 frascos.
- b) Proveta de 50mL
- c) 2 frascos vazios de 500mL
- d) 2 frascos vazios de 1000mL
- e) 4 funis
- f) 4 tubos de ensaio
- g) 4 espátulas
- h) 1 frasco de Becker pequeno
- i) 2 provetas de 200mL
- j) 30 pedaços de papel alumínio
- k) 1 vidro de 500mL

Preparo dos volumes líquidos

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	275 mL	137,5 mL	68,75 mL
1 frasco	150 mL*	75 mL*	37,5 mL
1 frasco	600 mL	300 mL	150 mL
1 frasco	5 mL	2,5 mL	1,25 mL

Para os volumes de VMGA III, autoclavar os respectivos volumes de solução salina.

	500 mL	250 mL	125 mL
1 frasco	50 mL	25 mL	12,5 mL

Solução de Sais de Estoque IV

Verificar se tem a solução de sais de estoque IV (cor azul) e autoclavar, caso não tenha, autoclavar:

1 frasco	60 mL de água bidestilada (1)
1 frasco	40 mL de água bidestilada (2)
1 frasco	60 mL de água bidestilada (3)
1 frasco	40 mL de água bidestilada (4)

Verificar se tem a solução de NaOH e KOH (8M), caso não tenha, preparar. Volume final de 200 mL. Modo de preparo: Pesar 64g de NaOH e 89,76g de KOH. Dissolver em 140 mL de água bidestilada. Depois de dissolvido, acrescentar água bidestilada q.s.p 200 mL. Autoclavar por 20 minutos.

No dia anterior, preparar as soluções:

a) SOLUÇÃO 1 – Água bidestilada estéril 60mL + Acetato de fenilmercúrio 0,1g (não pesar com espátula de metal). Dissolver em banho-maria e deixar overnight a 56°C.

b) SOLUÇÃO 2 – Água bidestilada estéril 40mL + Glicerofosfato de sódio 20g.

Dissolver aquecendo levemente na manta e deixar overnight.

No dia do preparo do VMGA III, para preparar a solução azul:

c) SOLUÇÃO 3 – Água bidestilada estéril 60mL + CaCl anidro 0,24g ou CaCl₂.6H₂O 0,32g + KCl 0,84g + MgSO₄.7H₂O 0,2g.

Misturar bem as SOLUÇÕES 1, 2 e 3 e resfriar em uma proveta graduada.

Adicionar 40mL de água bidestilada já estéril para completar 200 mL. Ao final, adicionar 0,006g de azul de metileno e acondicionar na geladeira.

Mistura das soluções e preparo do VMGA II

a) Solução A:

SOLUÇÃO A	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	550 mL	137,5 mL	68,75 mL
Triptose	0,5 g	0,125 g	0,0625 g
Thitona e Peptona	0,5 g	0,125 g	0,0625 g

b) Solução B:

SOLUÇÃO B	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	300 mL	75 mL	37,5 mL
Gelatina	50 g	12,5 g	6,25 g

A água bidestilada deve estar pré-aquecida. O frasco com água destilada e o peixinho já devem estar estéreis no dia anterior. Aquecer no micro-ondas por 10 segundos + 10 segundos + 10 segundos (total de 30 segundos), observando atentamente se derrete a gelatina. Deixar em banho-maria caso não derreta tudo. Essa solução não pode mais ser autoclavada.

c) Solução C:

SOLUÇÃO C	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	50 mL	12,5 mL	6,25 mL
Ágar	2 g	0,5 g	0,25 g

Autoclavar a 121oC por 20 minutos, manter em banho-maria.

d) Solução D:

SOLUÇÃO D	1000 mL	250 mL	125 mL
Água bidestilada	10 mL	2,5 mL	1,25 mL
L-cisteína	0,05 g	0,125 g	0,0625 g

Autoclavar a 121oC por 20 minutos, manter em banho-maria.

e) Solução E:

SOLUÇÃO E	1000 mL	250 mL	125 mL
Solução salina	100 mL	25 mL	12,5 mL
Ácido Tioglicólico	0,5 mL	0,125 mL	0,0625 mL

A solução salina deve estar estéril no dia anterior. O ácido tioglicólico encontra-se no freezer e deve ser manipulado com cuidado, paramentando-se com luvas e máscara.

Misturar as SOLUÇÕES A + B + C em frasco de 500 mL na manta. Resfriar a 45-50°C. Adicionar 25 mL da solução de sais de estoque azul IV. Adicionar a solução de ácido tioglicólico (SOLUÇÃO E). Ferver a solução por 5 minutos até que a cor azul desapareça (fica amarelo). Resfriar em água morna sob fluxo de N₂. Levar para a câmara de anaerobiose. Adicionar a solução de cisteína (SOLUÇÃO D).

