



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA

ADRIANA KELLY DE SOUSA SANTIAGO BARBOSA

AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E MICROBIOLÓGICA DO TRATA-  
MENTO COM PASTAS ANTIBIÓTICAS DE DENTES PERMANENTES COM  
RIZOGÊNESE INCOMPLETA NECROSADOS POR TRAUMA

FORTALEZA

2016

ADRIANA KELLY DE SOUSA SANTIAGO BARBOSA

AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E MICROBIOLÓGICA DO TRATAMENTO COM PASTAS ANTIBIÓTICAS DE DENTES PERMANENTES COM RIZOGÊNESE INCOMPLETA NECROSADOS POR TRAUMA

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Área de concentração: Clínica Odontológica.

Orientador: Dr. José Jeová Siebra Moreira Neto

Co-orientadores: Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa

Dra. Juliana Oliveira Gondim

FORTALEZA

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- B195a Barbosa, Adriana Kelly de Sousa Santiago.  
AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E MICROBIOLÓGICA DO TRATAMENTO COM PASTAS ANTIBIÓTICAS DE DENTES PERMANENTES COM RIZOGÊNESE INCOMPLETA NECROSADOS POR TRAUMA / Adriana Kelly de Sousa Santiago Barbosa. – 2016.  
108 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Prof. Dr. José Jeová Siebra Moreira Neto.  
Coorientação: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa; Juliana Oliveira Gondim.
1. Apexificação. 2. Antibacterianos. 3. Endodontia. 4. Enterococcus faecalis. 5. Traumatismos dentários. I. Título.

---

CDD 617.6

ADRIANA KELLY DE SOUSA SANTIAGO BARBOSA

AVALIAÇÃO CLÍNICA, LABORATORIAL E MICROBIOLÓGICA DO TRATAMENTO COM PASTAS ANTIBIÓTICAS DE DENTES PERMANENTES COM RIZOGÊNESE INCOMPLETA NECROSADOS POR TRAUMA

Tese de Doutorado submetida à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. José Jeová Siebra Moreira Neto (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Profª. Dra. Mônica Sampaio do Vale  
Universidade Federal do Ceará – UFC

---

Prof. Dr. Cláudio Maniglia Ferreira  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

---

Profª. Dra. Paula Borges Jacques  
Universidade de Fortaleza – UNIFOR

---

Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa  
Universidade Federal do Ceará – UFC - *Campus* Sobral

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho, principalmente, a DEUS, pelo milagre da vida, por ser Aquele que me dá forças, me guia, me consola e me ilumina sempre. Agradeço a Ti pelo que sou, pelas coisas maravilhosas que tens me proporcionado e pelas pessoas que colocaste em meu caminho. Sem Ti, nada disso seria possível!

Muito obrigada por tudo!

À minha mãe, EDITE, minha base maior, por todo amor, carinho, dedicação, companheirismo, palavras de sabedoria, amizade, ensinamentos e, principalmente, por ser meu exemplo de humildade, simplicidade, determinação e força. Obrigada por sempre respeitar e apoiar os meus sonhos e ideais.

Sem você, eu não conseguiria. Amo muito você!

Muito, muito, obrigada!

Ao meu marido, DANIEL, meu grande amor, meu companheiro, por todo amor, carinho, companheirismo, paciência, amizade, ensinamentos e, principalmente, por ser exemplo de caráter, humildade, determinação e garra. Obrigada por me amar e sempre respeitar e apoiar os meus sonhos que são também nossos sonhos. Obrigada por ser meu porto seguro.

Sem você, eu não conseguiria. Amo muito você!

Muito, muito, obrigada!

Ao meu filho, JOÃO, ainda pequenino, me ensina a cada dia ser mais paciente e a me doar mais e mais. À você filho, devo o meu melhor título, o de MÃE. Obrigada por em tão pouco tempo me transformar numa pessoa melhor. Obrigada por me dar forças em cada sorriso, em cada chorinho, em cada toque. Obrigada por dividir o seu tempo comigo para que a mamãe pudesse finalizar este trabalho. Obrigada por, mesmo ainda no ventre, ter me acompanhado, nas madrugadas e finais de semana no laboratório. Graças a você, hoje sei que o nosso propósito nesta vida é bem maior do que o que podemos imaginar. Obrigada por ser minha fonte de força e inspiração.

Te amo Incondicionalmente!

Aos meus irmãos ANTÔNIO JOSÉ, ROSEMBERG E RIVA, por serem exemplos de homens bons e também serem constante motivo de alegria e tranquilidade para mim. Admiro a generosidade,

bom humor e determinação de vocês. Manos, somos muito um do outro e preciso sempre de vocês na minha vida. Obrigada por vibrarem com as minhas vitórias como se fossem suas.

Amo vocês!

Ao meu pai, JOSÉ, e meu irmão JOÃO, que trilharam no caminho de Deus e que hoje estão ao lado Dele, olhando por mim e por nossa família. Obrigada por todos os ensinamentos e todos os momentos felizes vividos. Obrigada por terem sido homens bons e de coragem, por terem me dado força pra sempre trilhar o caminho do bem e para buscar forças de onde não existiam para vencer todas as dificuldades.

Muito Obrigada!

Às minhas cunhadas LUCENIR, ALDENIR, VALDENIA e ELIANIA, que são como irmãs. Aos meus sobrinhos, KELLYANE, THAYLANIA, ADRIEL, ALBERTO, SARA E JOÃO VITOR, que são como filhos. Obrigada por fazerem a minha vida mais feliz.

Aos meus sogro e sogra RAIMUNDO E DENISE, aos avós concedidos por Deus e pelo amor, JOÃO E MARIA, OZIRES E RIBAMAR, por serem exemplos de bondade, humildade, força e determinação. Obrigada por todos os ensinamentos, conselhos e momentos de alegria compartilhados. Amo vocês!

Muito, Muito Obrigada!

Por serem o que eu tenho de mais valioso na vida, dedico a vocês este trabalho.

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador, Prof. DR. JOSÉ JEOVÁ SIEBRA MOREIRA NETO, pela confiança em mim depositada, pela orientação, pelos conselhos, pelos ensinamentos transmitidos, pela atenção, pela simplicidade, pela paciência, por não se decepcionar e por despertar em mim o gosto pela ciência. Nossa convivência foi essencial para a minha formação profissional e mais ainda para minha formação pessoal. Admiro-lhe imensamente como pai, homem de bem e como orientador e professor. Sinto-me muito orgulhosa por compartilhar de seus conhecimentos.

Minha gratidão e admiração.

Ao meu co-orientador e também amigo, Prof. Dr. FRANCISCO FÁBIO OLIVEIRA DE SOUSA, pelo companheirismo, paciência, disponibilidade, dedicação e, sobretudo, pelo auxílio imensurável na execução deste trabalho. Sinta esta conquista como sua também!

À minha co-orientadora Profa. Dra. JULIANA DE OLIVEIRA GONDIM por todos os ensinamentos, pelo incentivo, por acreditar que vai dar certo, não me deixando desistir. Você foi essencial para que tudo ocorresse da melhor forma. Muito obrigada por tudo!

À profa. Dra. NÁDIA ACIOLLY PINTO NOGUEIRA e todos do laboratório de Farmácia e Microbiologia da Universidade Federal do Ceará, pela atenção, disponibilidade, ensinamentos e por concederem material e espaço para execução da minha pesquisa.

Aos professores, Dr. VICENTE DE PAULO ARAGÃO SABOIA e Dr. FÁBIO WILDSON GURGEL COSTA, Dra. LIDIANY KARLA DE AZEVEDO RODRIGUES e DR. SÉRGIO LIMA SANTIAGO, pela convivência e por estarem presentes ao longo dessa minha jornada, como peças-chave na construção da minha personalidade profissional. Vocês são um exemplo de competência e dedicação para mim.

Ao prof. Dr. ALAN MARCOS NEVES DA SILVA, prof. Dr. HAROLDO CÉSAR PINHEIRO BELTRÃO e Prof. Dr. PEDRO CÉSAR FERNANDES DOS SANTOS por estarem sempre presentes ao longo da minha jornada acadêmica, pelo incentivo e pelo exemplo de profissionalismo.

A Prof. Dra. ANDRÉA SILVIA WALTER DE AGUIAR, pelo apoio, amor, por ser minha mãe de profissão e por ser meu exemplo de perseverança. Obrigada pelos conselhos, pelos puxões de orelha, por me ouvir e por me guiar em muitos projetos de vida e acadêmicos. Você tornou meus sonhos menos impossíveis. Você me fez acreditar mais em mim mesma. Te amo! Muito Obrigada!

Ao colega e também amigo PAULO GOBERLÂNIO ( Paulinho), pelo auxílio indispensável na execução deste trabalho. Obrigada pela disponibilidade e por ser uma pessoa tão humilde e solícita. Obrigada por fazer as melhores análises estatísticas e por estar sempre à disposição.

Aos colegas e também amigos JANDENILSON BRÍGIDO, VIRGÍNIA RÉGIA e WALTER SÁ, pelo auxílio indispensável na execução deste trabalho, me auxiliaram no laboratório e na clínica, me ensinaram a aplicar as diferentes técnicas com precisão e cuidado. Obrigada pela disponibilidade e por serem pessoas tão solícitas. Obrigada por me ensinarem com tanto amor. Sem vocês minha pesquisa não teria sido tão rica.

A todos os meus amigos e colegas de trabalho da Odontologia UFC/Sobral. Vocês que são minha família e me incentivaram. Obrigada por todo apoio, HELLÍADA, IGOR, VIRGÍNIA, ANDRÉA, IRACEMA, HILMO, CELIANE, MÁRIO, RODRIGO, FILIPE, BRUNO SOUSA, BRUNO VASCONCELOS, MARIANA, ALRIETA, KARINE, KARUZA, MARCELO e todos os demais que me apoiaram.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade que me deram de crescer profissionalmente e, principalmente, pelos ensinamentos valiosos durante o curso de mestrado.

A todos os meus alunos que me incentivaram e torceram por mim. Aos meus orientados e todos que fazem parte do Projeto NEPTRAUMA. Obrigada por acreditarem no meu potencial. Essa vitória é por vocês e para vocês.

A todos os professores da Universidade Federal do Ceará, que me transmitiram a base da arte chamada ODONTOLOGIA. Os ensinamentos de todos vocês foram fundamentais para minha formação.

Ao aluno de Iniciação Científica, THIAGO NEPOMUCENO, pelo empenho e ajuda indispensável na realização deste trabalho. Obrigada também pela amizade.

Aos colegas do curso de doutorado, ARTUR, CLARISSA, CAMILA, LUCIANO e PHELYPE, pela troca de conhecimentos e experiências, pelos momentos de alegria e descontração. Torço muito pelo sucesso de todos vocês!

Aos colegas do laboratório, mestrandos e doutorandos e pós-doutorandos, JAMILLE, VANESSA, JESSICA, LIDIANE, SONIA, VITOR, RAMILLE, JOEL, DIEGO, FELIPE,, NARA e muitos outros e em especial ao Técnico DAVID. Nos que trocamos experiências, angústias, noites e finais de semana. Que acreditamos e torcemos uns pelos outros. Obrigada pela companhia e momentos de descontração. E obrigada DAVID por acalmar e ajudar cada um de nós.

A todos os integrantes do grupo CENTRAU, em especial WALDEREZ, EMANUELLE, MIRELLA, DARWIN, REBECCA e DENISE. além de todos os acadêmicos que tive o prazer de dividir diversos momentos de aprendizado juntos ao longo destes meus 10 anos de CENTRAU. Vocês são minha segunda família.

À minha família, meus avós, tios, tias, primos e primas, por sempre torcerem por mim de forma tão verdadeira. Vocês são muito importantes para mim!

À minha família de coração, meus amigos PALOMA, SAMARA, VIRNA, VÍVIAN, CARINE, CAETANO, FELIPE, GEORGE, AUGUSTO, GABRIELA e meus cumpadres ARTUR e ALINE,

pela amizade sincera, por terem compartilhado das minhas alegrias e lágrimas, pela cumplicidade. Vocês fazem os meus dias mais felizes! Cada um, do seu jeito, é essencial na minha vida! Vocês são muito mais que amigos. Vocês me fazem grande!

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal do Ceará, por meio do Reitor prof. HENRY MOREIRA CAMPOS.

À Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem (FFOE/UFC), na pessoa de sua diretora Profa. LIDIANY KARLA DE AZEVEDO RODRIGUES

Ao Curso de Odontologia, na pessoa de seu Coordenador, prof. JULIANO DE MENDONÇA SARTORI

Ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, na pessoa de seu coordenador, Prof. Dr. VICENTE DE PAULO ARAGÃO SABOIA.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e presteza em avaliar e enriquecer este trabalho.

Às funcionárias da pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, JANAINÉ MARQUES LEAL e LÚCIA RIBEIRO MARQUES LUSTOSA, pelo auxílio e disponibilidade.

À CAPES, pelo financiamento da pesquisa através do Edital Universal.

A todos aqueles que, de forma direta ou indireta, tornaram possível a realização deste trabalho.

"O único lugar onde o sucesso vem antes  
do trabalho é no dicionário." (Albert Einstein)

"Graça Divina é começar bem. Graça Maior é continuar no caminho certo.  
Mas graça das graças é não desistir nunca"(Dom Helder Câmara)

“A persistência é o menor caminho do êxito”. (Charles Chaplin)

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi o de avaliar o efeito de uma pasta antibiótica no tratamento de dentes permanentes necrosados por trauma, verificar a presença de micro-organismos – MO's no interior dos condutos radiculares, bem como sua identificação através da realização de reação em cadeia da polimerase - PCR. Desta forma foram realizados um estudo clínico e outro *in vitro*. Participaram do estudo clínico 14 pacientes que apresentavam dentes permanentes anteriores com rizogênese incompleta e necrose pulpar causada por trauma. No estudo *in vitro* foram utilizados 60 espécimes uniradiculares e padronizados em comprimento e diâmetro apical, contaminados com *Enterococcus faecalis* por um período de 30 dias. Na pesquisa clínica, os pacientes foram submetidos aos procedimentos clínicos da técnica de revascularização que utiliza hipoclorito de sódio e pasta biantibiótica para desinfecção do canal radicular e mineral trióxido agregado (MTA) como material biocompatível para vedamento do terço cervical. O objetivo foi avaliar a eficácia de ação da pasta biantibiótica através de comprovação microbiológica por meio de crescimento bacteriano e técnica de PCR em coletas realizadas após acesso e abertura dental (C1), após irrigação com Hipoclorito de sódio 2,5% (C2) e ao final de 30 dias de uso da pasta bi-antibiótica intracanal (C3). Para confirmar o sucesso clínico observou-se a continuidade da formação radicular, o espessamento das paredes dentinárias e o fechamento apical através de radiografias periapicais e tomografias localizadas. Também foram observadas a ausência de sinais e sintomas, bem como ausência de lesão periapical. Dos 14 pacientes tratados, 7 eram do sexo masculino (50%) e 7 do sexo feminino (50%), com idade variando entre 6 e 14 anos. A maior parte dos dentes apresentaram como trauma a luxação lateral (73,3%) e os outros 26,3% dos casos de trauma foram avulsão, intrusão, extrusão e subluxação, associados ou não à fratura coronária sem exposição pulpar. A percentagem de sucesso foi de 93%, ou seja, 14 dos 15 dentes tratados apresentando fechamento apical completo até a última consulta de acompanhamento registrada. O estudo *in vitro* teve o objetivo de avaliar a eficácia de ação da pasta biantibiótica através de comprovação microbiológica em coletas realizadas após acesso e abertura dental (C1), após irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% (C2) e ao final de 30 dias de uso da pasta antibiótica intracanal (C3). Dos 14 dentes em que foram realizadas culturas bacterianas das três coletas podemos observar que houve redução significativa do número de UFC da coleta 1 ( $27.1 \pm 2.5$ ) para a coleta 2 ( $9.8 \pm 1.2$ ) e desta para a coleta 3 ( $1.3 \pm 0.5$ ) ( $p < 0.001$ ). Pode-se observar também, que houve redução significativa no número de amostras que apresentaram nos testes de PCR as bandas de DNA para o primer universal 16s da coleta 1 ( $n=15$ , 100,0%) para a coleta 3 ( $n=3$ , 20,0%) ( $p < 0.001$ ) e de DNA da bactéria *E. faecalis* da coleta 1 ( $n=5$ , 33,3%) para as

coletas 2 e 3 (n=0, 0.0%) (p=0.004). Nenhuma amostra apresentou DNA da bactéria *P. gingivalis* em nenhum dos momentos de coleta (p=1.000). No estudo *in vitro* foram utilizados espécimes dentais preparados e previamente contaminados com *E. faecalis* e tratados com diferentes pastas antibióticas. As análises foram divididas em 5 grupos: G1 – Pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacino e minociclina); G2 – Pasta biantibiótica (metronidazol e ciprofloxacino); G3 – Pasta Amoxicilina; G4– Pasta Calen (hidróxido de cálcio); G5 - Solução fisiológica 0,9% (grupo controle). No grupo controle negativo - G5 não foi utilizada nenhuma medicação intracanal. Todos os grupos foram compostos por 12 espécimes dentais. Em todos os grupos foram realizadas coletas microbianas - C com pontas de papel absorventes estéreis antes da realização do preparo químico - C1 e nos respectivos dias de coleta e avaliação das medicações que ocorreram no 7º dia, 14º dia, 21º dia e 30º dia de uso das medicações intracanaís - C2. O intuito das coletas foi verificar a presença de micro-organismos – MO's no interior dos condutos radiculares previamente contaminados com a bactéria *E. faecalis*. Com isso, pode -se observar que no grupo tratado com a pasta triantibiótica não houve modificação no número de UFC no dia 7, no entanto, houve redução significativa nos demais dias de estudo (p<0.001). No grupo tratado com a pasta biantibiótica houve redução significativa no número de UFC nos dias 7 (p=0.022) e 21 (p<0.001), sem diferenças nos dias 14 e 30. No grupo tratado com amoxicilina, apenas no dia 21 (p<0.001) houve redução significativa no número de UFC. No grupo tratado com a pasta Calen não houve modificação no número de UFC nos dias 7 e 30 (p=0.338), no entanto, houve redução significativa do número de UFC nos dias 14 e 21 (p=0.011). E por ultimo, não houve redução significativa na contagem de UFC do pré para o pós-tratamento no grupo salina nos dias sete, 14, 21 e 30 (p=0.248). Considerando a variação ( $\Delta$ ) do número de UFC houve redução significativa do valor de  $\Delta$  dos grupos biantibiótica em relação ao grupo tratado com soro nos dias 14 e 21 e dos grupos tratados com amoxicilina e triantibiótica no dia 21 (p<0.001). Desta forma, pôde-se concluir que os dentes tratados mostraram resolução dos sinais e sintomas clínicos e de radiolucência periapicais no período de acompanhamento. Além disso, apresentaram maior aumento no comprimento radicular, espessura da parede de raiz e fechamento apical. Também podemos observar que as pastas antibióticas, dentre elas as pastas triantibiótica e biantibiótica apresentaram um excelente efeito inibitório frente ao micro-organismo *E. faecalis*. Ambas pastas biantibiótica e triantibiótica foram mais eficazes do que a pasta de hidróxido de cálcio contra *E. faecalis*. Assim, a pasta biantibiótica pode ser considerada um substituto antibacteriano eficaz e comparável para pasta triantibiótica e pasta de hidróxido de cálcio.

**Palavras-chaves:** *Enterococcus faecalis*, Preparo de canal radicular, Endodontia, Polpa dentária, Apexificação, Antibacterianos, Tratamento do canal radicular, Traumatismos dentários.

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effects of an antimicrobial paste on the treatment of necrotic to trauma permanent teeth and to verify the presence of microorganisms in the root canal as well as to identify them by performing the polymerase chain reaction (PCR). Thus, two studies were performed: a clinical and microbiological investigation and another one *in vitro*. Patients who presented open apex necrotic anterior permanent teeth due to trauma and incomplete rhizogenesis were eligible to participate. In the *in vitro* study, 60 single-rooted specimens were used and their length and root apical diameter were standardized, being contaminated with *Enterococcus faecalis* for 30 days. In the clinical trial, patients underwent the clinical procedures of the revascularization technique that uses sodium hypochlorite and double antibiotic paste to disinfect the root canal and aggregated trioxide mineral (MTA) as biocompatible material to seal the root canal cervical third. The purpose was to investigate the efficacy of the double antimicrobial paste action through microbiological assessment by bacterial growth analysis and PCR technique in samples collected after endodontic access (C1), after sodium hypochlorite (2.5%) irrigation (C2) and at the end of a 30-day period of use of the double antimicrobial paste in the root canal (C3). The clinical success was assessed by observing the rhizogenesis, dentary wall thickening, and apex closing through periapical radiographs and localized tomography. Also, the absence of signal and symptoms was evaluated, as well as the absence of periapical lesions. 14 patients were treated, 7 male subjects (50%) and 7 female subjects (50%) whose age ranged from 6-14 years old. Most part of the teeth was affected by lateral luxation (73.3%) and the other (26,3%) cases of dental trauma were avulsion, intrusion, extrusion, and subluxation associated or not with crown fracture without pulp exposition. The percentage of the success reaching 93%. In other words, 14 out of 15 treated teeth presented complete apex closing until the last follow-up examination. Regarding the *in vitro* study, our purpose was to evaluate the efficacy of the double antimicrobial paste through microbiological evidence in samples collected after the endodontic access (collection 1), after sodium hypochlorite (2.5%) irrigation (collection 2) and at the end of a 30-day period of use of the double antimicrobial paste in the root canal (collection 3). In the 14 teeth from which bacterial samples were collected, it occurred a significant reduction in the colony forming unit (CFU) numbers at the collection 1 ( $27.1 \pm 2.5$ ) to the collection 2 ( $9.8 \pm 1.2$ ), and from this one to the collection 3 ( $1.3 \pm 0.5$ ) ( $p < 0.001$ ). It can be also observed that there was a significant reduction in the number of samples that presented DNA bands for the universal 16 s primer from the collection 1 ( $n=15$ , 100.0%) to the collection 3 ( $n=3$ , 20.0%)

( $p < 0.001$ ) and *E. faecalis* DNA from the collection 1 ( $n=5$ , 33.3%) to the collections 2 and 3 ( $n=0$ , 0.0%) ( $p=0.004$ ). No sample presented the *P. gingivalis* bacterial DNA at any collection moment ( $p=1.000$ ). In the *in vitro* study, dental specimens were prepared and contaminated with *E. faecalis* previously to the treatment with different antimicrobial pastes. The analysis was divided in 5 groups: G1 – triple antimicrobial paste (metronidazol, ciprofloxacin, and minocycline), G2 – double antimicrobial paste (metronidazol and ciprofloxacin); G3 – amoxicillin paste; G4 – Calen (calcium hydroxide paste); and G5 – physiological solution (negative control). In the negative control group – G5 no intracanal medication was used. All the groups consisted of 12 dental specimens. In all groups, microbiological collections (C) were carried out using sterile absorbent paper tips before the chemical preparation – C1 and in the respective days for the sample collection and evaluation of the root medication that occurred on the days 7, 14, 21, and 30 of use of the intra-canal medication – C2. The purpose here was to verify the presence of microorganisms in the root canals that were previously contaminated with *E. faecalis* inoculum. It can be observed that in the group treated with the triple antimicrobial paste, there was no change in the CFU numbers on the 7<sup>th</sup> day. However, there was a significant reduction on the other days of study ( $p < 0.001$ ). In the group treated with the double antimicrobial paste, there was a significant reduction in the number of CFU on days 7 ( $p=0.022$ ) and 21 ( $p < 0.001$ ), which showed no different from the days 14 and 30. In the amoxicillin-treated group, only on the 21<sup>st</sup> day ( $p < 0.001$ ) it can be observed a significant decrease in the CFU numbers. The treatment with the Calen paste did not alter the CFU numbers on days 7 and 30 ( $p=0.338$ ). It did, however, significantly alter the CFU numbers on days 14 and 21 ( $p=0.011$ ). Lastly, there was no significant reduction in the CFU numbers in the negative control group before and after the treatment on days 7, 14, 21, and 30 ( $p=0.248$ ). Considering the CFU number variation ( $\Delta$ ), there was a significant reduction in the  $\Delta$ value of the double antimicrobial paste group in comparison with the negative control on days 14 and 21, as well as the group treated with amoxicillin and triple antimicrobial paste on the 21<sup>st</sup> day ( $p < 0.001$ ). It can be concluded that the treated teeth showed clinical and radiographic resolution. Further, most of the treated teeth showed radicular length increase, root wall thickening, and apex closing in the follow-up period. Also, we can observe that the antimicrobial pastes, among them the triple and double ones, presented excellent inhibitory effects on *E. faecalis*. The two pastes were more efficient in reducing the *E. faecalis* growth than the calcium hydroxide paste. Hence, the double antimicrobial paste can be considered an antimicrobial agent efficient and comparable to the triple antimicrobial and calcium hydroxide pastes.