Ajustar o pH 7,2 a 7,4 com a solução de NaOH + KOH, adicionando de 10 em 10 microlitros. Adicionar aos poucos, pois não tem volta. A solução de NaOH + KOH vai diminuir o pH.

Colocar 1 mL da solução em cada eppendorf e deixar levemente aberto na cabine de anaerobiose. Passar parafilme para evitar qualquer tipo de contato com oxigênio e contaminação. Proteger da luz com papel alumínio.

APENDICE 3 – MEIOS DE CULTURA

1. Fastidious Anaerobe Agar (FAA) – LAB M, Bury, UK.

Descrição

Meio capaz de favorecer o crescimento dos anaeróbios isolados clinicamente. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Amido e bicarbonato atuam como agentes detoxificantes, enquanto a hemina favorece a produção de pigmento nos “Bacteroides” produtores de pigmento negro.

Agentes específicos de estimulação de crescimento:

a) Cisteína – para *Fusobacterium* spp, *Propionibacterium acnes* e *Bacteroides fragilis*;

b) Arginina – para *Eubacterium* spp.; pirofosfato solúvel para *Porphyromonas asaccharolytica*.

c) Piruvato – contribui para a neutralização do peróxido de hidrogênio e pode ser também utilizado pela *Veillonella* spp. como fonte de energia.

d) Vitamina K e succinato de sódio fornecem fatores essenciais de crescimento para alguns anaeróbios, como também 0,1% de glicose. O nível baixo de glicose impede a produção de níveis elevados de ácidos e alcoóis que podem inibir o crescimento bacteriano. O pH médio do meio de cultura é 7,4 ±0,2.

Preparo

Adicionar 23,0 g do pó em 500 mL de água deionizada. A suspensão deve ser mantida em repouso por 10 min. e depois agitada. É esterilizada em autoclave a 121°C por 15 min e resfriada a 47°C. Então adicionar asepticamente 5% de sangue desfibrinado de carneiro, misturar bem e distribuir nas Placas de Petri.

Armazenagem do meio preparado

O meio preparado deve ser armazenado em placas de Petri por até 7 dias, em temperatura média de 4°C, fora do alcance da luz.

Incubação

- a) Temperatura: 37°C;
- b) Condições Gasosas: anaerobiose (80% H₂, 10% N₂, 10% CO₂);
- c) Período de tempo: 48 horas e 7 dias.

Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Mistura de peptonas	23,0
Cloreto de sódio	5,0
Amido solúvel	1,0
Ágar no2	12,0
Glicose	0,4
Piruvato de sódio	1,0
L-cisteína monoidratada	1,0
Hemina	0,5
Vitamina K	0,001
L-arginina	1,0
Pirofosfato solúvel	0,25
Succinato de sódio	0,5

Enriquecimento do meio

Solução Vitamina K1 (1 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

Pesar 0,1g de Vitamina K1 e adicionar a um tubo contendo 100 mL de etanol absoluto. Armazenar o vidro em refrigerador, devidamente vedado e protegido da luz. Adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

Solução de Hemina (5 mg/mL) - Sigma-Aldrich, USA.

Dissolver 0,5g de Hemina em 10 mL de Hidróxido de sódio 1N. Completar com água destilada até atingir 100 mL. Autoclavar a 121°C por 15 min. Para usar como suplemento, adicionar 1µL da solução a cada mL de meio produzido.

Fastidious Anaerobe Broth (FAB) – LAB M (Bury, UK)

Descrição

Meio de cultura líquido capaz de favorecer o crescimento de bactérias anaeróbias e facultativas. As peptonas são incorporadas para a máxima estimulação de crescimento. Vitamina K, hemina e L-cisteína são também fatores de crescimento para alguns anaeróbios. L-cisteína e tioglicolato de sódio reduzem o potencial de óxido redução do meio e o agar inibe a absorção do oxigênio. O pH do meio é 7,4±0,2.

Preparo

Dispensar 14,85g do pó em 500 mL de água deionizada. A mistura é dispensada em tubos que são deixados semi-abertos durante a esterilização, que é feita em autoclave a 121°C por 15 min. Os tubos são fechados o mais rápido possível após a esterilização.

Armazenagem

Armazenar em tubos com tampas, por até 3 meses, a 15-20°C, fora do alcance da luz.

Incubação

Incubar a 37 °C por 24-72 horas, mantendo os tubos bem fechados.