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, root canal preparation, endodontics, dental pulp, apexification, anti-bacterial agents, root canal therapy, tooth injuries.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MO Micro-organismo

Rx Raios X

JCE Junção cimento-esmalte

CDC Cimento dentina

Necro Polpa necrosada

MIC Medicação intracanal

BHI *Brain Heart Infusion*

NaOCl Hipoclorito de Sódio

CRT Comprimento real de trabalho

PCR Reação em cadeia da polimerase

EDTA Ácido Etileno Diamino Tetra-Acético

VMGA *Viability Medium, Göteborg, Anaerobically prepared III13*

RTF Fluido Reduzido para Transporte

REP Procedimentos de Endodontia Regenerativa

MTA Mineral Trióxido Agregado

## LISTA DE SÍMBOLOS

mm Milímetro

ml Mililitro

$\mu\text{m}$  Micrometro

$\mu\text{l}$  Microlitro

% Porcentagem

$^{\circ}\text{C}$  Graus Celsius

g Grama

= Igual

< Menor

> Maior

$n^{\circ}$  Número

$\Delta$  Variação

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	21
2. PROPOSIÇÃO	26
2.1 Objetivo Geral:	26
2.2 Objetivos Específicos:	26
3. CAPÍTULO 1	29
RESUMO	31
ABSTRACT	32
INTRODUÇÃO	33
MATERIAIS E MÉTODOS	34
RESULTADOS	39
DISCUSSÃO	40
CONCLUSÃO	42
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	46
APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO	47
APÊNDICE B - TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES	48
ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMPEPE	49
4. CAPÍTULO 2	51
RESUMO	52
ABSTRACT	54
INTRODUÇÃO	55
MATERIAIS E MÉTODOS	57
RESULTADOS	61
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
LISTA DE TABELAS E FIGURAS	73
APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA	77
APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	82
APÊNDICE C - MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS	84
ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMPEPE	92
5. CONCLUSÃO GERAL	94
REFERÊNCIAS	96

# Introdução Geral

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

As patologias pulpares e periradiculares são usualmente de natureza inflamatória e de etiologia microbiana e os micro-organismos e seus produtos exercem um papel fundamental na indução e, principalmente, na perpetuação de tais doenças (Kakehashi; Stanley; Fitzgerald, 1965, Berge-nholtz, 1974, Sundqvist, 1976, Peters et al. 2002, Nair 2006, Takahashi; NYVAD, 2008). O controle da infecção dos canais radiculares permanece como um grande desafio para a Endodontia moderna. Apesar dos constantes avanços na evolução dos materiais e equipamentos utilizados para modelagem, desinfecção e obturação do canal, o combate à infecção permanece desafiador devido a complexidade e peculiaridade deste ambiente. O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado à máxima eliminação de micro-organismos presentes nos sistema de canais radiculares previamente à obturação (Sjogren et al. 1991, Kontakiotis et al. 2008).

Embora fatores não microbianos endógenos e exógenos possam estar envolvidos em casos de insucesso endodôntico, os micro-organismos e seus produtos são os principais responsáveis pelo fracasso na terapia. Na maioria das vezes, uma infecção persistente do canal radicular é resultante de um preparo químico-mecânico e de uma medicação intracanal inadequados (Card et al. 2002). Estes micro-organismos, usualmente, estão presentes em áreas do canal inacessíveis aos procedimentos de desinfecção e são resistentes aos agentes químicos empregados (Siqueira e Rôças, 2008). A adequada desinfecção do sistema de canais radiculares pode ser obtida pelos efeitos químicos e mecânicos da instrumentação e irrigação. No entanto, por permanecer mais tempo no interior do canal, um medicamento intracanal dotado de ação antimicrobiana tem maiores chances de atingir áreas de anatomia complexa não afetadas pela instrumentação como istmos, ramificações e túbulos dentinários. Portanto, sua ação antimicrobiana potencializa a redução da microbiota endodôntica proporcionando melhor reparação dos tecidos periradiculares e, conseqüentemente, um maior índice de sucesso da terapia endodôntica (Siqueira e Uzeda, 1997, Ricucci, Siquerira, 2010).

A microbiota presente em canais radiculares obturados com insucesso endodôntico difere tanto quantitativa quanto qualitativamente daquela normalmente encontrada em dentes necrosados e não tratados. Observa-se nas infecções secundárias e persistentes um numero limitado de micro-organismos com predominância de anaeróbios facultativos gram-positivos. Já uma infecção polimicrobiana com predominância de anaeróbios estritos gram-negativos, está comumente associada a canais radiculares não tratados endodonticamente (Sundquist et al. 1998, Molander et al. 1998).

A identificação frequente de *Enterococcus faecalis* de canais radiculares com insucesso do tratamento endodôntico tem sido amplamente relatada. De acordo com Pinheiro et al. 2003, foi ob-

servado de 29 - 77% no isolamento desta bactéria. Entretanto, enterococcus não são favorecidos pelas condições presentes em canais radiculares não tratados endodonticamente e, quando presentes, eles usualmente compõem uma pequena porção da microbiota presente no canal radicular. *Enterococcus faecalis* parecem ter alta resistência a medicamentos usados durante o tratamento, sendo um dos poucos micro-organismos que demonstrou *in vitro* resistir a uma ampla variedade de agentes antimicrobianos, principalmente ao hidróxido de cálcio.

Alguns materiais, como o hidróxido de cálcio e a clorexidina, já estão consagrados no meio endodôntico para utilização como medicação intracanal, entretanto, encontrar novas alternativas é fundamental para combater a resistência apresentada por alguns micro-organismos. O hidróxido de cálcio, por seu poder alcalinizante, tem sido um dos principais materiais de escolha para medicação intracanal. O seu respectivo destaque entre os fármacos endodônticos deve-se graças as suas propriedades enzimáticas, ao efeito antimicrobiano e ao seu efeito mineralizador. Estas propriedades são decorrentes de seu elevado pH. Apesar de sua ampla utilização, alguns micro-organismos como *E. faecalis* e *C. albicans* tem apresentado resistência ao seus efeitos mesmo após aplicação por período de tempo prolongado. A clorexidina tem sido amplamente sugerida como material para antisepsia de canais radiculares, seja como substância química auxiliar durante o preparo químico-mecânico ou como medicação intracanal entre sessões (Gomes et al. 2003).

Para estudar a efetividade de agentes antimicrobianos, a identificação e quantificação de micro-organismos viáveis e não viáveis é essencial. A técnica mais frequentemente usada nestes estudos é o método da cultura microbiológica (Peters, 2002). Contudo, apenas micro-organismos viáveis são identificados por esse método. Entretanto, apenas uma pequena parte dos micro-organismos são cultiváveis laboratorialmente em meios de cultura convencionais prejudicando sua identificação (Walker et al. 2000). Desta forma, a utilização da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) auxiliaria no processo de identificação da microbiota residente nos canais radiculares de dentes necrosados por trauma ou cárie e também na identificação de micro-organismos encontrados em dentes com infecções persistentes, pós- tratamento endodôntico.

Durante anos, os clínicos têm avaliado os métodos de base biológica para restaurar um complexo dentino-pulpar funcional em dentes com sistema de canais radiculares com polpa necrosada causada primariamente por trauma ou cárie (Jung et al. 2008). Os mais recentes casos relatados demonstraram que é possível restaurar um complexo dentino-pulpar funcional em dentes permanentes humanos imaturos (Iwaya et al. 2001; Chueh et al. 2006). Isto pode ocorrer devido a procedimentos regenerativos definidos como processos de base biológica projetados para substituir as estruturas danificadas, incluindo estruturas de dentina e raiz, bem como as células do complexo dentina-polpa

(Murray et al. 2007). As vantagens da revascularização celular encontram-se na possibilidade de desenvolvimento do sistema radicular e reforço das paredes dentinárias pela deposição de tecido duro, reforçando assim a raiz contra fratura (Bose et al. 2009).

Ao longo destes últimos anos, pôde-se observar que a maioria dos casos de endodontia regenerativa utilizaram pastas antibióticas como medicação intracanal (Iwaya, 2001; Windley et al. 2005). Porém, a utilização das formulações antibióticas como medicação intracanal foi documentado há décadas, antes mesmo do primeiro relatório de revascularização (Rule; Winter, 1966). A formulação tri-antibiótica, composta por ciprofloxacino, metronidazol e minociclina, foi testada pela primeira vez *in vitro* contra bactérias isoladas de lesões de cárie e infecções endodônticas em dentes decíduos (Sato, et al. 1993). Porém tornou-se rapidamente o medicamento intracanal mais utilizado (Althumairy et al. 2014).

Segundo Trope (2010), a raiz imatura com necrose pulpar e periodontite apical apresenta múltiplos desafios para o sucesso do tratamento. O espaço do canal radicular infectado não pode ser desinfetado como um canal padrão de um dente com rizogênese completa, pois o preenchimento do canal radicular após a fase antimicrobiana é difícil em função da ausência de um batente apical que limite o material obturador. Em dentes com rizogênese incompleta, algumas etapas da terapia endodôntica são dificultadas, como a definição do batente apical, o travamento do cone e a possibilidade de extravasamento do material para os tecidos periodontais. Além disso, mesmo quando esta etapa é superada, as raízes destes dentes são finas, possuindo uma maior suscetibilidade a fraturas. A técnica convencional utilizando hidróxido de cálcio, apesar de ser descrita com sucesso na literatura, apresenta algumas desvantagens. São necessárias constantes trocas da medicação e há uma demora de 6 a 18 meses para a formação da barreira de tecido duro, além da necessidade de acompanhamentos sucessivos do paciente por um grande período de tempo.

Relatos de casos e séries de casos introduziram recentemente técnicas endodônticas detalhadas aplicadas aos casos de necrose pulpar em dentes permanentes com rizogênese incompleta. (Cehreli et al. 2011; Kahler et al. 2014). Estas técnicas têm sido sugeridas para induzir o complexo dentino-pulpar e levar a um crescimento contínuo da raiz e desta forma reduzir o risco de fratura geralmente associada a técnica tradicional de apicificação onde a raiz permanece fina e frágil. Os agentes utilizados na desinfecção dos canais radiculares durante a técnica de revascularização é o hipoclorito de sódio como agente irrigante e uma pasta triantibiótica, que é uma mistura de partes iguais de metronidazol, ciprofloxacina, e minociclina. A pigmentação da dentina por minociclina, um derivado da tetraciclina, durante a regeneração tem sido relatada. Portanto, alguns autores sugere-

rem a eliminação da minociclina, mantendo apenas metronidazol e ciprofloxacina, formando assim uma pasta biantibiótica (Petrino et al. 2010 e Kim et al. 2010). Alguns trabalhos têm sugerido para estas condições clínicas o uso de um protocolo de desinfecção e obturação após estímulo do tecido periapical de forma a ocorrer uma “revascularização pulpar”, porém poucos trabalhos são encontrados na literatura que comprovem a eficácia deste procedimento (Chueh et al., 2009; Lin et al. 2014; Nagata et al. 2014; Latham et al. 2016). Segundo Hoshino, 1996 e Windley, 2005 a utilização de uma pasta antibiótica composta por metronidazol, ciprofloxacina e minociclina tem demonstrado ser muito eficaz contra os patógenos comumente encontrados no interior do sistema de canais radiculares. No entanto, algumas variações na mistura da pasta original tri-antibióticos têm sido usados com bom êxito. Essas variações foram julgados por causa da pigmentação da dentina pelo antibiótico minociclina. Ou a minociclina é deixada de fora, portanto, usando uma pasta bi-antibiótica ou cefaclor é usado como um substituto para o minociclina (Trope, 2008).

Desta forma, o questionamento acerca da melhor maneira de proteger o canal radicular dos micro-organismos, sem, contudo, oferecer riscos desnecessários ao paciente e ao mesmo tempo buscar atender os anseios da própria classe odontológica e da sociedade em geral por tratamentos cada vez mais rápidos e eficazes ainda são um desafio para a Endodontia.

Existe um consenso na literatura que mais estudos neste assunto devem ser realizados (Ritter, 2004; Windley, 2005; Jung, 2008; Akgum et al. 2009; Trope, 2010; Chen et al. 2013). Desta maneira, existe a necessidade e relevância da realização de um estudo comparativo das pastas antibióticas mais utilizadas na terapêutica clínica atual. A comprovação da atividade farmacológica de uma medicação intracanal por um período de até 30 dias seria ainda bastante vantajosa. Aliado a isto, a ausência de efeitos indesejáveis a estética do elemento dentário, respaldariam a sua utilização no tratamento endodôntico de elementos dentários com rizogênese incompleta. Assim, acredita-se na relevância de realizar um estudo de série de casos utilizando pasta biantibiótica e realizando a técnica de revascularização e acompanhamento destes casos para observar o processo de desenvolvimento radicular. O desenvolvimento de um protocolo efetivamente eficaz para desinfecção do sistema de canais radiculares está intimamente atrelado ao avanço da microbiologia como ciência.

Proposição

## 2. PROPOSIÇÃO

O presente trabalho teve como objetivos:

### 2.1 Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar, *in vitro*, a atividade antimicrobiana de diferentes pastas antibióticas e uma pasta de hidróxido de cálcio utilizadas em protocolos de revascularização (capítulo 1). Bem como, Avaliar, *in vivo*, através de inspeção clínica, imagens radiográficas e tomográficas e técnicas microbiológicas, a eficácia do protocolo de revascularização utilizando-se a pasta biantibiótica em dentes permanentes com ápice incompleto e necrose pulpar causada por trauma. (capítulo 2).

### 2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Avaliar o sucesso clínico e radiográfico do uso da pasta biantibiótica como protocolo de revascularização;
- ✓ Avaliar através de imagens radiográficas e tomográficas a evolução da formação radicular e do fechamento apical dos dentes submetidos a revascularização;
- ✓ Avaliar a redução da microbiota bacteriana intracanal com uso da pasta biantibiótica;
- ✓ Identificar a presença de *E. faecalis* e *P. gingivalis* no interior dos condutos radiculares de dentes permanentes imaturos;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana da pasta biantibiótica em canais radiculares necrosados de dentes permanentes imaturos;
- ✓ Avaliar *in vitro* o efeito farmacológico das diferentes pastas antibióticas;
- ✓ Comparar *in vitro* a eficácia das pastas triantibiótica, biantibiótica e de amoxicilina em relação à pasta de hidróxido de cálcio;
- ✓ Avaliar *in vitro* o grau de eficácia das pastas antibióticas por períodos de 7, 14, 21 e 30 dias.

# Capítulo 1

---



### 3. CAPÍTULO 1

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato.

Assim sendo, esta tese é composta de dois artigos científicos que serão submetidos ao periódico *Journal of Endodontics*, conforme descrito abaixo:

#### **Avaliação *in vitro* das pastas antibióticas utilizadas nos procedimentos de revascularização pulpar em um modelo de sistemas de canais radiculares humanos infectados com *Enterococcus faecalis***

BARBOSA AKSS, SOUSA FFO, GONDIM JO, MOREIRA NETO, JJS

ADRIANA KELLY DE SOUSA SANTIAGO BARBOSA<sup>a</sup>, FRANCISCO FÁBIO OLIVEIRA SOUSA<sup>b</sup>, JULIANA OLIVEIRA GONDIM<sup>c</sup>, JOSÉ JEOVÁ SIBRA MOREIRA NETO<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup>PhD, Pós-Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>c</sup> PhD, Professor Adjunto, Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>d</sup> PhD, Professor Associado, Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

**INFORMAÇÃO DOS AUTORES**

Adriana Kelly de Sousa Santiago Barbosa

e-mail: [adrianaodontologiaufc@gmail.com](mailto:adrianaodontologiaufc@gmail.com)

Francisco Fábio Oliveira Sousa

e-mail: [sousa.ffe@gmail.com](mailto:sousa.ffe@gmail.com)

Juliana Oliveira Gondim

e-mail: [jujugondim@yahoo.com.br](mailto:jujugondim@yahoo.com.br)

José Jeová Sibra Moreira Neto

e-mail: [jeova@ufc.com](mailto:jeova@ufc.com)

**Autor de Correspondência**

José Jeová Sibra Moreira Neto

e-mail: [jeova@ufc.br](mailto:jeova@ufc.br)

telefone: +55 (85) 988952075

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** O intuito do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a desinfecção de canais radiculares de dentes permanentes humanos uniradiculares utilizando diferentes variações de medicações intracanal.

**METODOLOGIA:** Para isso foram utilizados 60 espécimes padronizados em comprimento e diâmetro apical, contaminados com *Enterococcus faecalis* por um período de 30 dias. As análises foram divididas em 5 grupos: G1 – Irrigação com Hipoclorito de sódio 5,25% e utilização de pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacino e minociclina); G2 – Irrigação com Hipoclorito de sódio 5,25% e utilização de pasta biantibiótica (metronidazol e ciprofloxacino); G3 – Irrigação com hipoclorito de sódio 5,25% e utilização de pasta Amoxicilina; G4 – Utilização de pasta de hidróxido de cálcio (Calen); G5 - Irrigação solução fisiológica 0,9% (grupo controle). No grupo controle negativo - G5 não foi utilizada nenhuma medicação intracanal. Todos os grupos foram compostos por 12 espécimes dentais. Em todos os grupos foram realizadas coletas microbianas - (C) com pontas de papel absorventes estéreis antes da realização do preparo químico - (C1) e nos respectivos dias de coleta e avaliação das medicações que ocorreram no 7º, 14º, 21º e 30º dias de uso das medicações intracanaís - (C2). O intuito das coletas foi verificar a presença de micro-organismos – MO's no interior dos condutos radiculares previamente contaminados com a bactéria *E. faecalis*.

**RESULTADOS:** A partir de então observar quais as medicações intracanaís mais eficazes. Com isso, pode -se observar que no grupo tratado com a pasta triantibiótica não houve modificação no número de UFC no dia sete, no entanto, houve redução significativa nos demais dias de estudo ( $p < 0.001$ ). No grupo tratado com a pasta biantibiótica houve redução significativa no número de UFC nos dias sete ( $p = 0.022$ ) e 21 ( $p < 0.001$ ), sem diferenças nos dias 14 e 30. No grupo tratado com amoxicilina, apenas no dia 21 ( $p < 0.001$ ) houve redução significativa no número de UFC. No grupo tratado com a pasta Calen não houve modificação no número de UFC nos dias 7 e 30 ( $p = 0.338$ ), no entanto, houve redução significativa do número de UFC nos dias 14 e 21 ( $p = 0.011$ ). E por último, não houve redução significativa na contagem de UFC do pré para o pós-tratamento no grupo salina nos dias sete, 14, 21 e 30 ( $p = 0.248$ ). Considerando a variação ( $\Delta$ ) do número de UFC houve redução significativa do valor de  $\Delta$  dos grupos biantibiótica em relação ao grupo tratado com soro nos dias 14 e 21 e dos grupos tratados com amoxicilina e triantibiótica no dia 21 ( $p < 0.001$ ).

**CONCLUSÃO:** Pôde-se concluir que as pastas antibióticas, dentre elas as pastas triantibiótica e biantibiótica apresentaram um excelente efeito inibitório frente ao micro-organismo *E. faecalis*. Portanto a sua utilização como medicação intracanal nos casos de dentes com rizogênese incompleta, pode ser uma alternativa adequada de tratamento.

**Palavras-chaves:** *Enterococcus faecalis*, preparo de canal radicular, endodontia, antibacterianos, tratamento do canal radicular.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the disinfection of the root canals of single-rooted human teeth using different types of intra-canal medications.

**METHODOLOGY:** Sixty single-rooted specimens were used and their length and root apical diameter were standardized, being contaminated with *Enterococcus faecalis* for 30 days. The study design consisted of 6 experimental groups G1 – 5.25% sodium hypochlorite irrigation and triple antimicrobial paste use (metronidazol, ciprofloxacin, minocycline); G2 - 5.25% sodium hypochlorite irrigation and double antimicrobial paste (metronidazol, ciprofloxacin); G3 - 5.25% sodium hypochlorite irrigation and amoxicillin paste; G4 – calcium hydroxide paste (Calen); G5 – saline solution irrigation (negative control). In the negative control – G5 – no medication was applied. All groups consisted of 15 dental specimens. In all groups, microbial sample collections were performed using sterile absorbent paper tips before the chemical preparation – C1 and on the respective days of collection and evaluation of the intra-canal medication that occurred on days 7, 14, 21, and 30 – C2. The purpose of the collection was to verify the presence of microorganisms in the root canals that were previously contaminated with an *E. faecalis* inoculum so that it could be observed which intra-canal medication would exert antimicrobial effects.

**RESULTS:** It can be observed that in the group treated with the triple antimicrobial paste, there was no change in the CFU numbers on the 7<sup>th</sup> day. However, there was a significant reduction on the other days of study ( $p < 0.001$ ). In the group treated with the double antimicrobial paste, there was a significant reduction in the number of CFU on days 7 ( $p = 0.022$ ) and 21 ( $p < 0.001$ ), which showed no different from the days 14 and 30. In the amoxicillin-treated group, only on the 21<sup>st</sup> day

( $p < 0.001$ ) it can be observed a significant decrease in the CFU numbers. The treatment with the Calen paste did not alter the CFU numbers on days 7 and 30 ( $p = 0.338$ ). It did, however, significantly alter the CFU numbers on days 14 and 21 ( $p = 0.011$ ). Lastly, there was no significant reduction in the CFU numbers in the negative control group before and after the treatment on days 7, 14, 21, and 30 ( $p = 0.248$ ). Considering the variation ( $\Delta$ ) in the CFU numbers, there was a significant decrease in the  $\Delta$  value of the double antimicrobial and calcium hydroxide pastes compared with the negative control on days 14 and 21 and the groups treated with amoxicillin and triple antimicrobial pastes on day 21 ( $p < 0.001$ ).

**CONCLUSION:** It can be concluded that the antimicrobial pastes, among them the double and triple antimicrobial ones, exerted excellent inhibitory effects on *E. faecalis*. Therefore, its use as intra-canal medication in cases of incomplete rhizogenesis can be an alternative treatment.

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, root canal preparation, endodontics, anti-bacterial agents, root canal therapy.

## INTRODUÇÃO

Para o sucesso do tratamento endodôntico de dentes permanentes com polpa necrosada a eliminação ou redução da infecção bacteriana do interior dos canais radiculares é essencial. Para isto, é importante o uso de soluções irrigadoras associadas à instrumentação endodôntica, utilização de medicações intracanaís e vedamento do canal com material obturador (1).

Em dentes com rizogênese incompleta, algumas etapas da terapia endodôntica são dificultadas, como a definição do batente apical, o travamento do cone e a possibilidade de extravasamento do material para os tecidos periodontais. Além disso, as raízes dentárias neste estágio apresentam-se com paredes finas e frágeis (2-6). Portanto, em um dente imaturo é recomendado a mínima ou nenhuma instrumentação mecânica, sendo então necessário utilizar uma medicação que possa efetivamente desinfetar o canal e não ter efeito deletério sobre a dentina radicular ou quaisquer células indiferenciadas da região apical.

A técnica convencional utilizando hidróxido de cálcio, apesar de ser descrita com sucesso na literatura, apresenta algumas desvantagens. São necessárias constantes trocas da medicação, há uma demora de 6 a 18 meses para a formação da barreira de tecido duro, além da necessidade de acompanhamentos sucessivos do paciente por um grande período de tempo (2).

Hoshino et al. (3), preconizaram o uso de uma pasta antibiótica eficaz contra os patógenos presentes no interior dos canais radiculares composta por metronidazol, ciprofloxacino e minociclina como medicação intracanal, conhecida como pasta triantibiótica. Alguns autores têm utilizado algumas variações desta pasta antibiótica como medicação intracanal para descontaminação de dentes necrosados com ápice aberto (2-7). Porém, ainda não existe um consenso de qual a melhor medicação intracanal e qual o período de tempo adequado para que esta seja deixada dentro do canal (8-10)

O uso de medicação intracanal é de grande valia, visto que alcança locais nos quais os instrumentos endodônticos não exercem ação direta. A eficácia na eliminação de MOs está diretamente ligada à concentração do agente utilizado. Portanto, deve-se utilizar substâncias químicas em concentrações que sejam eficazes na desinfecção da dentina sem proporcionar riscos desnecessários a saúde do indivíduo.

O questionamento acerca da descontaminação do sistema de canais radiculares, sem, contudo, oferecer riscos desnecessários ao paciente e ao mesmo tempo buscar atender os anseios da própria classe odontológica e da sociedade em geral por tratamentos cada vez mais rápidos e eficazes ainda são um desafio para a Endodontia. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vitro* o efeito farmacológico das diferentes pastas antibióticas em espécimes dentais durante 30 dias. Pois a comprovação de uma medicação intracanal com eficácia microbiológica, sem comprometer a resistência e estética do elemento dentário consiste em uma ótima escolha para o tratamento endodôntico de dentes com rizogênese incompleta.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Seleção e preparo dos Espécimes**

O presente trabalho trata-se de um estudo experimental *in vitro*, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFC (COMEPE) sob o número 268/2011 (Anexo 1).

Foram utilizados 60 dentes humanos unirradiculares hígidos extraídos por motivos ortodônticos ou periodontais que permaneceram armazenados em timol 0,5% até o início de sua preparação. Os dentes foram radiografados para constatar a existência de um único canal radicular, bem como a ausência de reabsorções radiculares e outras alterações anatomo-patológicas. Foram removidos os restos de ligamento periodontal dos dentes através de raspagem com curetas. Em seguida, eles foram submetidos a descontaminação em hipoclorito de sódio a 1% por 14 dias e posteriormente os espécimes foram acondicionados em potes de vidro contendo solução salina 0,9% onde permaneceram por um período de sete dias para sua reidratação. Ao término da reidratação os elementos foram mantidos em solução salina 0,9% e acondicionados em refrigerador até a realização do experimento.

#### **Cepa Bacteriana:**

Foi utilizada cepa bacteriana de *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212)

#### **Meios de Cultura:**

- ✓ Brain Heart Infusion Broth( BHI) - Oxid, UnipathLtd, Basingstoke, Inglaterra.
- ✓ Brain Heart Infusion Agar (BHIA) - Oxid, UnipathLtd, Basingstoke, Inglaterra

#### **Preparo das Amostras**

A preparação dos espécimes foi realizada a partir da adaptação do modelo de HAAPASALO, OSRTAVIK (11) que foram os primeiros pesquisadores a introduzir um modelo para infecção e desinfecção da dentina radicular, *in vitro*, através de cilindros de dentina obtidos de raízes de incisivos bovinos

Os dentes foram seccionados em cortadeira elétrica sob refrigeração 2 mm abaixo da junção cemento esmalte e 3 a 5mm do ápice com discos diamantados dupla face sob constante irrigação com o objetivo de padronizar o comprimento dos remanescentes radiculares. Obtendo assim um remanescente radicular com 12 a 15 mm de comprimento.

A padronização do canal radicular objetivou alcançar no final da modelagem um diâmetro de canal compatível ao apresentado pela broca Gates-Glidden # 4 ( Dentsply, Ind. E Com. LTDA –

Petrópolis, RJ). Para tanto, os canais foram progressivamente dilatados com Limas K-File 1 série (# 15 - # 40) de aço inoxidável (Dentsply, Ind. E Com. LTDA – Petrópolis, RJ) e Brocas Gates-Glidden # 2 e # 3. Para finalização do preparo empregou-se a broca Gates-Glidden # 4 em toda a extensão do conduto radicular. Durante a preparação, soro fisiológico 0,9% foi utilizado como irrigante a cada troca de instrumento. Os dentes foram mantidos em gases umedecidas durante todo o procedimento para evitar a desidratação.

Para eliminação da *smear layer* os espécimes foram colocados em uma cuba ultrassônica contendo NaOCl 5,25% por 5min e depois água destilada por mais 3min para remoção dos restos orgânicos. Em seguida, os dentes foram secos e impermeabilizados com esmalte de unha excetuando-se os orifícios de entrada do canal radicular e o termino apical. Após uma hora, uma nova camada de esmalte foi aplicada com o objetivo de impermeabilizar a superfície radicular. Após um período de 24 horas, os espécimes foram colocados em frascos individuais com tampa rosqueável contendo 3,0 ml de BHI e esterilizados em autoclave a 121°C, 1atm por 15 minutos. Para comprovação da esterilidade, os espécimes foram mantidos em estufa a 37°C por 24 horas.

### **Cultivo e Preparo da suspensão de *E. faecalis*:**

Culturas de *E. faecalis* foram subcultivadas em placas de BHI Ágar + 5% sangue desfibrinado de carneiro colocadas em estufa para crescimento bacteriano à 37°C por 24 horas. Também foi utilizado o cultivo de bactérias em tubo inclinado contendo Ágar Müeller-Hinton. Para realização do experimento foram utilizados 60 dentes humanos, sendo utilizados 12 dentes para cada tipo de pasta. Os espécimes foram divididos nos 5 grupos seguintes de acordo com o tipo de medicação que foi testada:

Grupo 1: Pasta Tri-antibiótica (Metronidazol 400mg, Ciprofloxacino 250mg e Minociclina 100mg)

Grupo 2: Pasta Bi-antibiótica (Metronidazol 400mg e Ciprofloxacino 250mg)

Grupo 3: Pasta Amoxicilina (Amoxicilina 500mg)

Grupo 4: Pasta Hidróxido de Cálcio (Calen, S.S. White)

Grupo 5: Soro Fisiológico 0,9% (controle negativo)

Após crescimento, as colônias isoladas foram submetidas à agitação mecânica e a suspensão bacteriana ajustada em espectrofotômetro com absorvância de 800nm até atingir a concentração equivalente a 0,5 Mc Farland (  $1,5 \times 10^8$  UFC/ml).

### **Contaminação dos Espécimes:**

Foram removidos 2,0ml da solução de BHI dos frascos com espécimes esterilizados. Sendo então adicionados 2,0ml da suspensão de *E. faecalis* utilizando-se pontas de pipetas mecânicas descartáveis. Os Frascos foram vedados e mantidos à 37°C em estufa por 07 dias, com trocas de 1ml do meio de BHI contaminado por outro estéril, a cada 2 dias, para evitar saturação do meio, respeitando todos os procedimentos de assepsia exigidos para o procedimento.

Cada espécime foi montado em uma plataforma de cera utilidade previamente desinfectada com hipoclorito de sódio a 5,25% e neutralizada em solução de tiosulfato de sódio a 0,6%. A “plataforma” de cera e o espécime foram colocados em poços de caldo de culturas e em seguida foi acrescentado Ágar a 46°C até atingir a borda do bloco de dentina.

### **Ação dos medicamentos:**

Após correta contaminação dos espécimes estes foram colocados em estufa 37°C, por 24 horas para adequado crescimento bacteriano. As pastas foram manipuladas, utilizando proporções iguais de cada antibiótico e utilizando soro fisiológico 0,9% como veículo até se obter uma consistência pastosa firme. Logo então foram inseridas no interior dos espécimes com broca espiral Lentullo e acondicionada com pelota de algodão estéril e a porção superior do espécime foi vedada com Cimento de Ionômero de Vidro Restaurador – Vidrion- R (Dentsplay Ind. E Com. LTDA – Petrópolis, RJ). Os espécimes foram novamente levados a estufa 37°C separando-se os grupos de acordo com a medicação e o tempo de ação da mesma. A partir de então, nos devidos dias programados pelo estudo, 3 espécimes de cada grupo foram abertos e realizados testes de ação das pastas.

Em todos os grupos foram realizadas coletas microbianas - C com pontas de papel absorventes estéreis, tamanho #40, antes da inserção das pastas - C1 e nos dias de coleta e avaliação das medicações que ocorreu no 7º dia, 14º dia, 21º dia e 30º dia de uso das medicações intracanáis - C2. O intuito das coletas foi verificar a presença de micro-organismos – MO's no interior dos condutos

radiculares previamente contaminados com a bactéria *E. faecalis* e após ação das medicações nos dias programados.

Prosseguiu-se da seguinte forma: primeiramente o ionômero de vidro foi removido com caneta de alta rotação com sistema de refrigeração utilizando soro fisiológico 0,9%. Após isso a pasta presente no interior do espécime foi removida com irrigação abundante com seringa descartável e soro fisiológico 0,9%. Após irrigação, uma sequência de três cones de papel absorvente estéreis foi introduzida no interior do conduto e deixados cada um por um minuto e após sua remoção estes cones foram colocados em um eppendorf contendo 1ml de solução salina 0,9% para diluição das amostras e plaqueamento.

### **Processamento das amostras**

#### **Diluição em série**

Os *eppendorf* contendo solução salina e os cones de papel absorvente utilizados para coleta das amostras foram levados a um agitador durante 1 minuto para dispersão e homogeneização do inóculo. Após este procedimento, a amostra foi diluída seriadamente em tubos de diluição de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , sendo distribuídas uniformemente da menos diluída para a mais diluída. Cada tubo de diluição continha 900 $\mu$ l de solução salina 0,9% para as amostras de *E. faecalis* onde foram acrescentados 100 $\mu$ l do inóculo ao primeiro tubo de diluição, e os tubos subsequentes receberam 1/10 do número de bactérias presentes no tubo anterior (12). Posteriormente, as amostras dos tubos foram transferidas para placas de Petri contendo BHI Ágar onde foram semeadas em triplicata. Em seguida, as placas foram então levadas à estufa e incubadas a 37°C por 24 horas.

#### **Coleta de Resultados:**

Foram coletadas amostras para verificação de resultados nos intervalos de: 7º dia, 14º dia, 21º dia e 30º dia. A cada dia foram utilizados 3 espécimes de cada grupo. A leitura das placas então foi realizada após esse período de 1 dia de cada coleta, afim de ocorrer o adequado crescimento bacteriano.

A distribuição, de cada uma das variáveis do estudo, se comporta como uma curva normal, o que foi verificado pelo teste de kolmogorov-Smirnov, autorizando o uso de testes paramétricos. A

análise estatística foi realizada para avaliar a influência de cada medicação sobre a atividade antibacteriana. Para todos os testes aplicados foi considerado o nível de significância de 5% ( $\alpha = 0,05$ ). Os dados obtidos a partir do número de Unidades Formadoras de colônias (UFC) em cada diluição foram analisados de forma descritiva, comparando-se a atividade antimicrobiana das pastas em cada grupo no decorrer dos dias de coleta. Os dados foram analisados por meio do teste Repetead-Measures-Two-way-ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni e expressos em forma de média e erro-padrão.

Cabe ressaltar que todo o experimento foi realizado em condições assépticas. O meio de cultura, a água destilada e os instrumentais utilizados foram esterilizados em autoclave a 121° C, durante 15 minutos. Além disso, todo o experimento foi realizado no interior de uma capela de fluxo laminar (Maotc®, MM-80 – Manomer- Dwyer, Instruments Inc., Mich City, USA). Os dados obtidos a partir da análise das colônias foram analisados de forma descritiva, comparando-se a atividade antimicrobiana das pastas antibióticas, considerando-se as culturas microbianas isoladamente.

## RESULTADOS

Na figura 1 estão expressas as contagens de unidades formadoras de colônia (UFC) de todos os grupos após contaminação e antes da colocação da medicação (pré- tratamento) e após o período de uso da medicação (pós-tratamento). Pode-se verificar na figura 1 que as pastas biantibiótica e triantibiótica apresentam a melhor redução de UFC ao longo de todo o experimento, com maior redução entre o período de pré-tratamento e pós-tratamento para cada período de tempo em que os dentes foram avaliados.

Na figura 2, considerando a variação ( $\Delta$ ) do número de UFC houve redução significativa do valor de  $\Delta$  dos grupos biantibiótica em relação ao grupo tratado com soro nos dias 14 e 21 e dos grupos tratados com amoxicilina e triantibiótica no dia 21 ( $p < 0,001$ ). Pode ser observado que a pasta que apresentou maior efeito antimicrobiano inicial foi a biantibiótica, mantendo-o, além disso, durante todo o experimento, com pequeno decréscimo no dia 30. O mesmo não ocorreu com a pasta de hidróxido de cálcio, cujo efeito foi menos pronunciado inicialmente.

## DISCUSSÃO

O controle da infecção do sistema de canais radiculares permanece como um grande desafio para a Endodontia moderna. Apesar dos constantes avanços na evolução dos materiais, equipamentos e técnicas utilizados para modelagem, desinfecção e obturação do canal, o combate à infecção permanece desafiador devido à complexidade e peculiaridade deste microambiente. O sucesso do tratamento endodôntico está diretamente relacionado à máxima eliminação dos micro-organismos presentes no sistema de canais radiculares previamente à obturação (12, 13). A ação antimicrobiana direta potencializa a redução da microbiota endodôntica proporcionando melhor reparação dos tecidos periradiculares e, conseqüentemente, um maior índice de sucesso da terapia endodôntica (14, 15).

O hidróxido de cálcio, devido ao seu poder alcalinizante, tem sido um dos principais materiais de escolha para curativo de demora. O seu maior destaque deve-se às suas propriedades enzimáticas, ao efeito antimicrobiano e ao seu efeito mineralizador. Estas propriedades são decorrentes do elevado pH gerado quando em solução. Apesar de sua ampla utilização, alguns micro-organismos como o *E. faecalis* e a *C. albicans* têm apresentado resistência ao seu mecanismo de ação, mesmo após uma aplicação prolongada (16-20). Alguns materiais já estão consagrados na terapia endodôntica para utilização como curativo de demora, entretanto, encontrar novas alternativas é fundamental para combater a resistência apresentada por alguns micro-organismos mais persistentes (21-24).

Corroborando os estudos acima citados, o presente estudo observou o excelente efeito inibitório das pastas bi e triantibiótica, sobre o micro-organismo *E. faecalis*. Pode-se observar que há uma diferença estatisticamente significativa entre as pastas biantibiótica e triantibiótica em relação as demais pastas até a segunda e terceira semanas. Esta diferença pode indicar o uso destas duas pastas por um menor período de tempo, caso seja indicado, e sem nenhum prejuízo à ação de desinfecção do canal radicular, pois as mesmas atingem ação máxima e significativa de redução das bactérias com 14 ou 21 dias.

Os casos ideais para realização de procedimentos de revascularização são preferencialmente dentes permanentes com raízes imaturas e com pulpite irreversíveis ou dentes permanentes traumatizados imaturos com necrose pulpar, sem evidência radiográfica de periodontite apical(25, 26). Portanto, é importante chamar atenção para o significativo efeito das pastas antibióticas durante o período de 14 a 30 dias, pois este é um interstício de tempo adequado para um curativo intracanal, tendo em vista que algumas medicações comumente utilizadas perdem seu efeito já entre 7 e 14

dias. Além disso, a pasta biantibiótica pode ser uma boa alternativa no tratamento de dentes anteriores nos quais a pigmentação pelo antibiótico minociclina presente na pasta triantibiótica pode comprometer o sucesso clínico, tendo em vista que a partir do décimo quarto dia apresentou efeito inibitório idêntico ao da pasta triantibiótica.

Devido à sua facilidade de manipulação e inserção no conduto, ao prolongado efeito antibacteriano e ausência de pigmentação, a pasta biantibiótica pode ser uma alternativa viável como medicação intra-canal, principalmente no que diz respeito ao seu uso nos casos de tratamentos de dentes com rizogênese incompleta. Nestes casos é necessário um efeito inibitório elevado contra o crescimento de patógenos intracanal devido à limitação do uso de instrumentos para desinfecção mecânica, por conta da fragilidade das paredes radiculares. No entanto, uma dificuldade encontrada, em relação ao uso das pastas antibióticas, foi a de verificação do correto preenchimento do canal após inserção da mesma, pois, as pastas antibióticas, diferentemente da pasta de hidróxido de cálcio, não apresentam radiopacidade. Assim, tendo em vista a redução do risco de falhas, a técnica de inserção foi realizada de forma criteriosa no estudo atual.

Os estudos de Yassen et al. e Zarei et al. (27-29) mostraram que diferentemente do hidróxido de cálcio, a pasta triantibiótica tem alta penetração e ligação em dentina. No entanto, esta propriedade também aumenta a probabilidade de que células mesenquimais provenientes da papila apical e presentes no interior do sistema de canais radiculares durante os procedimentos reparadores tenham um contacto direto com o medicamento residual. Com base nestes estudos, o hidróxido de cálcio ainda pode ser considerado a primeira linha de medicação intracanal em procedimentos reparadores. Porém, é importante salientar que o tratamento prolongado com o hidróxido de cálcio, com níveis de pH elevado, também altera a composição de dentina, resultando num aumento da susceptibilidade a fraturas. Os resultados dos estudos sugeriram uma degradação do colágeno superficial ou desmineralização da dentina radicular causada pelo hidróxido de cálcio ou pela pasta antibiótica, respectivamente, depois de 1, 2, ou 4 semanas de exposição (30, 31). Desta forma, e de acordo com o presente estudo, não haveria problema quanto ao uso das pastas antibióticas, pois estas permanecem no canal por no máximo 30 dias. No entanto, o hidróxido de cálcio seria o principal causador das alterações dentinárias, pois o mesmo necessita de maior tempo de ação, principalmente nos tratamentos de apicificação.

Estes achados sugerem que semelhante aos agentes irrigantes, os medicamentos tem o potencial de alterar o substrato (dentina), onde idealmente células estaminais devem proliferar e se diferenciar (27, 28, 32). Portanto, o delicado equilíbrio entre a desinfecção e ligação à dentina celu-

lar para criação de um microambiente intracanal favorável para a proliferação de células estaminais requer uma investigação mais aprofundada.

No que diz respeito a melhor aplicabilidade da técnica de revascularização e uso das pastas antibióticas pelo clínico, mais estudos que possibilitem a utilização de agentes opacificadores, sem interferir na ação das pastas, bem como que comprovem sua eficácia clínica, seriam relevantes para maior divulgação da técnica (33, 34).

A escolha de soluções irrigantes e medicamentos deve ser feita com base na sua eficácia antimicrobiana e com o mínimo de danos para as células pluripotenciais e fatores de crescimento presentes no microambiente. Desta forma, mais estudos são necessários no intuito de investigar e elucidar a correta ação das medicações intracanal sobre as células presentes no interior do conduto radicular e região apical.

## CONCLUSÃO

Pôde-se concluir que as pastas triantibiótica e biantibiótica apresentaram efeito inibitório frente ao micro-organismo *E. faecalis*. Ambas foram mais eficazes do que a pasta de hidróxido de cálcio e a amoxicilina contra este micro-organismo. Assim, a pasta biantibiótica em casos específicos pode ser considerada um substituto antibacteriano eficaz e comparável à pasta triantibiótica e pasta de hidróxido de cálcio. Portanto a sua utilização como medicação intracanal em dentes com rizogênese incompleta, pode ser uma alternativa adequada de tratamento. Outros estudos, compreendendo ensaios clínicos, são necessários para observar o efeito das referidas pastas sobre a estrutura dental e no combate a formação do biofilme *in situ*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Mickel AK, Nguyen TH, Chogle S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. J Endod 2003;29:257-8.
2. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. Dent Clin North Am 2010;54:313-24.
3. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. Int Endod J 1996;29:125-30.