Fórmula

Componentes	Concentração (g/L)
Mistura de peptonas	15
Cloreto de sódio	2,5
Extrato de levedura	1,0
Ágar no1	0,75
L-cisteína	0,5
Hemina	0,005
Vitamina K	0,005
Resazurina	0,001
Bicarbonato de sódio	0,4

APENDICE 4 – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa intitulada:

“Avaliação e identificação de microrganismos em dentes traumatizados com rizogênese incompleta submetidos a diferentes protocolos terapêuticos de revascularização pulpar”

1) Apresentação da pesquisa

a) Instituição: Faculdade de Odontologia de Piracicaba / UNICAMP.

b) Responsável pela pesquisa: Doutoranda Juliana Yuri Nagata (área Endodontia)

c) Orientadora: Prof^a Dr^a Adriana de Jesus Soares

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes

d) Pesquisadores: Prof^o Dr^o Franciso José de Souza Filho e Mestrando Thiago Farias Rocha Lima

e) Justificativas para realização da pesquisa:

- o traumatismo dentário pode acontecer em jovens com dentes que não terminaram a formação da raiz, e em alguns casos o tratamento de canal é necessário. Nestes casos, alternativas de tratamento para estes casos tornam-se importantes;
- estes dentes, por não terem terminado de se formar possuem raízes mais frágeis, e o tratamento que será pesquisado tentará estimular o término da formação da raiz para torná-la mais resistente e duradoura;
- os tratamentos existentes não possuem a característica de fortalecimento da raiz;
- o estudo das bactérias presentes dentro do canal pode ajudar a entender as lesões que acontecem como seqüelas dos traumatismos;
- o entendimento das espécies de bactérias presentes dentro do canal pode ajudar a entender também os sintomas apresentados por esses dentes.

2) Esclarecimentos (informação)

a) Objetivo da pesquisa:

- investigar uma terapia conservadora para dentes traumatizados que não terminaram o desenvolvimento da raiz por meio da utilização de medicamentos para a desinfecção do canal;
- avaliar se a medicação que será testada pode eliminar as bactérias presentes dentro do canal do dente;
- identificar quais bactérias estão presentes dentro do canal e relacionar esses achados com os sintomas e imagem radiográfica.

b) Metodologias que serão realizadas nos pacientes:

- Os voluntários serão divididos em 2 grupos:

GRUPO I	- Limpeza do canal com soluções irrigadoras - Colocação de curativo dentro do canal. Este curativo é composto por 3 antibióticos, o qual permanecerá por 15 dias.
GRUPO II	- Limpeza do canal com soluções irrigadoras - Colocação de curativo dentro do canal. Este curativo é composto por hidróxido de cálcio e clorexidina gel 2%, o qual permanecerá por 15 dias.

- Preenchimento da ficha odontológica para investigar presença de dor e história do traumatismo;
- Testes para verificar o estado geral do dente, sua vitalidade e tomada radiográfica com proteção;
- Tratamento de canal sob anestesia local: abertura do dente com broca e coleta de bactérias presentes dentro do canal com a utilização de tiras absorventes estéreis;
- Desinfecção e limpeza do canal com irrigantes, e instrumentos rotineiramente utilizados nos tratamentos de canal. Pode haver pequenos desconfortos nesta etapa, como em qualquer tratamento de canal;
- Segunda coleta de bactérias do canal com tiras absorventes estéreis;
- Colocação de curativo dentro do canal, tomada radiográfica com proteção e restauração provisória do dente como é rotineiramente realizado nos casos de traumatismo dentário;
- Depois de 15 dias, retorno do paciente à clínica da faculdade para remoção do curativo, realização da terceira coleta de bactérias com tiras absorventes estéreis e limpeza do canal;

- Sob anestesia local, estímulo ao sangramento na parte mais profunda do canal para permitir que haja a formação de novo tecido dentro do canal. Pode haver pequenos desconfortos. Esta etapa é a única que não faz parte do tratamento de canal convencional;

- Selamento do canal com massa obturadora denominada Mineral Trióxido Agregado (MTA) e restauração provisória;

- Acompanhamentos dentro de 1, 3, 6, 9 e 12 meses. Nestes, o estado geral do dente e tomadas radiográficas com proteção para avaliar o término do desenvolvimento da raiz. Estes procedimentos fazem parte dos preconizados para dentes traumatizados;

c) Os pacientes do grupo I receberão como curativo uma pasta de antibióticos que vem sendo pesquisada para estes casos de traumatismo e que poderá fortalecer e estimular o término da formação da raiz. Já os pacientes do grupo II receberão um curativo que é rotineiramente utilizado nestes casos de trauma dentário e que estimula a formação de uma barreira no final da raiz. Todos os pacientes terão o sangramento estimulado.

d) Métodos alternativos existentes:

- Curativo contendo hidróxido de cálcio que apenas estimula o fechamento da raiz, sem estimular o espessamento das paredes dessa raiz, não contribuindo para o seu fortalecimento;

- Colocação de uma barreira no final do canal da raiz com a massa obturadora de MTA permitindo que o tratamento seja finalizado em uma sessão. Este também apresenta a desvantagem de não estimular o espessamento das paredes da raiz;

e) Desconfortos e riscos:

- Pode haver desconfortos durante o tratamento do canal e que poderiam acontecer durante os tratamentos rotineiros;

- Pode haver desconfortos decorrentes da anestesia como adormecimento no local;

- Pode haver desconfortos como dor durante o estímulo ao sangramento;

- Há o risco de insucesso do tratamento que será testado, ou seja, o não fortalecimento da raiz, ou permanência de dor. Nestes casos, o tratamento convencional com curativo de hidróxido de cálcio e obturação do canal será realizado;

- Os indivíduos não terão gastos adicionais com a participação da pesquisa, nem terão que se deslocar demasiadamente à faculdade, pois o número de consultas é o mesmo que o do tratamento endodôntico convencional e por isso não haverá necessidade de ressarcimento.

f) Benefícios e vantagens:

- Realização de um tratamento conservador que pode possibilitar o fortalecimento da raiz do dente, ao contrário do tratamento convencional;
- O tratamento que será testado tentar estimular a presença de um tecido vivo dentro da raiz, que dessa forma fica mais resistente que uma raiz preenchida com material obturador;
- Dente com tecido vivo dentro e com as raízes mais espessas poderá se tornar mais resistente para receber a restauração definitiva;
- Um dente com raiz mais fortalecida tem menor chance de fraturar e pode ter uma duração mais longa na boca, principalmente nos casos de crianças que ainda não podem colocar implantes e a ausência de um dente anterior pode trazer problemas estéticos.

g) Acompanhamento e assistência:

- será realizado pela doutoranda Juliana Yuri Nagata e pelo mestrando Thiago Farias Rocha Lima após 15 dias do tratamento e em intervalos de 1, 3, 6, 9 e 12 meses, com avaliação de sintomas e tomada radiográfica;

h) Contato:

- Caso necessite, entrar em contato com Juliana Yuri Nagata ou Prof^a Dr^a Adriana de Jesus Soares, Av. Limeira 901, FOP- UNICAMP, Piracicaba – SP. Fone: 19 –2106-5215, e-mails: ajsoares.endo@uol.com.br ou jynagata@gmail.com.

3) Garantias:

- a)** Você será esclarecido antes, durante e após a realização da pesquisa
- b)** Sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo ao seu/sua filho (a);
- c)** As informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa, e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.
- d)** O voluntário não terá qualquer despesa por participar na pesquisa, não sendo necessários ressarcimentos;
- e)** Se houver algum dano eventual decorrente da participação na pesquisa, este será reparado;
- f)** Garantimos a entrega de uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) ao voluntário.

4) Consentimento:

Eu,.....(nome por extenso do sujeito de pesquisa) declaro que fui devidamente esclarecido e concordo em participar VOLUNTARIAMENTE da pesquisa coordenada por Juliana Yuri Nagata e orientada por Profª Drª Adriana de Jesus Soares

.

_____ Data:.....
Assinatura ou impressão datiloscópica

Eu,.....(nome do pesquisador ou do membro da equipe que aplicou o TCLE), declaro que forneci todas as informações referentes ao projeto de pesquisa supra-nominado.

_____ Data:.....
Assinatura do pesquisador




Qualquer dúvida com relação à pesquisa poderá ser esclarecida com o pesquisador, conforme o endereço abaixo:

Nome: Juliana Yuri Nagata

Endereço: Avenida Limeira, 901, Piracicaba, SP, Telefone: 19-2106-5215, e-mail: jynagata@gmail.com

Qualquer dúvida com relação aos aspectos éticos da pesquisa poderá ser esclarecida com o Comitê de Ética em Pesquisa da FOP: Av Limeira 901, FOP-Unicamp, CEP 13414-903, Piracicaba – SP. Fone/Fax 19-2106-5349, e-mail cep@fop.unicamp.br e webpage www.fop.unicamp.br/cep”

ANEXO – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

	
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS	
CERTIFICADO	
<p>O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação e identificação de microorganismos em dentes traumatizados com rizogênese incompleta submetidos a diferentes protocolos terapêuticos de revascularização pulpar", protocolo nº 067/2011, dos pesquisadores Juliana Yuri Nagata, Adriana de Jesus Soares, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Francisco José de Souza Filho e Thiago Farias Rocha Lima, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 03/08/2011.</p>	
<p>The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project "Evaluation and identification of microorganisms in traumatized teeth with immature apex submitted to two therapeutic protocols of pulpal revascularization", register number 067/2011, of Juliana Yuri Nagata, Adriana de Jesus Soares, Brenda Paula Figueiredo de Almeida Gomes, Francisco José de Souza Filho and Thiago Farias Rocha Lima, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 08/03/2011.</p>	
 Prof. Dra. Livia Maria Andalo Tenuta Secretária CEP/FOP/UNICAMP	Prof. Dr. Coordenador CEP/FOP/UNICAMP
<p><small>Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição. Note: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.</small></p>	