4. 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.
5. Akgun OM, Altun C, Guven G. Use of triple antibiotic paste as a disinfectant for a traumatized immature tooth with a periapical lesion: a case report. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:e62-5.
6. 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.
7. Khoshkhounejad M, Shokouhinejad N, Pirmoazen S. Regenerative Endodontic Treatment: Report of Two Cases with Different Clinical Management and Outcomes. *J Dent (Tehran)* 2015;12:460-8.
8. Cotti E, Mereu M, Lusso D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod* 2008;34:611-6.
9. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196-200.
10. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod* 2013;39:138-44.
11. Haapasalo M, Orstavik D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. *J Dent Res* 1987;66:1375-9.
12. Sigusch BW, Kranz S, Klein S, Völpel A, Harazim S, Sanchez S, et al. Colonization of *Enterococcus faecalis* in a new SiO/SiO(2)-microtube in vitro model system as a function of tubule diameter. *Dent Mater* 2014;30:661-8.
13. Ritter AL, Ritter AV, Murrah V, Sigurdsson A, Trope M. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. *Dent Traumatol* 2004;20:75-84.
14. 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.
15. Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod* 2006;32:1205-13.
16. Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod* 2007;33:377-90.
17. Maroto M, Barbería E, Planells P, Vera V. Treatment of a non-vital immature incisor with mineral trioxide aggregate (MTA). *Dent Traumatol* 2003;19:165-9.

18. Bonte E, Beslot A, Boukpepsi T, Lasfargues JJ. MTA versus Ca(OH)<sub>2</sub> in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. *Clin Oral Investig* 2015;19:1381-8.
19. Giuliani V, Baccetti T, Pace R, Pagavino G. The use of MTA in teeth with necrotic pulps and open apices. *Dent Traumatol* 2002;18:217-21.
20. Bergenholtz G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontol Revy* 1974;25:347-58.
21. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent* 2007;29:47-50.
22. Latham J, Fong H, Jewett A, Johnson JD, Paranjpe A. Disinfection Efficacy of Current Regenerative Endodontic Protocols in Simulated Necrotic Immature Permanent Teeth. *J Endod* 2016; 42:1218-25.
23. Iwaya SI, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001;17:185-7.
24. Siqueira JF, de Uzeda M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. *J Endod* 1997;23:167-9.
25. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013;39:319-26.
26. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod* 2014;40:S46-51.
27. Yassen GH, Vail MM, Chu TG, Platt JA. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. *Int Endod J* 2013;46:688-95.
28. Yassen GH, Chu TM, Eckert G, Platt JA. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. *J Endod* 2013;39:269-73.
29. Zarei M, Afkhami F, Malek Poor Z. Fracture resistance of human root dentin exposed to calcium hydroxide intervisit medication at various time periods: an in vitro study. *Dent Traumatol* 2013;29:156-60.
30. Cook J, Nandakumar R, Fouad AF. Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. *J Endod* 2007;33:690-2.

31. 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;35:1343-9.
32. Penesis VA, Fitzgerald PI, Fayad MI, Wenckus CS, BeGole EA, Johnson BR. Outcome of one-visit and two-visit endodontic treatment of necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial with one-year evaluation. *J Endod* 2008;34:251-7.
33. 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.
34. Maniglia-Ferreira C, de Almeida-Gomes F, Pinto MM, de Sousa Barbosa FT, de Farias Filho DM, Albuquerque NL. In vitro evaluation of the antimicrobial effects of different intracanal medications in necrotic immature teeth. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2016;17:251-5.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

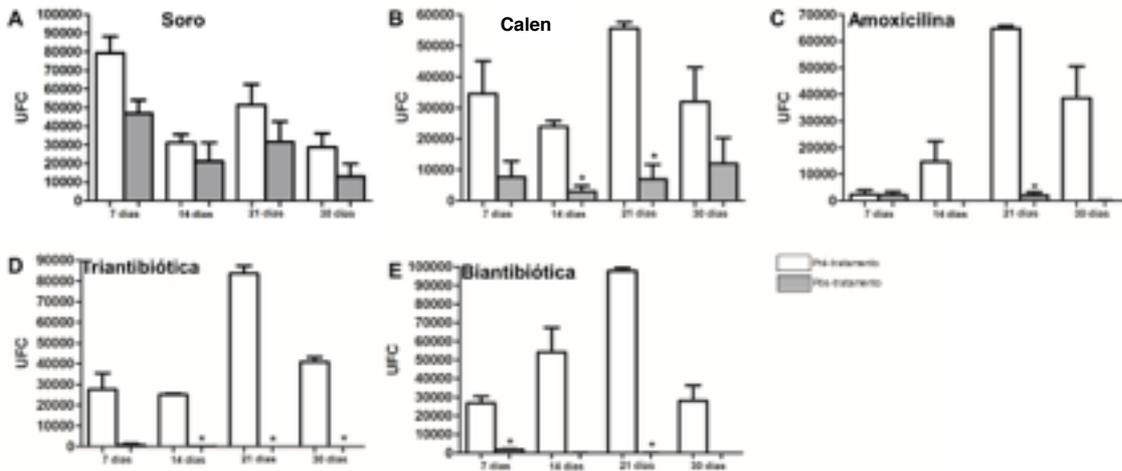
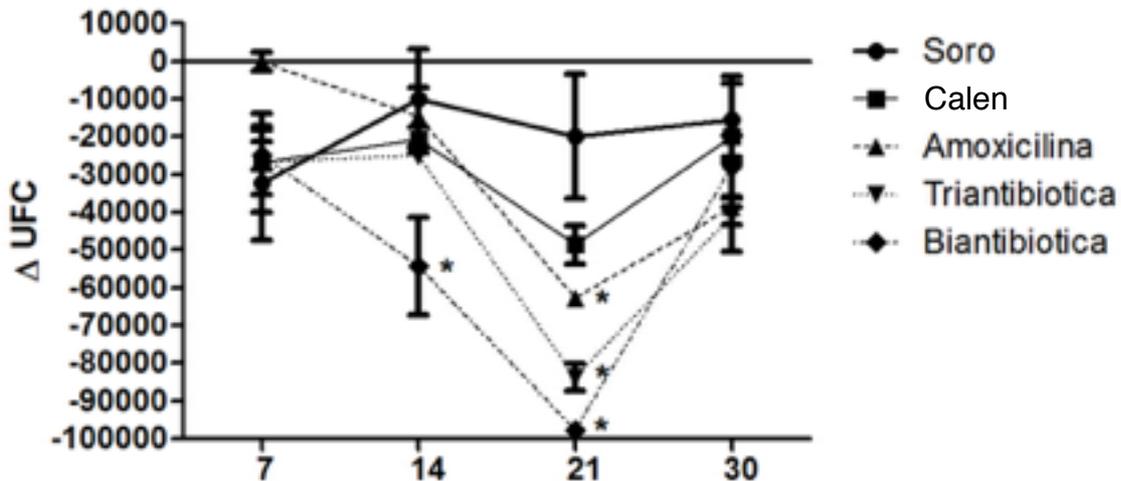


Figura 1: Contagem de UFC. \* $p < 0.05$  versus pré-tratamento no mesmo dia, teste t pareado. Dados expressos em forma de média e erro-padrão.



Dia	Soro	Calen	Amoxicilina	Triantibiótica	Biantibiótica	p-Valor
7	-32333±15189	-26884±13021	-214±2474	-26830±8604	-25010±3812	<0.001
14	-10011±13059	-20878±3504	-14641±7724	-25024±524	-54326±13028*	
21	-20022±16472	-48606±5079	-62783±1180*	-83635±3547*	-97713±1733*	
30	-15627±9693	-19883±15907	-38612±11935	-40886±2296	-28011±8369	

Figura 2: Variação ( $\Delta$  = contagem pós-tratamento - contagem pré-tratamento) na contagem de UFC. \* $p < 0.05$  versus soro no mesmo dia, teste Repetead-Measures-Two-way-ANOVA/Bonferroni. Dados expressos em forma de média e erro-padrão.

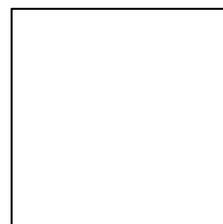
## APÊNDICE A –TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Título da pesquisa: **Avaliação comparativa *in vitro* das pastas antibióticas utilizadas nos procedimentos de revascularização pulpar em um modelo de sistemas de canais radiculares humanos infectados com *Enterococcus faecalis***

Esta pesquisa tem o objetivo de avaliar a eficácia das pastas antibióticas utilizadas como medicação intracanal no tratamento de dentes permanentes com ápice aberto acometidos por trauma dentário. As amostras utilizadas nos experimentos serão dentes que tiveram indicação de extração, conforme diagnóstico e planejamento do profissional responsável pelo atendimento clínico prévio a realização desta pesquisa. Portanto, não existe nenhum risco ao paciente que fará a doação dentes para a pesquisa já que os dentes serão utilizados apenas em testes laboratoriais. A identidade dos doadores dos dentes não será divulgada por qualquer meio e o material recolhido será utilizado unicamente para a presente pesquisa. Ressalta-se que a participação na pesquisa é voluntária, não acarretando nenhuma remuneração e/ ou indenização ao paciente. Este documento será impresso em duas vias, onde uma ficará com o paciente ou responsável e a outra com o profissional responsável pela pesquisa. Qualquer esclarecimento adicional poderá ser obtido com os responsáveis pela pesquisa: Adriana Kelly de Sousa Santiago (85 98832-9352) ou com o comitê de ética em pesquisa da UFC (85 3366 8338).

Eu, \_\_\_\_\_, após ter sido devidamente esclarecido(a) dos objetivos da pesquisa acima mencionada, aceito voluntariamente participar, através da doação aos pesquisadores dos meus dentes que foram extraídos, e concordo que os mesmos sejam utilizados para os fins a que se propõe a pesquisa.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.



\_\_\_\_\_

Testemunha

\_\_\_\_\_

Pesquisadora Responsável

\_\_\_\_\_

Assinatura do Doador(a)

**APÊNDICE B - TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES**

Título da pesquisa: **Avaliação comparativa *in vitro* das pastas antibióticas utilizadas nos procedimentos de revascularização pulpar em um modelo de sistemas de canais radiculares humanos infectados com *Enterococcus faecalis***

Declaro que doei \_\_\_\_\_ (número e tipo de dentes) aos pesquisadores: Dra Adriana Kelly de Sousa Santiago (85 8832-9352) afim de viabilizar a execução da pesquisa acima mencionada. Igualmente declaro que estes dentes foram extraídos por indicação clínica previamente ao conhecimento desta pesquisa e independente da mesma, sendo armazenados em fracos, o que impossibilita a identificação dos indivíduos dos quais foram extraídos. As informações são verdadeiras e de minha responsabilidade, sendo que estou ciente das suas eventuais repercussões cíveis e penais.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Testemunha

\_\_\_\_\_

Pesquisadora Responsável

\_\_\_\_\_

Dentista/CRO/Endereço

## ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMEPE



Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 388/11

Fortaleza, 25 de novembro de 2011

Protocolo COMEPE nº 268/11

**Pesquisador responsável:** Adriana Kelly de Sousa Santiago

**Titulo do Projeto:** "Avaliação clínica, radiográfica e microbiológica do tratamento com pasta antibiótica de dentes permanentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar causada por trauma"

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 17 de novembro de 2011.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Bezerra  
Coordenador do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/UFCE

## Capítulo 2

---

## 4. CAPÍTULO 2

Esta tese está baseada no Artigo 46 do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal do Ceará, que regulamenta o formato alternativo para dissertações de Mestrado e teses de Doutorado e permite a inserção de artigos científicos de autoria ou coautoria do candidato.

Assim sendo, esta tese é composta de dois artigos científicos que serão submetidos ao periódico *Journal of Endodontics*, conforme descrito abaixo:

### **Avaliação clínica e microbiológica de uma série de casos clínicos de dentes permanentes com rizogênese incompleta, necrosados por trauma, tratados com pasta biantibiótica, procedimentos de revascularização e MTA**

BARBOSA AKSS, SOUSA FFO, GONDIM JO, MOREIRA NETO, JJS

ADRIANA KELLY DE SOUSA SANTIAGO BARBOSA<sup>a</sup>, FRANCISCO FÁBIO OLIVEIRA SOUSA<sup>b</sup>, JULIANA OLIVEIRA GONDIM<sup>c</sup>, JOSÉ JEOVÁ SIBRA MOREIRA NETO<sup>d</sup>

<sup>a</sup> Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>b</sup>PhD, Pós-Doutorando, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>c</sup> PhD, Professor Adjunto, Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

<sup>d</sup> PhD, Professor Associado, Departamento de Clínica Odontológica, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brasil.

### **INFORMAÇÃO DOS AUTORES**

Adriana Kelly de Sousa Santiago Barbosa

e-mail: adrianaodontologiaufc@gmail.com

Francisco Fábio Oliveira Sousa

e-mail: sousa.ffe@gmail.com

Juliana Oliveira Gondim

e-mail: jujukondim@yahoo.com.br

José Jeová Sibra Moreira Neto

e-mail: jeova@ufc.com

### **Autor de Correspondência**

Adriana Kelly de Sousa Santiago Barbosa

e-mail: adrianaodontologiaufc@gmail.com

telefone: (85) 988329352

### **RESUMO**

**INTRODUÇÃO:** O intuito do presente trabalho foi realizar uma avaliação clínica e microbiológica da desinfecção de canais radiculares de dentes permanentes humanos imaturos uniradiculares utilizando a técnica de revascularização, pasta biantibiótica e MTA. Para isso foram selecionados pacientes que apresentaram dentes permanentes com necrose pulpar causada por trauma e rizogênese incompleta.

**METODOLOGIA:** Os pacientes foram submetidos aos procedimentos clínicos da técnica de revascularização que utiliza hipoclorito de sódio e pasta biantibiótica para desinfecção do canal radicular e MTA como material biocompatível para vedamento do terço cervical. No estudo clínico os parâmetros de sucesso foram a presença de desenvolvimento radicular, fechamento apical, espessamento das paredes dentinárias e ausência de lesão periapical, através da realização de radiografi-

as periapicais e tomografias computadorizadas, bem como observar a ausência de sinais e sintomas clínicos como dor, fistula, mobilidade e alteração de cor.

**RESULTADOS:** Dos 14 pacientes tratados, 7 foram do sexo masculino (50%) e 7 do sexo feminino (50%), com idade variando entre 6 e 14 anos. Os dentes foram afetados por luxação lateral (73,3%) e os outros (26,7%) dos casos de trauma foram avulsão, intrusão, extrusão e subluxação, associados ou não à fratura coronária sem exposição pulpar. A percentagem de alteração do diâmetro apical após 3 meses foi de 20% e aumentou para 80% em 12 meses, com 93%, ou seja, 14 dos 15 dentes tratados apresentando fechamento apical completo. Em relação a análise microbiológica do estudo, o objetivo foi avaliar a eficácia de ação da pasta biantibiótica através de comprovação microbiológica em coletas realizadas após acesso e abertura dental (C1), após irrigação com hipoclorito de sódio 2,5% (C2) e ao final de 30 dias de uso da pasta antibiótica intracanal (C3). O intuito das coletas foi verificar a presença de micro-organismos – MO's no interior dos condutos radiculares, bem como sua identificação através da realização de reação em cadeia da polimerase - PCR. Dos 14 dentes em que foram realizadas culturas bacterianas nas três coletas observou-se que houve redução significativa do número de UFC da coleta 1 ( $27.1 \pm 2.5$ ) para a coleta 2 ( $9.8 \pm 1.2$ ) e desta para a coleta 3 ( $1.3 \pm 0.5$ ) ( $p < 0.001$ ). Pode-se observar também, que houve redução significativa no número de amostras que apresentaram nos testes de PCR as bandas de DNA para o primer universal 16s da coleta 1 ( $n=15$ , 100,0%) para a coleta 3 ( $n=3$ , 20,0%) ( $p < 0.001$ ) e de DNA da bactéria *E. faecalis* da coleta 1 ( $n=5$ , 33,3%) para as coletas 2 e 3 ( $n=0$ , 0,0%) ( $p=0.004$ ). Nenhuma amostra apresentou DNA da bactéria *P. gingivalis* em nenhum dos momentos de coleta ( $p=1.000$ ).

**CONCLUSÃO:** Desta forma, conclui-se que os dentes tratados mostraram resolução dos sinais e sintomas clínicos e de radiolucência periapicais no período de acompanhamento, assim como, aumento no comprimento radicular, na espessura da parede de raiz e no fechamento apical no período de acompanhamento.

**Palavras-chaves:** Apexificação, endodontia, polpa dentária, antibacterianos, tratamento do canal radicular, traumatismos dentários.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** The aim of the present study was to evaluate *in vitro* the disinfection of the radicular canals of single-rooted human teeth using the revascularization technique, double antimicrobial paste, and mineral trioxide aggregate (MTA). We selected patients who presented necrosed permanent teeth due to trauma and incomplete rhizogenesis.

**METHODOLOGY:** They underwent the clinical procedure of the revascularization technique that uses sodium hypochlorite solution and double antimicrobial paste to disinfect the root canal and MTA as biocompatible material to seal the tooth cervical third. In the clinical study, we considered as parameters of success the complete rhizogenesis, apex closing, dentinary wall thickening, and periapical lesion absence through periapical radiographic analysis and CT scans, as well as observing the absence of signals and symptoms such as pain, sinus tract, mobility, and color alteration.

**RESULTS:** 14 patients were treated, 7 male subjects (50%) and 7 female subjects (50%) whose age ranged from 6-14 years old. Most part of the teeth was affected by lateral luxation (73.3%) and the other cases of dental trauma were avulsion, intrusion, extrusion, and subluxation associated or not with crown fracture without pulp exposition. The percentage of apex diameter alteration after 3 months was 20% and rose to 80% in 12 months, reaching 93%. In other words, 14 out of 15 treated teeth presented complete apex closing until the last follow-up examination. Regarding the *in vitro* study, our purpose was to evaluate the efficacy of the double antimicrobial paste through microbiological evidence in samples collected after the endodontic access (collection 1), after sodium hypochlorite (2.5%) irrigation (collection 2) and at the end of a 30-day period of use of the double antimicrobial paste in the root canal (collection 3). The purpose here was to verify the presence of microorganisms in the root canals and identify them through the polymerase chain reaction (PCR). In the 14 teeth from which bacterial samples were collected, it occurred a significant reduction in the colony forming unit (CFU) numbers at the collection 1 ( $27.1 \pm 2.5$ ) to the collection 2 ( $9.8 \pm 1.2$ ), and from this one to the collection 3 ( $1.3 \pm 0.5$ ) ( $p < 0.001$ ). It can be also observed that there was a significant reduction in the number of samples that presented DNA bands for the universal 16 s primer from the collection 1 ( $n=15$ , 100.0%) to the collection 3 ( $n=3$ , 20.0%) ( $p < 0.001$ ) and *E. faecalis* DNA from the collection 1 ( $n=5$ , 33.3%) to the collections 2 and 3 ( $n=0$ , 0.0%)

( $p=0.004$ ). No sample presented the *P. gingivalis* bacterial DNA at any collection moment ( $p=1.000$ ).

**CONCLUSION:** It can be concluded of the treated teeth presented clinical and radiographic resolution. They also showed root length increase, root wall thickening, and apex closing in the follow-up period.

**Key words** apexification, endodontics, dental pulp, anti-bacterial agents, root canal therapy, tooth injuries.

## INTRODUÇÃO

Apicificação é definido como um método para induzir a formação de uma barreira calcificada ou a continuação do desenvolvimento apical em uma raiz incompleta e com um ápice aberto em dentes com necrose pulpar. Esta técnica tem sido tradicionalmente utilizada para tratar dentes com rizogênese incompleta, pois nestes casos os resultados do tratamento da necrose pulpar e periodontite apical são significativamente menos previsíveis (1,2). Infelizmente, estes tratamentos proporcionam pouco ou nenhum benefício na promoção do desenvolvimento contínuo da raiz. Já os procedimentos endodônticos regenerativos têm surgido como uma importante alternativa no tratamento de dentes com prognóstico questionável, devido as paredes dentinárias frágeis e finas (3,4).

Estes procedimentos dependem fortemente da anti-sepsia do sistema de canais radiculares. Tradicionalmente, os irrigantes e medicamentos tem sido escolhidos por seu máximo efeito antimicrobiano sem considerar seus efeitos sobre as células-tronco e células mesênquimais da papila apical (1,5, 6).

Os procedimentos de Endodontia regenerativa (REPs) têm surgido como uma alternativa de tratamento para estes dentes que, além de cura da periodontite apical, tem por objetivo promover as funções fisiológicas normais da polpa. Porém, o sucesso clinico pode ser considerado apenas com o desenvolvimento radicular e ausência de dor ou patologias periapicais, sem levar em consideração o reestabelecimento da nocicepção pulpar. No entanto, esta abordagem mais tradicional simplesmente busca restaurar a integridade estrutural, função e estética do dente (7,8).

Em dentes com rizogênese incompleta, algumas etapas da terapia endodôntica são dificultadas, como a definição do limite apical e o travamento do cone, possibilitando o extravasamento do material para os tecidos periodontais. Além disso, as raízes dentárias neste estágio apresentam-se com paredes finas e frágeis (9). Estes canais com paredes dentinárias frágeis e comprometidas representam uma contra-indicação para a instrumentação mecânica. A utilização do mineral trióxido agregado (MTA) tem sido uma modalidade alternativa de tratamento em dentes necrosadas imaturos. Além do MTA, outros agentes utilizados no tratamento dos canais radiculares durante a técnica de revascularização são basicamente o hipoclorito de sódio como agente irrigante e uma pasta triantibiótica, que é uma mistura de partes iguais de metronidazol, ciprofloxacino e minociclina (10). A utilização da pasta triantibiótica tem demonstrado ser muito eficaz contra os patógenos comumente encontrados no interior do sistema de canais radiculares. Por outro lado, a coloração da dentina pela minociclina, um derivado da tetraciclina, durante a regeneração dos tecidos tem sido relatada (10,11). Deste modo, sugere-se a eliminação da minociclina, mantendo apenas metronidazol e ciprofloxacino, portanto uma pasta biantibiótica. Desta forma, a revascularização pulpar pode ser considerada uma alternativa promissora para os dentes permanentes com ápice aberto necrosados, cujo resultado depende da eliminação microbiana porque a reparação apical não vai acontecer na presença de tecidos infectados (12,13).

De acordo com Andreassen (14), os dentes imaturos são menos propensos a desenvolver necrose pulpar após uma lesão traumática. Portanto, é imperativo realizar todos os testes apropriados antes do início do tratamento endodôntico do dente imaturo. O clínico deve estar consciente de que mudança de cor, resposta negativa ao teste de sensibilidade pulpar e presença de radiolusência apical radiográfica, podem ser seguidos de reparação celular, especialmente dada a propensão do dente com rizogênese incompleta para a revascularização da polpa (15,16).

Mais pesquisas são necessárias para compreender os processos celulares básicos envolvidos, incluindo o tipo de batente apical formado, a fonte e subsequente recrutamento de células-tronco e as moléculas de sinalização corretas para induzir as respostas moleculares necessárias para o desenvolvimento do tecido, maturação e neovascularização. Bem como o tipo de bactérias presentes no interior dos condutos e quais os melhores materiais irrigadores e medicação intracanal para que haja maior eliminação dos micro-organismos e assim o sucesso clínico possa ser garantido.

Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar uma avaliação clínica e microbiológica do tratamento de pacientes que apresentaram dentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar causados por trauma e foram tratados com a técnica de revascularização, bem como, avaliar a redução da micro-

biota intracanal com uso da pasta biantibiótica e identificar a presença das bactérias *E. faecalis* e *P. gingivalis* no interior dos condutos radiculares.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### ***Delineamento do Estudo Clínico***

Trata-se de um estudo experimental prospectivo longitudinal intervencional de série de casos, consistindo de procedimentos clínicos e laboratoriais. Foram selecionados a participar deste estudo pacientes, que se apresentaram à Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (UFC), com no mínimo, um dente permanente imaturo necrosado devido a trauma, durante o período de junho de 2011 a setembro de 2015. O dente foi considerado necrosado quando se observou pelo menos dois dos seguintes critérios: alteração de cor coronária, presença de infecção seja através de fístula, lesão periapical e/ ou reabsorção radicular interna ou externa, dor relatada pelo paciente ou ausência de resposta ao teste de sensibilidade. Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, presumivelmente saudáveis, que não foram submetidos à antibioticoterapia nos 3 meses antecedentes ao tratamento. Os 15 pacientes apresentavam pelo menos um dente permanente traumatizado, com formação incompleta da raiz e ausência de cárie e de tratamento/intervenção endodôntica no mesmo. A confirmação do diagnóstico de necrose pulpar foi realizada através de exames clínico e radiográfico.

Os pacientes que, no decorrer do tratamento, fizeram uso de antibiótico, perderam o selamento coronário temporário entre as sessões do tratamento, sofreram novo trauma envolvendo o dente do estudo e ou desistiram da pesquisa foram retirados do estudo.

Este estudo clínico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos sob o número 268/2011 (Anexo 1) e todos os pais/responsáveis e pacientes selecionados foram esclarecidos quanto à pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

### ***Procedimentos clínicos***

Todos os procedimentos de coleta do material clínico foram executados por um único examinador, sendo iniciados após um período de treinamento com intuito de adequação da técnica.

Os procedimentos de coleta foram baseados no estudo realizado por Manzur et al. (17) com modificações no tocante à solução irrigadora utilizada, que no presente estudo foi o hipoclorito

de sódio à 2,5% e quanto ao meio de transporte e armazenamento das amostras coletadas que foi utilizado 1,5 ml de VMGA III (Viability Medium, Göteborg, Anaerobically prepared).

Inicialmente, foi realizada a antissepsia intra-oral com digluconato de clorexidina 0.12 % (Periogard® - Colgate – Palmolive) através da realização de bochecho por 1 minuto, anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2 % com 1:100000 de adrenalina, seguido pelo isolamento absoluto do campo operatório e antissepsia deste com uma pelota de algodão embebida em digluconato de clorexidina a 2 % (Clorhexidina<sup>s</sup> - FGM). Para realizar o acesso cirúrgico e o preparo das paredes cavitárias foram utilizadas, respectivamente, pontas diamantadas esféricas em alta rotação, com abundante refrigeração, e brocas Batt em baixa rotação. Após a realização do acesso, foi colocada uma pelota de algodão estéril na embocadura do canal, com o intuito de não permitir o contato do produto com a câmara pulpar do dente, e a desinfecção do campo operatório com clorexidina 2 % foi repetida. Imediatamente após esses procedimentos, foi realizada a primeira coleta (C1) dos micro-organismos existentes no canal radicular do dente permanente imaturo necrosado pós-trauma. Esta foi efetuada com o auxílio de pontas de papel absorvente estéreis #40 (Dentsply). As pontas de papel foram introduzidas no interior do canal até 1mm aquém do limite do ápice radicular. Em seguida foram introduzidas uma sequência de 03 pontas que permaneceram no interior do canal por aproximadamente 01 minuto, sendo então removidas e colocadas no mesmo tubo tipo eppendorf, contendo 1,5 ml de VMGA III.

Após esta primeira coleta, o canal radicular foi abundantemente irrigado com 150mL de hipoclorito de sódio a 2,5 %, durante 10 minutos, através de irrigação com seringa estéril e sucção. Porém, nenhum preparo biomecânico foi realizado para que não houvesse fragilização das paredes dentinárias. Após isso foi realizada uma segunda coleta microbiológica (C2), semelhante à C1. Subsequentemente, o canal radicular foi preenchido completamente com uma medicação intra-canal, que se constituiu de uma pasta biantibiótica à base de metronidazol 400mg e ciprofloxacino 250mg, comercialmente vendidos, utilizando-se de solução fisiológica 0,9% como veículo. Esta pasta foi manipulada no momento de ser introduzida no canal, utilizando-se proporções iguais dos dois antibióticos e misturando-se ao soro até obter uma consistência pastosa firme. A pasta foi introduzida no canal com espiral lentulo inserida até metade do comprimento radicular. A embocadura do canal foi protegida com uma pelota de algodão estéril e a câmara pulpar vedada com um cimento de ionômero de vidro, CIV, ativado quimicamente (Vidrion R – S.S.White Artigos Dentários Ltda-Rio de Janeiro-RJ). As amostras foram transportadas para o laboratório de Microbiologia da UFC após o término do procedimento, cerca de 30 minutos após a coleta.

Em uma segunda sessão de atendimento clínico, após 30 dias, a medicação intra-canal foi removida, sob isolamento absoluto, através de irrigação abundante com solução fisiológica 0,9%. Neste momento foi realizada a terceira coleta (C3), similar às anteriores. Logo após a coleta, foi utilizado uma lima endodôntica K-File #40 (Dentsply) para estimular o sangramento apical intencional até que todo o canal fosse preenchido com sangue. Após a formação do coágulo, observado visualmente, MTA branco (Angelus) foi inserido no terço cervical através de condensação com condensadores tipo Paiva e um algodão umedecido em água destilada estéril foi colocado sobre o material para que este adquira presa mais rapidamente, promovendo assim o vedamento cervical. Após isso a câmara pulpar foi novamente vedada com um cimento de ionômero de vidro. Após um mês de acompanhamento, o paciente retornou para realização de restauração definitiva com resina composta. As sessões subseqüentes foram realizadas com 1mês, 3meses, 6meses e anualmente, de acordo com a primeira consulta de atendimento. Nestas sessões o paciente retornou para realização de tomografias e/ou radiografias periapicais para avaliação de desenvolvimento radicular, fechamento apical e ausência de patologias periapicais. Também foram realizadas fotografias digitais para observar a presença de possíveis alterações de cor coronária.

#### ***Processamento das amostras***

Os *ependorf* contendo as amostras em VMGA III, contendo pérolas de vidro, foram agitados em Vortex e diluídos 5 vezes em uma proporção de 1/10 diluição e posteriormente, 20uL das amostras dos tubos foram transferidas para placas de Petri contendo BHI Ágar sangue (Brain Hearth Infusion) enriquecido com 5% de sangue de carneiro, através da técnica da gota, onde foram semeadas em triplicata. O sistema utilizado para o cultivo das bactérias anaeróbias foi a técnica com câmara de anaerobiose, através da utilização do catalisador (ANAEROBAC, Probac do Brasil, Produtos Bacteriológicos Ltda.) As placas foram então colocadas na câmara juntamente com o catalisador e o gerador de anaerobiose, que foram levadas à estufa e incubadas a 35°C por 7 dias. Assim buscamos promover o crescimento em meios de cultura das seguintes bactérias: *Porphyromonas gengivalis* e *Enterococcus faecalis*.

O número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) foi utilizado na determinação da quantidade de bactérias presentes na amostra original, segundo o cálculo: número de UFC na placa x índice de diluição da amostra = número de bactérias/ ml. Os *ependorf* contendo as amostras foram armazenados a -80°C para posteriormente serem utilizados para a identificação das bactérias

presentes nos canais necrosados por trauma através da reação de polimerase em cadeia (PCR) do tipo convencional. Esse teste tem como objetivo detectar, a presença ou ausência das seguintes bactérias: bactérias anaeróbias estritas, como os Bacilos do Pigmento Negro, dentre eles, especificamente, a *Porphyromonas gingivalis* e uma anaeróbia facultativa o *Enterococcus faecalis*. Para realização do PCR fez-se necessário a obtenção do DNA bacteriológico das amostras coletadas em C1, C2 e C3.

Realizou-se a extração do DNA de todas as amostras coletadas, utilizando a matriz de extração de DNA (DNAzol® Reagent (Invitrogen) e após a extração foi realizado o PCR do tipo convencional para avaliar a presença das espécies bacterianas selecionadas. A seqüência dos *primers* específicos para *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* e para um *primer* universal foram obtidos a partir do estudo de Cogulu et al. (18). Após o preparo dos reagentes para o PCR foi realizado o ciclo corretamente de acordo com o protocolo adotado pelo mesmo autor e pertinente a cada bactéria. Após termociclagem, os produtos amplificados foram revelados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5x através de eletroforese imediata e então observou-se a presença das bandas de DNA presentes no gel de agarose no aparelho de transiluminescência e anotado os resultados no mapa.

A distribuição, de cada uma das variáveis do estudo, se comporta como uma curva normal, verificado pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, autorizando o uso de testes paramétricos. A análise estatística foi realizada através da análise do número de Unidades Formadoras de colônias (UFC) em cada coleta e da presença de bandas de DNA em cada coleta para o primer universal 16S, e para as bactérias *E. faecalis* e *P. gingivalis*. Os dados foram analisados por meio do teste Repetead-Measures-Two-way-ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni e expressos em forma de média e erro-padrão, além do teste exato de *Fisher*.

Cabe ressaltar que todo o experimento foi realizado em condições assépticas. O meio de cultura, a água destilada e o instrumental utilizado foram esterilizados em autoclave a 121° C, durante 15 minutos. Os dados obtidos a partir da análise dos casos foram analisados de forma descritiva, observando-se o grau de desenvolvimento radicular e fechamento apical através das radiografias periapicais e tomografias computadorizadas, bem como ausência de dor, pigmentação coronária e lesão periapical. Os resultados laboratoriais foram analisados através da contagem número de UFC nas três coletas e observando a presença ou ausência das bactérias pesquisadas de acordo com a PCR e Eletroforese realizadas.

## RESULTADOS

Este estudo de série de casos analisou os resultados clínicos e microbiológicos do tratamento endodôntico realizado em dentes permanentes imaturos necrosadas por trauma e tratados utilizando a técnica de revascularização, pasta biantibiótica como medicação intracanal e *plug* cervical de MTA. O estudo constou de 14 pacientes e um total de 15 dentes tratados com um tempo de acompanhamento médio de 24 meses e uma taxa de sucesso de 93%. Para avaliar o sucesso clínico foram analisados os seguintes fatores: fechamento apical, espessamento e/ou aumento do comprimento das paredes radiculares, ausência de lesão periapical ou apresentar sinais de cura da mesma, ausência de fístula e dor, ausência de pigmentação coronária e ausência de qualquer outra patologia que prejudicasse a função do dente no arco, como reabsorções radiculares, anquilose ou mobilidade dentária.

De acordo com a tabela 1, dos 14 pacientes tratados, 7 foram do sexo masculino (50%) e 7 do sexo feminino (50%), com idade variando entre 6 e 14 anos. 11 dentes foram afetados por luxação lateral (73,3%) e os outros 4 casos de trauma foram avulsão, intrusão, extrusão e por último subluxação associados ou não à fratura coronária sem exposição pulpar. De todos os dentes tratados, 14 dentes (93%) apresentaram resolução dos sinais e sintomas clínicos e radiolucência periapicais no período de acompanhamento, bem como, maior aumento no comprimento radicular, espessura da parede da raiz e fechamento apical. Apenas em um caso, o dente ainda não apresentou total fechamento apical, pois em alguns casos o fechamento apical pode ocorrer somente após 12 meses. Como este dente apresenta apenas 12 meses de acompanhamento e dentro deste período não apresentou fechamento apical completo, não foi classificado como sucesso clínico.

O acompanhamento clínico em 6 meses mostrou que todos os pacientes estavam sem sintomas clínicos reportáveis e ausência de qualquer formação de fístula. Radiograficamente, houve uma acentuada diferença na reparação, principalmente no que diz respeito a cicatrização da lesão periapical, ao fechamento apical e espessamento da parede dentinária radicular. A percentagem de alteração do diâmetro apical após 3 meses foi de 20% e aumentou para 80% em 12 meses, com 93%, ou seja, 14 dos 15 dentes tratados apresentando fechamento apical completo até a última consulta de acompanhamento registrada.

A percentagem de alteração no espessamento da parede dentária radicular em 3 meses foi de 7% e aumentou para 46,6% em 12 meses. A descoloração da coroa foi observada em apenas 2 ca-

sos, porém, ocorreu de forma temporária devido a presença de MTA no interior da câmara pulpar. Após remoção do MTA que ficou retido na região coronária, limpeza da câmara pulpar e restauração definitiva com resina composta a coloração normal da coroa foi reestabelecida.

A figura 1 mostra imagens radiográficas e tomográficas dos casos clínicos antes do início do tratamento e após 12 a 48 meses de acompanhamento A, B, C e D. Nelas podemos observar as finas paredes radiculares e o ápice ainda aberto (A, B e D) e a presença de lesão periapical extensa (C). Podemos observar o fechamento apical, aumento do comprimento radicular e espessamento das raízes, bem como a cicatrização da lesão periapical, comparativamente ao seu respectivo caso inicial. Nas imagens E e F da figura 1 observamos fotografias clínicas após 36 meses de acompanhamento de dois dos casos, mostrando sucesso clínico com ausência de sinais de doença periapical e ausência de alteração de cor da coroa dos dentes 21 em E e 11 em F. Nos dentes em que houve além do trauma, ocorrência de fratura coronária, foi realizada restauração estética da coroa em resina composta.

Foram realizadas culturas bacterianas das três coletas, de 14 dos 15 dentes tratados e de acordo com a figura 2 observou-se que houve redução significativa do número de UFC da coleta 1 para a coleta 2 e desta para a coleta 3 ( $p < 0.001$ ). Assim, pode-se observar que o efeito da solução irrigadora, bem como da medicação intracanal foi significativa e esta eliminação dos micro-organismos presente no sistema de canais radiculares foi imprescindível para a obtenção do sucesso clínico. Em relação as análises de PCR, a tabela 2 mostra que houve redução significativa no número de amostras que apresentaram nos testes de PCR as bandas de DNA para o primer universal 16s da coleta 1 (100,0%) para a coleta 3 (20,0%) ( $p < 0.001$ ) e de DNA da bactéria *E. faecalis* da coleta 1 ( $n=5$ , 33.3%) para as coletas 2 e 3 ( $n=0$ , 0.0%) ( $p=0.004$ ). Nenhuma amostra apresentou DNA da bactéria *P. gingivalis* em nenhum dos momentos de coleta ( $p=1.000$ ).

## DISCUSSÃO

Estudos revelaram que 30% das crianças são afetadas por um traumatismo dentário, com a maioria ocorrendo antes da formação completa da raiz (19,20). Antes do início do tratamento endodôntico, uma avaliação cuidadosa, clínica e radiográfica é essencial. O clínico deve estar consciente de que, se possível, todos os esforços devem ser feitos para preservar a integridade do dente incompletamente desenvolvido. Como tal, o tipo de trauma sobre esse dente desempenha um papel

essencial na formulação de um plano de tratamento. Lesões por avulsão, fraturas e luxação têm impactos muito diferentes, tanto a polpa e ligamento periodontal e, portanto, devem ser considerados individualmente.

No presente estudo, os pacientes foram acompanhados por períodos de tempo variável e somente quando observou-se mais de dois sinais de necrose pulpar é que o tratamento endodôntico foi iniciado.

A perda de um dente permanente imaturo em pacientes jovens com dentadura mista pode ser devastador, levando à perda de função, má oclusão e desenvolvimento maxilofacial inadequado, além do caráter social e psicológico envolvido. Estes dentes têm sido tradicionalmente tratados com procedimentos de apicificação, utilizando quer a longo prazo o tratamento de hidróxido de cálcio (9,11) ou a colocação de um tampão imediato de agregado trióxido mineral (MTA) apical (12). Embora esses tratamentos muitas vezes resultem na resolução dos sinais e sintomas clínicos de patologia apicais, eles oferecem pouco ou nenhum benefício para o desenvolvimento contínuo das raízes (11,12).

Um dente com rizogênese incompleta, necrose pulpar e patologia periapical impõe uma grande dificuldade para o endodontista. Opções de tratamento endodôntico de tais dentes consistem em procedimentos de apicificação com formação de barreiras apicais ou utilização de diferentes técnicas de revascularização, através de sangramento apical e preenchimento do canal com sangue ou utilizando plasma rico em plaquetas (PRP). Todas estas técnicas tem por finalidade dar continuidade a formação radicular e fechamento apical, permitindo assim o maior sucesso clínico.

Andreasen et al. (14) relataram que a longo prazo o hidróxido de cálcio poderia aumentar o risco de fratura da raiz, com a hipótese de que o pH elevado tem um efeito prejudicial sobre o suporte orgânico, causando desnaturação e dissolução de proteínas que servem de suporte na formação da dentina. Cvek (21) relatou uma alta incidência de fraturas (especificamente na porção cervical da raiz) no dente com rizogênese incompleta a longo prazo. Desta forma, os procedimentos de revascularização têm sido utilizados para o tratamento de dentes permanentes imaturos com periodontite apical. Estes são capazes de incentivar o desenvolvimento contínuo das raízes e o espessamento das paredes do canal.

O tratamento de um canal vazio com uma estratégia regenerativa oferece um verdadeiro desafio. Um dos maiores problemas identificados em diversas pesquisas foi que as únicas fontes locais possíveis de células viáveis podem surgir através da indução de sangramento no espaço do canal radicular. Isto significa que estas células foram derivadas de células circulantes, cemento, ligamento periodontal ou osso alveolar e, por conseguinte, não são de origem pulpar (22,23). Desta forma,

pôde-se observar que em alguns pacientes do presente estudo o tipo de tecido formado na região periapical não apresentava todas as características de tecido mineralizado, podendo, portanto, ser uma mistura de tecidos como cimento e ligamento periodontal. No entanto, como não houve nenhum sinal ou sintoma clínico de insucesso, os casos continuam sendo acompanhados e caracterizados como sucesso clínico.

Na técnica de revascularização, a criação de um coágulo de sangue serve como uma estrutura de suporte que permite então a estimulação do crescimento celular (24). Como é imperativo que o coágulo permaneça livre de contaminação bacteriana, uma barreira tem de ser colocada e o MTA é geralmente o material de escolha, pois ele serve de barreira mineralizadora. Em alguns casos em que a formação do coágulo é insubstancial, seja por uso de anestésico com vasoconstrictor (25), o uso do plasma rico em plaquetas (PRP) pode ser uma alternativa de sucesso na formação do batente (26). No presente estudo não houve nenhuma dificuldade na formação do coágulo, sendo formado coágulo substancial nos 15 dentes do estudo. Desta forma, PRP poderia ser uma opção somente para os casos clínicos em que pouco ou nenhum sangramento fosse encontrado ao irritar o tecido apical durante a técnica de revascularização. Sendo, portanto, um tratamento alternativo, visto que a formação do coágulo torna o tratamento mais simples, rápido e prático, pois não há necessidade de outra intervenção para coleta de sangue do paciente e confecção do PRP em laboratório.

A Assepsia completa e obturação tridimensional do sistema de canal radicular é essencial para o sucesso endodôntico a longo prazo (27,28). As paredes finas e frágeis de dentina do canal radicular podem não suportar as forças normais de mastigação, o que as torna mais propensas a fratura (28,29). A arquitetura divergente das paredes radiculares e ausência de constrição apical normal do canal radicular tornam difíceis as tarefas de debridamento completo, desinfecção do canal e vedamento apical do material obturador (28-32). Ocasionalmente, o material obturador é inadequado ou expulso além do ápice, sobre os tecidos perirradiculares, podendo ter efeitos nocivos sobre o prognóstico do tratamento endodôntico.

○ MTA é o material de escolha nos casos de revascularização, pois forma um plug cervical sobre o coágulo de sangue, uma vez que é biocompatível e proporciona uma vedação homogênea com estanque imediato a fluidos por formação de um gel coloidal, mesmo na presença de umidade ou de sangue, o qual está presente nestes casos (33-35). No entanto, seus benefícios aos tecidos dentários são superiores a outros materiais, principalmente no que diz respeito indução da migração e proliferação a curto prazo de células estaminais a partir da papila apical (36), justificando seu uso nestas terapias.

Alguns fatores de crescimento tais como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de transformação do crescimento beta-1 (TGF- $\beta$ 1) são conhecidos por terem um efeito forte sobre a diferenciação e / ou proliferação de células estaminais mesenquimais (37). Esses fatores de crescimento parecem particularmente eficazes na promoção da proliferação de células-tronco mesenquimais (38,39). Irrigantes, especialmente hipoclorito de sódio em concentrações elevadas, são conhecidos para desnaturar estes fatores de crescimento derivados da dentina (40). Estes achados sugerem que os diversos fatores de crescimento são suficientes para promover a sobrevivência, a proliferação, e, mais importante, a diferenciação de células estaminais dentárias. Por esse motivo, o uso de hipoclorito de sódio 2,5% foi uma modificação realizada no presente estudo na tentativa de reduzir possíveis danos aos fatores de crescimento e com o intuito de viabilizar a presença destes fatores e da diferenciação de células estaminais dentárias.

Várias populações de células-tronco diferentes da polpa dentária já foram relatados na literatura, incluindo células-tronco da polpa dentária, células-tronco da papila apical e células-tronco de dentes decíduos humanos esfoliados, embora todas elas pareçam ser derivadas das células estaminais mesenquimais (MSC) (41). O recrutamento de MSCs a partir da região apical parece proporcionar um mecanismo eficiente para aumentar localmente o número de células estaminais. Esta ativação pode ocorrer através da vascularização, durante a cicatrização natural da polpa e assim estas células se diferenciam e formam dentina (22,42,43) e ou tecidos periodontais (gengiva, cemento, osso alveolar e ligamento periodontal) (44).

Por esse motivo, o intuito da estimulação através do preparo apical e formação do coágulo não é somente formar uma barreira para a colocação do MTA, mas sim estimular estas células e possibilitar a sua viabilização via canal radicular para então formar os tecidos de reparação. Desta forma, o sucesso pode ser alcançado, independente do tecido cicatricial formado, desde que haja fechamento apical e ausência de qualquer sinal e sintoma clínico como ocorreu com 14, dentre 15 dentes tratados no estudo.

A tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC) foi utilizada na atual pesquisa, juntamente com a radiografia periapical para identificar o grau de desenvolvimento radicular e fechamento apical, bem como observar a extensão da lesão periapical inicial, se presente, e sua cicatrização ao longo das consultas de acompanhamento. A pasta biantibiótica foi eleita como medicação intra-canal para todos os casos, com ação antibacteriana já comprovada e sendo uma boa alternativa no tratamento de dentes anteriores nos quais a pigmentação pelo antibiótico minociclina presente na pasta triantibiótica pode comprometer o sucesso clínico.

O perfil microbiano de dentes imaturos infectados é semelhante à infecção principal dos dentes permanentes. Portanto, as bactérias mais prevalentes detectadas foram *Actinomyces naeslundii* (66,67%), seguido por *Porphyromonas endodontalis*, *Parvimonas micra* e *Fusobacterium nucleatum*, que foram detectados em 33,34% dos canais radiculares (45). Nagata et al. (45) avaliou a composição microbiana de dentes imaturos traumatizadas e a sua redução durante as diferentes fases dos procedimentos de revascularização realizadas com 2 medicamentos intracanal. A maior redução bacteriana foi promovida pelas soluções de irrigação. Os protocolos de revascularização que usaram os medicamentos intracanal testados foram eficientes na redução de bactérias viáveis em dentes imaturos necrosados. Portanto, estes resultados estão em acordo com os resultados encontrados no presente estudo, principalmente, no que diz respeito a maior redução das bactérias do interior dos canais, tanto pela solução irrigadora, quanto pelo uso da pasta biantibiótica.

Porém, diferentemente destas bactérias pesquisadas, optou-se por pesquisar o *E. faecalis*, pois estes são muito comuns em reinfecções de canais radiculares, sendo comumente associadas a presença de lesão periapical e pôde-se confirmar que a bactéria estava presente em todos os casos em que haviam lesão periapical presente. Já a *P. gingivallis*, optou-se por pesquisar esta bactéria devido a grande conexão entre a região do canal radicular e os tecidos periodontais, onde esta é comumente encontrada, principalmente nos casos tratados em que o ápice aberto aumenta essa relação. Entretanto, observou-se que mesmo havendo uma íntima relação entre câmara pulpar e tecidos periodontais, esta bactéria não foi encontrada.

Estudos com grandes grupos e períodos de acompanhamento longos são necessários para avaliar os resultados de revascularização e apicificação no que diz respeito as covariantes mais relevantes para o sucesso clínico. Quanto ao tecido cicatricial formado no canal, pode ser tecido cementóide ou semelhante ao osso bem mineralizado. Porém, as células da papila dentária são precursores de odontoblastos e têm o potencial para se diferenciarem em odontoblastos, cementoblastos e osteoblastos. No entanto, o método usado atualmente para determinar a origem do tecido secretado durante o processo de reparação/regeneração é baseado na identificação de marcadores celulares deixadas por células que foram responsáveis por essa produção de tecidos. A presença destas proteínas em conjunto com outros indicadores do comportamento celular e análise da estrutura do tecido recém-gerado permite a identificação de sua origem.. Isto torna possível distinguir o tecido que é formado a partir de processos de reparação, em vez de processos regeneradores (46). A regeneração de um tecido vital em um espaço de canal vazio, mas infectado gera discussão e muitas vezes é visto com ceticismo acerca do tecido mineral formado ser de origem odontoblástica.

A identificação de componentes bioativos na matriz extracelular da dentina (47) está ajudando a elucidar como alguns dos eventos de sinalização durante a regeneração podem ocorrer. Claramente, o foco sobre estes aspectos será importantes para a o entendimento dos processos de indução da formação dos tecidos no interior do conduto radicular e sua importância na escolha dos tratamentos na prática clínica.

Embora o presente estudo ainda esteja em andamento, pois o acompanhamento dos casos será realizado a longo prazo, os resultados preliminares não levantam dúvidas sobre a capacidade desta técnica para induzir processos de reparação dentro do espaço do canal pulpar. O uso de um tecido biológico para preencher o espaço do canal radicular teve o intuito de evitar as desvantagens de um material sintético, ou seja, a perda do potencial de vedação, toxicidade, etc. Além disso, o tecido biológico tem a enorme vantagem de ser imunocompetente e, assim, ser capaz de se defender de bactérias como um tecido pulpar normal faria. Portanto, a revascularização é uma técnica interessante que permite que o espaço pulpar seja preenchido com tecido vital. Este tecido é diferente do tecido que estava inicialmente presente no canal. Porém, a formação de tecido biológico, seja cimento, osso, ligamento periodontal ou uma mistura destes, juntamente com a ausência de sinais e sintomas clínicos já é considerado um sucesso do tratamento. Por este motivo, a irrigação com hipoclorito de sódio, medicação intracanal com pasta biantibiótica, associada a técnica de revascularização e plug cervical de MTA é um tratamento complexo e completo que leva ao sucesso clínico em apenas duas sessões de tratamento, segundo dados do presente estudo. Sendo as sessões subsequentes somente de acompanhamento e observação, através da realização de fotografias, radiografias e ou tomografias.

O sucesso clínico foi alcançado na atual pesquisa, pois o objetivo do tratamento endodôntico em uma infecção dentária é, primeiro, desinfetar o sistema de canais radiculares e, segundo, evitar a reinfecção ao longo do tempo.

A falta de uso de um protocolo de tratamento padronizado, com regime de desbridamento químico-mecânico, número de consultas clínicas e medicação intra-canal, bem como uma variedade de diferenças na etiologia da doença tratada, como cárie, trauma ou dentes invaginatus faz com que a comparação entre os estudos e escolha da melhor técnica seja dificultada. Clinicamente, indicações claras e contra-indicações ainda não foram determinadas. Além da semântica das definições, muitas perguntas permanecem. A presença de células estaminais em um canal revascularizado foi claramente demonstrada, sugerindo que o recrutamento de células estaminais a partir da papila apical e a sua migração subsequente desempenham um papel crítico na formação deste novo tecido.

No entanto, a origem destas células permanece obscura. Com base nestes pressupostos, sugere-se que as indicações clínicas de tratamento de revascularização ainda deve limitar-se aos dentes com rizogênese incompleta.

Estas observações clínicas suportam a hipótese de que os pacientes com opções de tratamento limitados podem se beneficiar destes procedimentos. Porém, outros estudos, compreendendo ensaios clínicos randomizados são necessários para observar o efeito das referidas técnicas e o grau de sucesso clínico alcançado em cada uma delas. Os pontos principais são a caracterização de populações de células-tronco em polpa dentária e o recrutamento destas células para o tecido após a lesão, além da identificação de moléculas bioativas com propriedades potentes de sinalização nas matrizes extracelulares de dentina e polpa e elaboração de eventos inflamatórios em nível molecular, entre muitos outros avanços excitantes. Claramente, o campo da Endodontia regenerativa está avançando rapidamente. No entanto, ainda temos algum caminho a percorrer antes da Endodontia regenerativa tornar-se difundida na prática clínica do dia-a-dia.

## **CONCLUSÃO**

Pôde-se concluir que os dentes tratados mostraram resolução dos sinais e sintomas clínicos e de radiolucência periapicais, aumento no comprimento radicular, na espessura da parede de raiz e no fechamento apical no período de acompanhamento. Além disso, houve redução significativa do número de UFC na medida em que o protocolo de revascularização foi sendo realizado. Embora o sucesso clínico tenha sido altamente previsível com este procedimento, o fechamento apical é o achado radiográfico mais consistente. Desta forma, o uso da pasta biantibiótica, associada a técnica de revascularização, com uso de hipoclorito de sódio e MTA é um protocolo eficiente na eliminação da infecção e uma alternativa viável e de sucesso para os casos clínicos em que houve necrose pulpar de dentes permanentes imaturos causados por trauma. Essa combinação de medicação e técnica permitiu o desenvolvimento continuado das raízes em dentes com polpas necróticas e não causou problema estético a coroa dentária.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Komabayashi T, Spångberg LS. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. *J Endod* 2008;34:94-8.
2. Trope M. Regenerative potential of dental pulp. *J Endod* 2008;34:S13-7.
3. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am* 2010;54:313-24.
4. Chen X, Bao ZF, Liu Y, Liu M, Jin XQ, Xu XB. Regenerative endodontic treatment of an immature permanent tooth at an early stage of root development: a case report. *J Endod* 2013;39:719-22.
5. Yan M, Wu J, Yu Y, Wang Y, Xie L, Zhang G, et al. Mineral trioxide aggregate promotes the odonto/osteogenic differentiation and dentinogenesis of stem cells from apical papilla via nuclear factor kappa B signaling pathway. *J Endod* 2014;40:640-7.
6. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010;36:536-41.
7. Harlamb SC. Management of incompletely developed teeth requiring root canal treatment. *Aust Dent J* 2016;61:95-106.
8. Lin LM, Ricucci D, Huang GT. Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. *Int Endod J* 2014;47:713-24.
9. Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod* 2006;32:1205-13.
10. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125-30.
11. 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.
12. Floratos SG, Tsatsoulis IN, Kontakiotis EG. Apical barrier formation after incomplete orthograde MTA apical plug placement in teeth with open apex--report of two cases. *Braz Dent J* 2013;24:163-6.
13. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2010;36:400-13.

14. 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.
15. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196-200.
16. Alobaid AS, Cortes LM, Lo J, Nguyen TT, Albert J, Abu-Melha AS, et al. Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study. *J Endod* 2014;40:1063-70.
17. Manzur A, Gonzalez AM, Pozos A, Silva-Herzog D, Friedman S. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. *J Endod* 2007;33:114-8.
18. Cogulu D, Uzel A, Oncag O, Eronat C. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106:443-9.
19. Glendor U. Epidemiology of traumatic dental injuries--a 12 year review of the literature. *Dent Traumatol* 2008;24:603-11.
20. Andreasen JO, Ravn JJ. Epidemiology of traumatic dental injuries to primary and permanent teeth in a Danish population sample. *Int J Oral Surg* 1972;1:235-9.
21. 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;8:45-55.
22. Nuti N, Corallo C, Chan BM, Ferrari M, Gerami-Naini B. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. *Stem Cell Rev* 2016; 12:511-523.
23. Bjørndal L, Darvann T. A light microscopic study of odontoblastic and non-odontoblastic cells involved in tertiary dentinogenesis in well-defined cavitated carious lesions. *Caries Res* 1999;33:50-60.
24. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck CD. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013;39:319-26.
25. 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.
26. Kahler B, Mistry S, Moule A, Ringsmuth AK, Case P, Thomson A, et al. Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. *J Endod* 2014;40:333-8.

27. Güneş B, Aydınbelge HA. Mineral trioxide aggregate apical plug method for the treatment of nonvital immature permanent maxillary incisors: Three case reports. *J Conserv Dent* 2012;15:73-6.
28. Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, Abu-Seida AM. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *J Endod* 2014;40:192-8.
29. Hachmeister DR, Schindler WG, Walker WA, Thomas DD. The sealing ability and retention characteristics of mineral trioxide aggregate in a model of apexification. *J Endod* 2002;28:386-90.
30. Park JB, Lee JH. Use of mineral trioxide aggregate in the open apex of a maxillary first premolar. *J Oral Sci* 2008;50:355-8.
31. Raldi DP, Mello I, Habitante SM, Lage-Marques JL, Coil J. Treatment options for teeth with open apices and apical periodontitis. *J Can Dent Assoc* 2009;75:591-6.
32. Giuliani V, Baccetti T, Pace R, Pagavino G. The use of MTA in teeth with necrotic pulps and open apices. *Dent Traumatol* 2002;18:217-21.
33. Yazdizadeh M, Bouzarjomehri Z, Khalighinejad N, Sadri L. Evaluation of Apical Microleakage in Open Apex Teeth Using MTA Apical Plug in Different Sessions. *ISRN Dent*; 2013:959813.
34. Mente J, Leo M, Panagidis D, Ohle M, Schneider S, Lorenzo Bermejo J, et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate in open apex teeth. *J Endod* 2013;39:20-6.
35. Bogen G, Kuttler S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. *J Endod* 2009;35:777-90.
36. Schneider R, Holland GR, Chiego D, Hu JC, Nör JE, Botero TM. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. *J Endod* 2014;40:931-6.
37. Cassidy N, Fahey M, Prime SS, Smith AJ. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biol* 1997;42:219-23.
38. Ozeki N, Mogi M, Kawai R, Yamaguchi H, Hiyama T, Nakata K, et al. Mouse-induced pluripotent stem cells differentiate into odontoblast-like cells with induction of altered adhesive and migratory phenotype of integrin. *PLoS One* 2013;8:e80026.
39. Smith AJ, Matthews JB, Hall RC. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci* 1998;106:179-84.
40. Zhao S, Sloan AJ, Murray PE, Lumley PJ, Smith AJ. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. *Histochem J* 2000;32:489-94.

41. Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharpe PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:6503-8.
42. Hilkens P, Fanton Y, Martens W, Gervois P, Struys T, Politis C, et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. *Stem Cell Res* 2014;12:778-90.
43. Ema H, Suda T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. *Blood* 2012;120:2174-81
44. Su WT, Pan YJ. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth differentiate toward neural cells in a medium dynamically cultured with Schwann cells in a series of polydimethylsiloxanes scaffolds. *J Neural Eng* 2016;13:046005.
45. Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, et al. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod* 2014;40:778-83.
46. Simon S, Cooper P, Smith A, Picard B, Ifi CN, Berdal A. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. *Int Endod J* 2008;41:781-90.
47. Cooper PR, Holder MJ, Smith AJ. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. *J Endod* 2014;40:S46-51.

## LISTA DE TABELAS E FIGURAS

**Tabela 1:** Distribuição do sucesso clínico do protocolo de revascularização, quanto ao dente envolvido, tempo de acompanhamento e tipo de trauma.

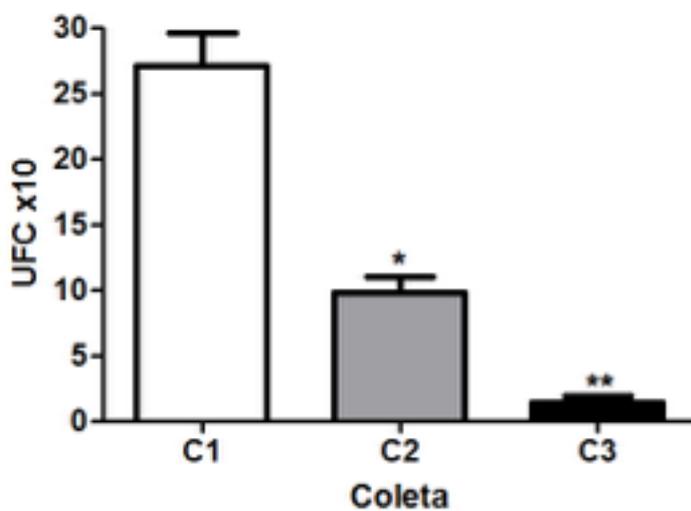
	Dente Envolvido	Tempo de Acompanhamento	Tipo de Trauma	Sucesso Clínico
<b>Paciente 1</b>	<b>Dente 21</b>	48 meses	Luxação Lateral	Sim
<b>Paciente 2</b>	<b>Dente 11</b>	42 meses	Luxação Lateral	Sim
<b>Paciente 3</b>	<b>Dente 21</b>	30 meses	Intrusão	Sim
<b>Paciente 4</b>	<b>Dente11</b>	24 meses	Luxação Lateral e fratura Coronária	Sim
<b>Paciente 5</b>	<b>Dente 11</b>	24 meses	Luxação Lateral e fratura Coronária	Sim
<b>Paciente 6</b>	<b>Dente 11</b>	24 meses	Luxação Lateral	Sim
<b>Paciente 7</b>	<b>Dente 11</b>	24 meses	Luxação Lateral	Sim
<b>Paciente 8</b>	<b>Dente 22</b>	24 meses	Luxação Lateral	Sim
<b>Paciente 9</b>	<b>Dente 11</b>	24 meses	Extrusão	Sim
<b>Paciente 10</b>	<b>Dente 45/11</b>	24 meses	Luxação Lateral	Sim
<b>Paciente 11</b>	<b>Dente 41</b>	24 meses	Luxação Lateral	Sim
<b>Paciente 11</b>	<b>Dente 31</b>	24 meses	Avulsão	Sim
<b>Paciente 12</b>	<b>Dente 21</b>	18 meses	Subluxação e Fratura Coronária	Sim
<b>Paciente 13</b>	<b>Dente 21</b>	12 meses	Luxação Lateral	Não*
<b>Paciente 14</b>	<b>Dente 12</b>	12 meses	Luxação Lateral	Sim

**Tabela 2:** Número de dentes e percentagem de casos em que foram detectados presença de bandas de DNA para o primer universal 16SrRNA e bacterias *Enterococcus faecalis* e *Porfiromonas gingivalis* em cada uma das coletas (C1, C2 e C3) de cada um dos casos clínicos. \* $p < 0.05$  versus C1. Teste Exato de *Fisher*.

	Coleta			p-Valor
	C1	C2	C3	
<b>16SrRNA</b>	15 (100,0%)	11 (73,3%)	3 (20,0%)*	<0,001
<b>E faecalis</b>	5 (33,3%)	0 (0,0%)*	0 (0,0%)*	0,004
<b>P gingivalis</b>	0 (0,0%)	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1,000



**Figura 1:** Imagens radiográficas e tomográficas dos casos clínicos antes do início do tratamento e após 12 a 48 meses de acompanhamento do elemento 11 em A, C e D e do elemento 21 em B. Nas imagens iniciais podemos observar as finas paredes radiculares e o ápice ainda aberto (A) e a presença de lesão periapical extensa (C). Nas imagens de acompanhamento podemos observar o fechamento apical, aumento do comprimento radicular e espessamento das raízes, bem como cicatrização da lesão periapical, comparativamente ao seu respectivo caso inicial. Em E e F observamos fotografias clínicas após 48 meses de acompanhamento de dois dos casos, mostrando sucesso clínico com ausência de sinais de doença periapical e ausência de alteração de cor da coroa dos dentes 21 em E e 11 em F. Paciente 1 (B e E); Paciente 2 (C e F); Paciente 5 (A); Paciente 8 (D).



**Figura 2:** Média do número de Unidades Formadoras de Colônia (UFC) nas coletas 1, 2 e 3 de todos os casos clínicos. Coleta 1 (Inicial); Coleta 2 (Após irrigação com NaOCl) e Coleta 3 (Após uso de pasta biantibiótica por 30 dias). \* $p < 0.05$  versus C1; \*\* $p < 0.05$  versus C2 e C1. Repetead-Measures-ANOVA/Bonferroni (Média $\pm$ EPM).

## APÊNDICE A – FICHA CLÍNICA

Universidade Federal do Ceará

Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem

Centro de Traumatismo Buco-Dentário (CENTRAU)

---

### FICHA CLÍNICA

Nome: \_\_\_\_\_ ( ) F ( ) M

Responsável: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### História médica

1- Está atualmente sob cuidados médicos? ( ) Sim ( )

Não

Em caso afirmativo, por quê? \_\_\_\_\_

2- Possui alguma dessas alterações sistêmicas?

( ) anemia ( ) diabetes ( ) leucemia

( ) alterações hormonais ( ) hepatite ou outro problema de fígado ( ) hemofilia

( ) distúrbio renal ( ) alteração cardíaca ( ) epilepsia, desmaio ou convulsão

( ) outros: \_\_\_\_\_

3- Toma algum medicamento diariamente? ( ) Sim ( ) Não

Em caso afirmativo, qual? \_\_\_\_\_

4- Quando foi a última vez que utilizou um antibiótico? \_\_\_\_\_

5- Tem alergia a alguma substância ou medicamento? ( ) Sim ( ) Não

Em caso afirmativo, qual? \_\_\_\_\_

6- Lesões dentárias anteriores ( ) sim ( ) não Quando? \_\_\_\_\_

7- Dentes lesados \_\_\_\_\_ Tratamentos realizados \_\_\_\_\_

8- Lesão dentária atual \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Hora \_\_\_\_:\_\_\_\_

9- Onde \_\_\_\_\_

10- Como \_\_\_\_\_

11- Tipo de trauma? ( ) luxação ( ) deslocamento lateral ( ) extrusão ( ) intrusão ( ) fratura coronária ( ) fratura radicular

12- Teve cefaléia ou tem agora? ( ) sim ( ) não

13- Teve náusea ou tem agora? ( ) sim ( ) não

14- Ficou inconsciente? ( ) sim ( ) não

15- Pode lembrar-se do que aconteceu antes, durante e após o trauma? ( ) sim ( ) não

16- Teve visão dupla ou limitação do globo ocular? ( ) sim ( ) não

17- Há sinais de fratura no esqueleto facial? ( ) sim ( ) não

18- Houve sangramento nasal ou do conduto auditivo? ( ) sim ( ) não

19- Existe sensibilidade dentária ao frio ou durante a respiração? ( ) sim ( ) não

20- Existe alteração na oclusão? ( ) sim ( ) não

Outras observações

---



---



---

### Exame clínico e radiográfico

Dente	
Presença de fistula	( ) Sim ( ) Não
Lesão periapical	( ) Sim ( ) Não
Reabsorção radicular interna	( ) Sim ( ) Não
Reabsorção radicular externa	( ) Sim ( ) Não
Alteração de cor	( ) Sim ( ) Não
Mobilidade ( ) grau 1 ( ) grau 2 ( ) grau 3	( ) Sim ( ) Não
Sensibilidade	( ) Sim ( ) Não

### Endodontia

Solução irrigadora	
Medicação intracanal	

## Coleta microbiológica

Data	Observações
1ª coleta: / /	
2ª coleta: / /	
3ª coleta: / /	

## Conduta Clínica

Data	Procedimentos realizados

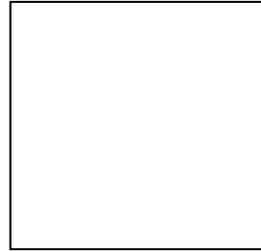
Fortaleza, \_\_\_\_\_, de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_

---

Assinatura da Cirurgiã-dentista

---

Assinatura do responsável



Digital do paciente ou responsável

## APÊNDICE B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos desenvolvendo uma pesquisa chamada “Avaliação clínica, radiografia e microbiológica do tratamento com pasta antibiótica de dentes permanentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar causada por trauma”. Com a mesma, pretendemos melhorar o tratamento do canal de dentes traumatizados com ápice aberto. Assim, gostaríamos de contar com a sua participação ou da criança sob sua responsabilidade, permitindo que a mesma realize o tratamento do canal referente ao dente traumatizado que se encontra necrosado - morto - (após confirmação através de exames clínico e radiográfico) e que, durante o tratamento, sejam coletadas amostras das bactérias que estão presentes no interior do canal do dente.

As amostras serão coletadas colocando-se pontas de papel absorvente dentro do canal e retiradas após 1 minuto, sem causar qualquer desconforto ao paciente. Essas coletas apenas serão feitas três vezes: a primeira e a segunda serão realizadas no primeiro dia de tratamento e a terceira, trinta dias após a primeira visita do paciente (fim do tratamento). Depois de concluído o tratamento, o paciente retornará à clínica de Odontopediatria, na Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, da Universidade Federal do Ceará, local onde todos os procedimentos serão feitos, para a realização de exames de acompanhamento.

Informamos que a pesquisa não trará nenhum risco à criança e que esta poderá desistir de participar da mesma no momento em que decidir, sem que isso lhe acarrete quaisquer penalidades.

Caso também o paciente ou responsável não autorizem a coleta das amostras, o tratamento do canal será devidamente realizado, excluindo-se a fase da coleta.

Ressalta-se que a participação na pesquisa é voluntária, não acarretando nenhuma remuneração e/ ou indenização ao paciente.

Este documento será impresso em duas vias, onde uma ficará com o paciente ou responsável e a outra com o profissional responsável pela pesquisa.

Se necessário, pode entrar em contato com:

Adriana Kelly de Sousa Santiago - Tel.: 3224-5314/ 88329352

Comitê de Ética em Pesquisa da UFC.: 3366-8344

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE OU DO RESPONSÁVEL PELO PARTICIPANTE**

Tendo compreendido perfeitamente tudo que me foi informado sobre minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu DOU O MEU CONSENTIMENTO SEM QUE PARA ISSO EU TENHA SIDO FORÇADO OU OBRIGADO.

Fortaleza, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_

Assinatura ou digital do voluntário

\_\_\_\_\_

Assinatura do responsável pelo  
Estudo

\_\_\_\_\_

Assinatura ou digital do responsável legal  
TCLE

\_\_\_\_\_

Nome do profissional que aplicou o

\_\_\_\_\_

Testemunha

**DADOS DO VOLUNTÁRIO**

Nome \_\_\_\_\_

Endereço \_\_\_\_\_

Telefone \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C - MATERIAIS E MÉTODOS DETALHADOS

### ***Delineamento do Estudo Clínico***

O presente trabalho trata-se de um estudo experimental intervencional de série de casos, consistindo de procedimentos clínicos e laboratoriais.

### ***Seleção dos Pacientes***

Foram selecionados a participar deste estudo pacientes, que se apresentarem a Clínica de Odontopediatria da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará (UFC), com no mínimo, um dente permanente imaturo necrosado devido a trauma, durante o período de junho de 2011 a setembro de 2015.

O dente foi considerado necrosado quando se observou alteração de cor coronária associada à presença de infecção seja através de fístula, lesão periapical e/ ou reabsorção radicular interna ou externa. Foram incluídos no estudo pacientes de ambos os sexos, presumivelmente saudáveis, que não foram submetidos a antibioticoterapia nos 3 meses antecedentes ao tratamento. Os pacientes apresentaram pelo menos um dente permanente traumatizado, com formação incompleta da raiz e confirmação do diagnóstico de necrose pulpar através de exames clínico e radiográfico. Os dentes apresentaram os canais radiculares intactos, ou seja, não foram submetidos a nenhuma intervenção.

Os pacientes que no decorrer do tratamento fizeram uso de antibiótico, perderem o selamento coronário temporário entre as sessões do tratamento e ou desistiram da pesquisa foram retirados do estudo.

Este estudo clínico foi realizado de acordo com as Normas de Pesquisa em Saúde da UFC e do Conselho Nacional de Saúde – Resolução nº 466, de 2012. O protocolo de pesquisa foi submetido à apreciação e avaliação por Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos e aprovado sob o número 268/2011 e todos os pais/responsáveis e pacientes selecionados foram esclarecidos quanto à pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE.

### ***Procedimentos clínicos***

Todos os procedimentos de coleta do material clínico foram executados por um único examinador, sendo iniciados após um período de treinamento com intuito de adequação da técnica.

Os procedimentos de coleta foram baseados no estudo realizado por Manzur *et al.* 2007, com algumas modificações no tocante a solução irrigadora utilizada, que neste estudo foi o hipoclorito de sódio à 2,5%. Foi utilizado 1,5 ml de VMGA (Viability Medium, Göteborg, Anaerobically prepared) como meio de transporte e armazenamento das amostras coletadas.

### **1ª. Sessão**

Inicialmente, foi realizada a antissepsia intra-oral com digluconato de clorexidina 0.12 % (Periogard® - Colgate – Palmolive) através da realização de bochecho por 1 minuto, anestesia local com cloridrato de lidocaína a 2 % com 1:100000 de adrenalina, seguido pelo isolamento absoluto do campo operatório e antissepsia deste com uma pelota de algodão embebida em digluconato de clorexidina a 2 % (Clorhexidina<sup>s</sup> - FGM). Para realizar o acesso cirúrgico e o preparo das paredes cavitárias foram utilizadas, respectivamente, pontas diamantadas esféricas em alta rotação, com abundante refrigeração, e brocas de Batt em baixa rotação. Após a realização do acesso, foi colocada uma pelota de algodão estéril na embocadura do canal, com o intuito de não permitir o contato do produto com a câmara pulpar do dente, e a desinfecção do campo operatório com clorexidina 2 % foi repetida.

Imediatamente após esses procedimentos, foi realizada a primeira coleta (**C1**) dos micro-organismos existentes no canal radicular do dente permanente imaturo necrosado pós-trauma. Esta foi efetuada com o auxílio de pontas de papel absorvente estéreis. As pontas de papel foram introduzidas no interior do canal até 1mm aquém do limite do ápice radicular. Em seguida foram introduzidas uma seqüência de 03 pontas que permaneceram no interior do canal por aproximadamente 01 minuto, sendo então removidas e colocadas em um tubo tipo eppendorf, contendo 1,5 ml de VMGA. As amostras foram transportadas para o laboratório de Microbiologia da UFC após o término do procedimento.

Os cones de papel absorvente estéreis foram levados para o interior do canal radicular com o auxílio de uma pinça estéril, que foi flambada na ponta no momento da inserção e retirada do cone de papel do canal radicular.

Após esta primeira coleta, o canal radicular foi abundantemente irrigado com 150mL de hipoclorito de sódio a 2,5 %, durante 10 minutos, através de irrigação com seringa estéril e sucção.

Porém, nenhum preparo biomecânico foi realizado para que não houvesse fragilização das paredes dentinárias.

Os canais foram secos com o auxílio de pontas de papel absorvente estéril. Após isso foi realizada uma segunda coleta microbiológica (**C2**), semelhante à **C1**. Subseqüentemente, o canal radicular foi preenchido completamente com uma medicação intra-canal, que se constituiu de uma pasta biantibiótica à base de metronidazol e ciprofloxacino, utilizando-se de solução fisiológica 0,9% como veículo. Esta pasta foi manipulada no momento de ser introduzida no canal, utilizando-se proporções iguais dos dois antibióticos e misturando-se ao soro até obter uma consistência pastosa firme. A pasta foi introduzida no canal com espiral lentulo. A embocadura do canal foi protegida com uma pelota de algodão estéril e a câmara pulpar vedada com um cimento de ionômero de vidro, CIV, ativado quimicamente (Vidrion R – S.S.White Artigos Dentários Ltda-Rio de Janeiro-RJ).

### **2ª. Sessão**

A medicação intra-canal permaneceu no interior do canal por 30 dias e foi removido nesta sessão através de irrigação abundante com solução salina fisiológica 0,09%. Neste momento foi realizada a terceira coleta (**C3**), similar às anteriores. Logo após a coleta, foi utilizado uma lima K-File #40 para estimular o sangramento apical intencional até que todo o canal fosse preenchido com sangue. Em seguida, MTA branco (Angelus) foi inserido no terço cervical através de condensação com condensadores tipo Paiva e um algodão umedecido em água destilada estéril foi colocado sobre o material para que este adquira presa mais rapidamente, promovendo assim o vedamento cervical. Após isso a câmara pulpar foi novamente vedada com um cimento de ionômero de vidro, CIV, ativado quimicamente (Vidrion R – S.S.White Artigos Dentários Ltda-Rio de Janeiro-RJ). Uma radiografia periapical foi realizada com o intuito de verificar a correta inserção do MTA no terço cervical.

### **3ª. Sessão**

Após um mês, o paciente retornou para realização de restauração definitiva com resina Composta. Após remoção da restauração provisória de CIV, foi verificado se não houvesse nenhuma quantidade de MTA no interior da câmara pulpar, para que não ocorra escurecimento coronário posterior. Após remoção de possíveis restos de MTA da região coronária, seguiu-se com a restaura-

ção definitiva em Resina Composta (RC) fotopolimerizável. Nesta mesma seção foi realizada uma tomografia da região e uma radiografia periapical com o objetivo de observar o início do desenvolvimento radicular e fechamento apical através de formação de barreiras de tecido duro.

### **Sessões subseqüentes de acompanhamento e controle.**

As sessões subseqüentes foram realizadas com 1mês, 3meses, 6meses e anualmente. Nestas sessões o paciente retornou para realização de tomografias e/ou radiografias periapicais para avaliação de desenvolvimento radicular, fechamento apical e ausência de patologias periapicais. Também realizaram-se fotografias digitais para observar o aspecto coronário, quanto a presença de possíveis alterações de cor.

### **Processamento das amostras**

#### **Diluição em série**

Os *ependorf* contendo VMGA foram levados a um agitador durante 1minuto para homogeneização do inóculo. Após este procedimento, a amostra foi diluída seriadamente em tubos de diluição de  $10^{-1}$  a  $10^{-5}$ , sendo distribuídas uniformemente da menos diluída para a mais diluída. Cada tubo de diluição conteve 900 $\mu$ l de um meio enriquecido (BHI - Caldo) onde foi acrescentado 100 $\mu$ l do inóculo ao primeiro tubo de diluição, e os tubos subseqüentes receberam 1/10 do número de bactérias presentes no tubo anterior. Posteriormente, as amostras dos tubos foram transferidas para placas de Petri contendo BHI Ágar sangue ,onde foram semeadas em triplicata.

#### **Meio de cultura e incubação**

O meio de cultura utilizado foi o BHI-ágar sangue (Brain Hearth Infusion) enriquecido com 5% de sangue de carneiro, a fim de promover o crescimento das espécies anaeróbias estritas.

O sistema utilizado para o cultivo das bactérias anaeróbias foi a técnica com câmara de anaerobiose. O princípio desta câmara é a remoção do oxigênio da câmara pela reação com o hidrogênio adicionado ao sistema, na presença do catalisador. As condições anaeróbias foram produzidas através de um gerador de atmosfera com teor reduzido de oxigênio e aumentado de gás carbônico (ANAEROBAC, Probac do Brasil, Produtos Bacteriológicos Ltda.) As placas foram então colocadas na câmara juntamente com o catalisador e o gerador de anaerobiose, que foram levadas à estufa e incubadas a 35°C por 7 dias.

Assim buscamos promover o crescimento em meios de cultura das seguintes bactérias: *Porphyromonas gingivalis* e *Enterococcus faecalis*.

### **Contagem das bactérias**

O número de colônias foi utilizado na determinação da quantidade de bactérias presentes na amostra original, segundo o cálculo: número de colônias na placa x índice de diluição da amostra = número de bactérias/ ml.

### **Identificação das bactérias**

Os *ependorfs* contendo as amostras foram armazenados a -80°C para posteriormente serem utilizados para a identificação das bactérias presentes nos canais necrosados por trauma através da reação de polimerase em cadeia (PCR) do tipo convencional. Esse teste tem como objetivo detectar, a presença ou ausência das seguintes bactérias: bactérias anaeróbias estritas, como os Bacilos do Pigmento Negro, dentre eles, especificamente, a *Porphyromonas gingivalis* e uma anaeróbia facultativa o *Enterococcus faecalis*. Para realização PCR fez-se necessário a obtenção do DNA bacteriológico das amostras coletadas em C1, C2 e C3.

### **Extração do DNA bacteriano para PCR convencional**

Os *ependorfs* foram descongelados em gelo macerado por 3 horas, agitados em vortex por 10 segundos. Foi retirada uma alíquota de 200 microlitros (µL) de cada amostra e estas foram colo-

cados na centrífuga por 10 minutos a 12.000 rpm. O sobrenadante foi despejado na pia. Em seguida foram adicionados 200 µL de matriz de extração de DNA(DNAzol® Reagent (Invitrogen)) em agitador magnético. Os eppendorfs foram colocados em banho maria a 50°C por 30 minutos. Após isso, foram novamente agitados em vórtex por 10 segundos. Em seguida, banho-maria a 100°C por 8 minutos. Novamente, vortex por 10 segundos. Após isso, foi levado à centrifuga a 12.000 rpm por 3 minutos. Desta forma a amostra estava pronta para realizar o PCR.

### **PCR convencional**

As amostras de todos os casos foram avaliadas quanto à presença de bactérias por meio do ensaio de reação de polimerase em cadeia (PCR convencional) usando *primers* específicos para a avaliação da presença das espécies bacterianas selecionadas. A sequência dos *primers* específicos (Tabela 3) para *Porphyromonas gingivalis*, *Enterococcus faecalis* e para um *primer* universal foram obtidos a partir da literatura, de acordo com os estudos de Cogulu et al, 2008.

### **Reações de PCR convencional.**

As amostras, reagentes para PCR (mix) foram degeladas em gelo macerado 3 horas antes, em depósitos diferentes. Os primers também foram degelados em gelo macerados, porém 1 hora e 30 minutos antes de iniciar o processo de preparo do mix, enquanto a enzima Taq Polimerase foi degelada na hora do uso. As amostras com DNA já extraído foram agitadas em vórtex por 10 segundos e depois centrifugadas por 3 minutos a 12000 RPM. Após isso, os microtubos de 50 µL foram identificados e colocados 20 µL das amostras. Para o controle positivo foi colocado 2 µL da bactéria + 18 µL de água miliQ, já para o controle negativo 20 µL de água miliQ. Para calcular os valores dos reagentes para obtenção do Mix, foi utilizada uma tabela no excel para calcular de acordo com o número de reações de PCR necessárias para as amostras. Em seguida, os microtubos e os reagentes foram levados para a câmara de fluxo laminar. Os primers foram diluídos em água DNA/RNA free, inicialmente foi colocado 98 µL de água para cada 2 µL de primer no eppendorf. Em seguida, o Mix foi preparado. As quantidades de água, primer 1, primer 2, Tampão, Mg, Dntp e Taq foram calculadas de acordo com a tabela. Ao final do preparo do Mix, o mesmo foi agitado somente com pipetagem. Em seguida, na câmara de fluxo, foi colocado o Mix nas amostras e nos controles positivo e negativo, utilizando 30 µL de Mix e 20 µL de amostra, totalizando 50 µL. Logo após, o termociclador foi ligado e realizado o ciclo corretamente de acordo com o protocolo adotado pelo autor e pertinente a cada bactéria. Após termociclagem, as amostras foram utilizadas para eletroforese imediata ou acondicionadas em geladeira.

## Eletroforese

### Leitura do PCR Convencional.

Foi preparado o gel de agarose a 1,1%. Para isto, foi utilizado 100 ml de solução de TBE (Tris/Borato/EDTA) previamente diluído (1:10) em água destilada e corado com 12 ml de SYBR (Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix, Invitrogen) na proveta. 1,1 grama de agarose foi misturado ao TBE corado no Erlemayer até 100 µL. o Erlemayer foi levado ao microondas por 2 a 3 minutos parando a cada 30 segundos para agitar levemente em movimentos circulares para a completa diluição da agarose. Após isso, a mistura foi lentamente, derramada na lateral da cuba de eletroforese para evitar formação de bolhas. Em seguida, foi colocado o pente no local de encaixe da cuba, esperou-se 30 minutos para completa geleificação da agarose e removeu-se o pente, observando a formação de pocinhos. A cuba contendo o gel de agarose foi colocada na câmara de eletroforese e foi observado a presença do TBE diluído cobrindo todo o gel. Para o preparo das amostras, foi utilizado 3 µL de BlueJuice (BlueJuice™ Gel Loading Buffer (10X), Invitrogen) para 9 µL da amostra previamente termociclada. Foram separados 16 eppendorfs 1,5 mL e identificados da seguinte forma: 1 marcador de peso molecular, 1 para o controle positivo, 1 para o controle negativo e 13 para amostras. Foram colocados 3 ml de Bluejuice e 9 µL da amostra em cada um deles. Em seguida foi centrifugado a 12.000 rpm por 30 segundos. No eppendorf para o marcador de peso molecular, foi colocado 9 µL de água e 1 µL do marcador. O marcador 1 Kb ou 0,5 Kb, a depender do espectro de leitura da banda da bactéria, foi retirado do freezer somente no momento da utilização. Para a realização da leitura da eletroforese, foram utilizados 9 µL da solução preparada com Blue juice que foi colocada da esquerda para a direita no interior dos pocinhos de acordo com o mapa previamente anotado com a sequência da eletroforese. Cuidado foi tomado para não furar o gel da eletroforese ou não colocar fora do pocinho. Após isso, o aparelho da eletroforese foi ligado e observado durante 40 minutos a 1 hora e trinta minutos a faixa azul correndo no gel, não deixando a faixa azul cair do gel. Ao fim da eletroforese, foi observado a presença das bandas de DNA presentes no gel de agarose no aparelho de transiluminescência e anotado os resultados no mapa.

A distribuição, de cada uma das variáveis do estudo, se comporta como uma curva normal, o que foi verificado pelo teste de kolmogorov-Smirnov, autorizando o uso de testes paramétricos. A análise estatística foi realizada através da análise do número de Unidades Formadoras de colônias (UFC) em cada coleta e da presença de bandas de DNA em cada coleta para o primer universal 16S, e para as bactérias *E. faecalis* e *P. gingivalis*. Os dados foram analisados por meio do teste Re-

petead-Measures-Two-way-ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni e expressos em forma de média e erro-padrão. Além do teste exato de Fisher.

Cabe ressaltar que todo o experimento foi realizado em condições assépticas. O meio de cultura, a água destilada e o instrumental utilizados foram esterilizados em autoclave a 121° C, durante 15 minutos. Os dados obtidos a partir da análise dos casos foram analisados de forma descritiva, observando-se o grau de desenvolvimento radicular e fechamento apical através das radiografias periapicais e tomografias computadorizadas, bem como ausência de dor, pigmentação coronária e lesão periapical. Os resultados laboratoriais foram analisados através da contagem número de UFC nas três coletas e observando a presença ou ausência das bactérias pesquisadas de acordo com o PCR e Eletroforese realizados.

**Tabela 3:** Seqüência de primers específicos dos micro-organismos avaliados no presente estudo.

Bactéria	FORWARD	REVERSE
<i>P. gingivalis</i>	AGGCAGCTTGCCATACTGCG	ACTGTTAGCAACTACCGATGT
<i>E. faecalis</i>	CCGAGTGCTTGCACTCA- ATTGG	CTCTTATGCCATGCGGCATAAAC
<i>Primer univer- sal</i>	TCCTACGGGAGGCAGCAGT	GGACTACCAGGGTATCTAATC- CTGTT
<i>16SrRNA</i>		

**ANEXO 1 - TERMO DE APROVAÇÃO DO COMEPE**

Universidade Federal do Ceará  
Comitê de Ética em Pesquisa

**Of. Nº 388/11**

Fortaleza, 25 de novembro de 2011

**Protocolo COMEPE nº 268/11**

**Pesquisador responsável: Adriana Kelly de Sousa Santiago**

**Título do Projeto: "Avaliação clínica, radiográfica e microbiológica do tratamento com pasta antibiótica de dentes permanentes com rizogênese incompleta e necrose pulpar causada por trauma"**

Levamos ao conhecimento de V.S<sup>a</sup>, que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 17 de novembro de 2011.

Outrossim, informamos, que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,

Dr. Fernando A. Frota Rezende  
Coordenador do Comitê  
de Ética em Pesquisa  
COMEPE/UFCE

## Conclusão Geral

## 5. CONCLUSÃO GERAL

Pôde-se concluir com o estudo laboratorial que ambas pastas biantibiótica e triantibiótica foram mais eficazes do que a pasta de hidróxido de cálcio contra *E. faecalis*. Assim, a pasta biantibiótica pode ser considerada um substituto antibacteriano eficaz e comparável para pasta triantibiótica e pasta de hidróxido de cálcio. Portanto a sua utilização como medicação intracanal nos casos de dentes com rizogênese incompleta, é uma alternativa adequada de tratamento. Já em relação ao estudo clínico, observou-se que a grande maioria dos dentes tratados mostrou resolução dos sinais e sintomas clínicos e de radiolucência periapicais no período de acompanhamento, apresentando aumento no comprimento radicular, espessura da parede radicular e fechamento apical no período de acompanhamento. Embora o sucesso clínico tenha sido altamente previsível com este procedimento, o fechamento apical é o achado radiográfico mais consistente. Desta forma, o uso da pasta biantibiótica, associada a técnica de revascularização, com uso de hipoclorito de sódio e MTA é uma alternativa viável e de sucesso para os casos clínicos em que houve necrose pulpar de dentes permanentes imaturos causados por trauma. Essa combinação de medicação e técnica permitiu o desenvolvimento continuado das raízes em dentes com polpas necróticas e não causou problema estético à coroa dentária, o que pode ser considerado uma vantagem quando comparado com outras medicações intra-canal. Estas observações clínicas suportam a hipótese de que os pacientes com opções de tratamento limitados podem se beneficiar destes procedimentos. Porém, outros estudos, compreendendo ensaios clínicos randomizados são necessários para observar o efeito das referidas técnicas e o grau de sucesso clínico alcançado em cada uma delas.

## Referências

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, D.; BAHUGUNA, N.; MANAN, R. Use of CBCT in the Successful Management of Endodontic Cases. **J Clin Imaging Sci**, v. 2, p. 50, 2012. ISSN 2156-5597. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23029633> >.
- AKGUN, O. M.; ALTUN, C.; GUVEN, G. Use of triple antibiotic paste as a disinfectant for a traumatized immature tooth with a periapical lesion: a case report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 108, n. 2, p. e62-5, Aug 2009. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19615647> >.
- ALOBAID, A. S. et al. Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study. **J Endod**, v. 40, n. 8, p. 1063-70, Aug 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25069909> >.
- ALTHUMAIRY, R. I.; TEIXEIRA, F. B.; DIOGENES, A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. **J Endod**, v. 40, n. 4, p. 521-5, Apr 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24666903> >.
- ANDREASEN, J. O.; FARIK, B.; MUNKSGAARD, E. C. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. **Dent Traumatol**, v. 18, n. 3, p. 134-7, Jun 2002. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12110105> >.
- ANDREASEN, J. O.; RAVN, J. J. Epidemiology of traumatic dental injuries to primary and permanent teeth in a Danish population sample. **Int J Oral Surg**, v. 1, n. 5, p. 235-9, 1972. ISSN 0300-9785. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4146883> >.
- ASGARY, S.; EHSANI, S. MTA resorption and periradicular healing in an open-apex incisor: A case report. **Saudi Dent J**, v. 24, n. 1, p. 55-9, Jan 2012. ISSN 1013-9052. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23960529> >.
- ASGARY, S.; NOURZADEH, M.; EGHBAL, M. J. Miniature Pulpotomy of Symptomatic Mature Permanent Teeth: A Report of Two Cases. **Iran Endod J**, v. 11, n. 1, p. 75-8, 2016. ISSN 1735-7497. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26843883> >.
- BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? **J Endod**, v. 30, n. 4, p. 196-200, Apr 2004. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15085044> >.
- BANSAL, R.; JAIN, A.; MITTAL, S. Current overview on challenges in regenerative endodontics. **J Conserv Dent**, v. 18, n. 1, p. 1-6, 2015 Jan-Feb 2015. ISSN 0972-0707. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25657518> >.

- BARNETT, F. The role of endodontics in the treatment of luxated permanent teeth. **Dent Traumatol**, v. 18, n. 2, p. 47-56, Apr 2002. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184211> >.
- BERGENHOLTZ, G. Micro-organisms from necrotic pulp of traumatized teeth. **Odontol Revy**, v. 25, n. 4, p. 347-58, 1974. ISSN 0029-8441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4155793> >.
- BJØRNDAL, L.; DARVANN, T. A light microscopic study of odontoblastic and non-odontoblastic cells involved in tertiary dentinogenesis in well-defined cavitated carious lesions. **Caries Res**, v. 33, n. 1, p. 50-60, 1999. ISSN 0008-6568. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9831780> >.
- BOGEN, G.; KUTTLER, S. Mineral trioxide aggregate obturation: a review and case series. **J Endod**, v. 35, n. 6, p. 777-90, Jun 2009. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19482173> >.
- BONTE, E. et al. MTA versus Ca(OH)<sub>2</sub> in apexification of non-vital immature permanent teeth: a randomized clinical trial comparison. **Clin Oral Investig**, v. 19, n. 6, p. 1381-8, Jul 2015. ISSN 1436-3771. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25467231> >.
- 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**, v. 35, n. 10, p. 1343-9, Oct 2009. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801227> >.
- CAPLAN, A. I. Adult mesenchymal stem cells and the NO pathways. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 110, n. 8, p. 2695-6, Feb 2013. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23396846> >.
- CARD, S. J. et al. The effectiveness of increased apical enlargement in reducing intracanal bacteria. **J Endod**, v. 28, n. 11, p. 779-83, Nov 2002. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12470024> >.
- CARDOSO, L. E. C. et al. Knowledge of firefighters with special paramedic training of the emergency management of avulsed teeth. **Dent Traumatol**, v. 25, n. 1, p. 58-63, Feb 2009. ISSN 1600-9657. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19208011> >.
- CASSIDY, N. et al. Comparative analysis of transforming growth factor-beta isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. **Arch Oral Biol**, v. 42, n. 3, p. 219-23, Mar 1997. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9188992> >.
- CEHRELI, Z. C. et al. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. **J Endod**, v. 37, n. 9, p. 1327-30, Sep 2011. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21846559> >.

- CHEN, X. et al. Regenerative endodontic treatment of an immature permanent tooth at an early stage of root development: a case report. **J Endod**, v. 39, n. 5, p. 719-22, May 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23611399> >.
- CHUEH, L. H. et al. Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth. **J Endod**, v. 35, n. 2, p. 160-4, Feb 2009. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19166764> >.
- CHUEH, L. H.; HUANG, G. T. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. **J Endod**, v. 32, n. 12, p. 1205-13, Dec 2006. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17174685> >.
- COGULU, D. et al. PCR-based identification of selected pathogens associated with endodontic infections in deciduous and permanent teeth. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 106, n. 3, p. 443-9, Sep 2008. ISSN 1528-395X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18547832> >.
- COHENCA, N.; SHEMESH, H. Clinical applications of cone beam computed tomography in endodontics: A comprehensive review. **Quintessence Int**, v. 46, n. 8, p. 657-68, Sep 2015. ISSN 1936-7163. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26185797> >.
- COOK, J.; NANDAKUMAR, R.; FOUAD, A. F. Molecular- and culture-based comparison of the effects of antimicrobial agents on bacterial survival in infected dentinal tubules. **J Endod**, v. 33, n. 6, p. 690-2, Jun 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509407> >.
- COOPER, P. R.; HOLDER, M. J.; SMITH, A. J. Inflammation and regeneration in the dentin-pulp complex: a double-edged sword. **J Endod**, v. 40, n. 4 Suppl, p. S46-51, Apr 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24698693> >.
- COOPER, P. R. et al. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. **J Dent**, v. 38, n. 9, p. 687-97, Sep 2010a. ISSN 1879-176X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20580768> >.
- COTTI, E.; MEREU, M.; LUSSO, D. Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. **J Endod**, v. 34, n. 5, p. 611-6, May 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18436046> >.
- 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**, v. 8, n. 2, p. 45-55, Apr 1992. ISSN 0109-2502. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1521505> >.
- CVEK, M.; HOLLENDER, L.; NORD, C. E. Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. VI. A clinical, microbiological and radiological evaluation of treatment in one sitting of teeth with mature or immature root. **Odontol Revy**, v. 27, n. 2, p. 93-108, 1976. ISSN 0029-8441. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1064826> >.

DING, R. Y. et al. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. **J Endod**, v. 35, n. 5, p. 745-9, May 2009. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19410097> >.

EMA, H.; SUDA, T. Two anatomically distinct niches regulate stem cell activity. **Blood**, v. 120, n. 11, p. 2174-81, Sep 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22786878> >.

FENG, J. et al. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 108, n. 16, p. 6503-8, Apr 2011. ISSN 1091-6490. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21464310> >.

FLANAGAN, T. A. What can cause the pulps of immature, permanent teeth with open apices to become necrotic and what treatment options are available for these teeth. **Aust Endod J**, v. 40, n. 3, p. 95-100, Dec 2014a. ISSN 1747-4477. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25470507> >.

FLORATOS, S. G.; TSATSOULIS, I. N.; KONTAKIOTIS, E. G. Apical barrier formation after incomplete orthograde MTA apical plug placement in teeth with open apex--report of two cases. **Braz Dent J**, v. 24, n. 2, p. 163-6, 2013. ISSN 1806-4760. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23780353> >.

GIULIANI, V. et al. The use of MTA in teeth with necrotic pulps and open apices. **Dent Traumatol**, v. 18, n. 4, p. 217-21, Aug 2002. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12442832> >.

GLENDOR, U. Epidemiology of traumatic dental injuries--a 12 year review of the literature. **Dent Traumatol**, v. 24, n. 6, p. 603-11, Dec 2008. ISSN 1600-9657. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19021651> >.

GOLDBERG, M.; NJEH, A.; UZUNOGLU, E. Is Pulp Inflammation a Prerequisite for Pulp Healing and Regeneration? **Mediators Inflamm**, v. 2015, p. 347649, 2015. ISSN 1466-1861. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538825> >.

GOMES, B. P. et al. Effectiveness of 2% chlorhexidine gel and calcium hydroxide against *Enterococcus faecalis* in bovine root dentine in vitro. **Int Endod J**, v. 36, n. 4, p. 267-75, Apr 2003. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12702121> >.

GOMES-FILHO, J. E. et al. Evaluation of the tissue reaction to fast endodontic cement (CER) and Angelus MTA. **J Endod**, v. 35, n. 10, p. 1377-80, Oct 2009. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19801233> >.

GURTU, A. et al. CBCT: a revolutionary diagnostic aid for endodontic dilemmas. **Minerva Stomatol**, v. 63, n. 9, p. 325-31, Sep 2014. ISSN 1827-174X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25308570> >.

GÜNEŞ, B.; AYDINBELGE, H. A. Mineral trioxide aggregate apical plug method for the treatment of nonvital immature permanent maxillary incisors: Three case reports. **J Conserv Dent**, v. 15, n. 1,

p. 73-6, Jan 2012. ISSN 0974-5203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22368340> >.

HAAPASALO, M.; ORSTAVIK, D. In vitro infection and disinfection of dentinal tubules. **J Dent Res**, v. 66, n. 8, p. 1375-9, Aug 1987. ISSN 0022-0345. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3114347> >.

HACHMEISTER, D. R. et al. The sealing ability and retention characteristics of mineral trioxide aggregate in a model of apexification. **J Endod**, v. 28, n. 5, p. 386-90, May 2002. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12033201> >.

HARLAMB, S. C. Management of incompletely developed teeth requiring root canal treatment. **Aust Dent J**, v. 61 Suppl 1, p. 95-106, Mar 2016. ISSN 1834-7819. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26923451> >.

HARRISON, J. W.; HAND, R. E. The effect of dilution and organic matter on the anti-bacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 7, n. 3, p. 128-32, Mar 1981. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6783724> >.

HILKENS, P. et al. Pro-angiogenic impact of dental stem cells in vitro and in vivo. **Stem Cell Res**, v. 12, n. 3, p. 778-90, May 2014. ISSN 1876-7753. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24747218> >.

HOSHINO, E. et al. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. **Int Endod J**, v. 29, n. 2, p. 125-30, Mar 1996. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9206436> >.

IWAYA, S. I.; IKAWA, M.; KUBOTA, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. **Dent Traumatol**, v. 17, n. 4, p. 185-7, Aug 2001a. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11585146> >.

JUNG, I. Y.; LEE, S. J.; HARGREAVES, K. M. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. **J Endod**, v. 34, n. 7, p. 876-87, Jul 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18571000> >.

KAHLER, B. et al. Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. **J Endod**, v. 40, n. 3, p. 333-8, Mar 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24565648> >.

KAKEHASHI, S.; STANLEY, H. R.; FITZGERALD, R. J. THE EFFECTS OF SURGICAL EXPOSURES OF DENTAL PULPS IN GERM-FREE AND CONVENTIONAL LABORATORY RATS. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 20, p. 340-9, Sep 1965. ISSN 0030-4220. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14342926> >.

KHOSHKHOUNEJAD, M.; SHOKOUHINEJAD, N.; PIRMOAZEN, S. Regenerative Endodontic Treatment: Report of Two Cases with Different Clinical Management and Outcomes. **J Dent (Tehran)**, v. 12, n. 6, p. 460-8, Jun 2015. ISSN 1735-2150. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26884781> >.

KIM, J. H. et al. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. **J Endod**, v. 36, n. 6, p. 1086-91, Jun 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20478471> >.

KIM, J. Y. et al. Regeneration of dental-pulp-like tissue by chemotaxis-induced cell homing. **Tissue Eng Part A**, v. 16, n. 10, p. 3023-31, Oct 2010. ISSN 1937-335X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20486799> >.

KOMABAYASHI, T.; SPÅNGBERG, L. S. Comparative analysis of the particle size and shape of commercially available mineral trioxide aggregates and Portland cement: a study with a flow particle image analyzer. **J Endod**, v. 34, n. 1, p. 94-8, Jan 2008a. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155503> >.

KONTAKIOTIS, E. G. et al. Effect of 2% chlorhexidine gel mixed with calcium hydroxide as an intracanal medication on sealing ability of permanent root canal filling: a 6-month follow-up. **J Endod**, v. 34, n. 7, p. 866-70, Jul 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18570998> >.

LATHAM, J. et al. Disinfection Efficacy of Current Regenerative Endodontic Protocols in Simulated Necrotic Immature Permanent Teeth. **J Endod**, Jun 2016. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27372159> >.

LAURENT, P. et al. Induction of specific cell responses to a Ca(3)SiO(5)-based posterior restorative material. **Dent Mater**, v. 24, n. 11, p. 1486-94, Nov 2008. ISSN 0109-5641. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18448160> >.

LIN, L. M.; RICUCCI, D.; HUANG, G. T. Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. **Int Endod J**, v. 47, n. 8, p. 713-24, Aug 2014. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24330275> >.

LIN, P. et al. Efficient lentiviral transduction of human mesenchymal stem cells that preserves proliferation and differentiation capabilities. **Stem Cells Transl Med**, v. 1, n. 12, p. 886-97, Dec 2012. ISSN 2157-6564. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23283550> >.

MANZUR, A. et al. Bacterial quantification in teeth with apical periodontitis related to instrumentation and different intracanal medications: a randomized clinical trial. **J Endod**, v. 33, n. 2, p. 114-8, Feb 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17258626> >.

MAROTO, M. et al. Treatment of a non-vital immature incisor with mineral trioxide aggregate (MTA). **Dent Traumatol**, v. 19, n. 3, p. 165-9, Jun 2003. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12752539> >.

MARTIN, G. et al. Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. **J Endod**, v. 39, n. 1, p. 138-44, Jan 2013a. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228274> >.

- MARTINHO, F. C.; GOMES, B. P. Quantification of endotoxins and cultivable bacteria in root canal infection before and after chemomechanical preparation with 2.5% sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 34, n. 3, p. 268-72, Mar 2008. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291273> >.
- MCNAMARA, R. P. et al. Biocompatibility of accelerated mineral trioxide aggregate in a rat model. **J Endod**, v. 36, n. 11, p. 1851-5, Nov 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20951299> >.
- MENTE, J. et al. Treatment outcome of mineral trioxide aggregate in open apex teeth. **J Endod**, v. 39, n. 1, p. 20-6, Jan 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23228252> >.
- MICKEL, A. K.; NGUYEN, T. H.; CHOGLE, S. Antimicrobial activity of endodontic sealers on *Enterococcus faecalis*. **J Endod**, v. 29, n. 4, p. 257-8, Apr 2003. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12701774> >.
- MOLANDER, A. et al. Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. **Int Endod J**, v. 31, n. 1, p. 1-7, Jan 1998. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9823122> >.
- MURRAY, P. E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K. M. Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. **J Endod**, v. 33, n. 4, p. 377-90, Apr 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17368324> >.
- NAGATA, J. Y. et al. Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. **J Endod**, v. 40, n. 5, p. 606-12, May 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24767551> >.
- NAGY, M. M. et al. Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. **J Endod**, v. 40, n. 2, p. 192-8, Feb 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461403> >.
- NAIR, P. N. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. **Int Endod J**, v. 39, n. 4, p. 249-81, Apr 2006. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16584489> >.
- NUTI, N. et al. Multipotent Differentiation of Human Dental Pulp Stem Cells: a Literature Review. **Stem Cell Rev**, May 2016. ISSN 1558-6804. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27240827> >.
- OZEKI, N. et al. Mouse-induced pluripotent stem cells differentiate into odontoblast-like cells with induction of altered adhesive and migratory phenotype of integrin. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e80026, 2013. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24244598> >.
- PARIROKH, M.; TORABINEJAD, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. **J Endod**, v. 36, n. 3, p.

400-13, Mar 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171353> >.

PARK, J. B.; LEE, J. H. Use of mineral trioxide aggregate in the open apex of a maxillary first premolar. **J Oral Sci**, v. 50, n. 3, p. 355-8, Sep 2008. ISSN 1343-4934. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18818475> >.

PENESIS, V. A. et al. Outcome of one-visit and two-visit endodontic treatment of necrotic teeth with apical periodontitis: a randomized controlled trial with one-year evaluation. **J Endod**, v. 34, n. 3, p. 251-7, Mar 2008. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18291270> >.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R. Periapical healing of endodontically treated teeth in one and two visits obturated in the presence or absence of detectable microorganisms. **Int Endod J**, v. 35, n. 8, p. 660-7, Aug 2002. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196219> >.

PETERS, L. B.; WESSELINK, P. R.; VAN WINKELHOFF, A. J. Combinations of bacterial species in endodontic infections. **Int Endod J**, v. 35, n. 8, p. 698-702, Aug 2002. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12196223> >.

PETRINO, J. A. et al. Challenges in regenerative endodontics: a case series. **J Endod**, v. 36, n. 3, p. 536-41, Mar 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20171379> >.

PINHEIRO, E. T. et al. Microorganisms from canals of root-filled teeth with periapical lesions. **Int Endod J**, v. 36, n. 1, p. 1-11, Jan 2003. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12656508> >.

RALDI, D. P. et al. Treatment options for teeth with open apices and apical periodontitis. **J Can Dent Assoc**, v. 75, n. 8, p. 591-6, Oct 2009. ISSN 1488-2159. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19840502> >.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J. F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **J Endod**, v. 36, n. 8, p. 1277-88, Aug 2010. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20647081> >.

RITTER, A. L. et al. Pulp revascularization of replanted immature dog teeth after treatment with minocycline and doxycycline assessed by laser Doppler flowmetry, radiography, and histology. **Dent Traumatol**, v. 20, n. 2, p. 75-84, Apr 2004. ISSN 1600-4469. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15025689> >.

ROBERTS-CLARK, D. J.; SMITH, A. J. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. **Arch Oral Biol**, v. 45, n. 11, p. 1013-6, Nov 2000. ISSN 0003-9969. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11000388> >.

RULE, D. C.; WINTER, G. B. Root growth and apical repair subsequent to pulpal necrosis in children. **Br Dent J**, v. 120, n. 12, p. 586-90, Jun 1966. ISSN 0007-0610. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5221182> >.

SATO, T. et al. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs on bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. **Oral Microbiol Immunol**, v. 8, n. 3, p. 172-6, Jun 1993. ISSN 0902-0055. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8233571> >.

SCHNEIDER, R. et al. White mineral trioxide aggregate induces migration and proliferation of stem cells from the apical papilla. **J Endod**, v. 40, n. 7, p. 931-6, Jul 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935538> >.

SCHWENDICKE, F.; BROUWER, F.; STOLPE, M. Calcium Hydroxide versus Mineral Trioxide Aggregate for Direct Pulp Capping: A Cost-effectiveness Analysis. **J Endod**, v. 41, n. 12, p. 1969-74, Dec 2015. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26435470> >.

SHIMIZU, E. et al. Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. **J Endod**, v. 39, n. 8, p. 1078-83, Aug 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23880282> >.

SHIN, S. Y.; ALBERT, J. S.; MORTMAN, R. E. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. **Int Endod J**, v. 42, n. 12, p. 1118-26, Dec 2009. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19912384> >.

SIGUSCH, B. W. et al. Colonization of *Enterococcus faecalis* in a new SiO/SiO(2)-microtube in vitro model system as a function of tubule diameter. **Dent Mater**, v. 30, n. 6, p. 661-8, Jun 2014. ISSN 1879-0097. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24703548> >.

SIMON, S. et al. Evaluation of a new laboratory model for pulp healing: preliminary study. **Int Endod J**, v. 41, n. 9, p. 781-90, Sep 2008. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18798922> >.

SIQUEIRA, J. F.; DE UZEDA, M. Intracanal medicaments: evaluation of the antibacterial effects of chlorhexidine, metronidazole, and calcium hydroxide associated with three vehicles. **J Endod**, v. 23, n. 3, p. 167-9, Mar 1997. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9594757> >.

SIQUEIRA, J. F.; RÔÇAS, I. N. Clinical implications and microbiology of bacterial persistence after treatment procedures. **J Endod**, v. 34, n. 11, p. 1291-1301.e3, Nov 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18928835> >.

SJÖGREN, U. et al. The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intracanal dressing. **Int Endod J**, v. 24, n. 3, p. 119-25, May 1991. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1778624> >.

SMITH, A. J.; MATTHEWS, J. B.; HALL, R. C. Transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) in dentine matrix. Ligand activation and receptor expression. **Eur J Oral Sci**, v. 106 Suppl 1, p. 179-84, Jan 1998. ISSN 0909-8836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9541223> >.

SU, W. T.; PAN, Y. J. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth differentiate toward neural cells in a medium dynamically cultured with Schwann cells in a series of polydimethylsiloxanes scaffolds. **J Neural Eng**, v. 13, n. 4, p. 046005, Aug 2016. ISSN 1741-2552. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27217230> >.

SUNDQVIST, G. et al. Microbiologic analysis of teeth with failed endodontic treatment and the outcome of conservative re-treatment. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 85, n. 1, p. 86-93, Jan 1998. ISSN 1079-2104. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9474621> >.

SUNDQVIST, K. G.; EHRNST, A. Cytoskeletal control of surface membrane mobility. **Nature**, v. 264, n. 5583, p. 226-31, Nov 1976. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1034208> >.

TAKAHASHI, N.; NYVAD, B. Caries ecology revisited: microbial dynamics and the caries process. **Caries Res**, v. 42, n. 6, p. 409-18, 2008. ISSN 1421-976X. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18832827> >.

THIBODEAU, B. et al. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. **J Endod**, v. 33, n. 6, p. 680-9, Jun 2007. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17509406> >.

THIBODEAU, B.; TROPE, M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. **Pediatr Dent**, v. 29, n. 1, p. 47-50, 2007 Jan-Feb 2007. ISSN 0164-1263. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18041512> >.

TORABINEJAD, M.; TURMAN, M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. **J Endod**, v. 37, n. 2, p. 265-8, Feb 2011. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21238815> >.

TROPE, M. Regenerative potential of dental pulp. **J Endod**, v. 34, n. 7 Suppl, p. S13-7, Jul 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18565365> >.

TROPE, M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. **Dent Clin North Am**, v. 54, n. 2, p. 313-24, Apr 2010. ISSN 1558-0512. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20433980> >.

VENSKUTONIS, T. et al. The importance of cone-beam computed tomography in the management of endodontic problems: a review of the literature. **J Endod**, v. 40, n. 12, p. 1895-901, Dec 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25287321> >.

VIANNA, M. E. et al. In vivo evaluation of microbial reduction after chemo-mechanical preparation of human root canals containing necrotic pulp tissue. **Int Endod J**, v. 39, n. 6, p. 484-92, Jun 2006. ISSN 0143-2885. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16674744> >.

WALKER, J. T. et al. Microbial biofilm formation and contamination of dental-unit water systems in general dental practice. **Appl Environ Microbiol**, v. 66, n. 8, p. 3363-7, Aug 2000. ISSN 0099-2240. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10919792> >.

WIGLER, R. et al. Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. **J Endod**, v. 39, n. 3, p. 319-26, Mar 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23402501> >.

WINDLEY, W. et al. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. **J Endod**, v. 31, n. 6, p. 439-43, Jun 2005. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15917683> >.

WITHERSPOON, D. E. et al. Retrospective analysis of open apex teeth obturated with mineral trioxide aggregate. **J Endod**, v. 34, n. 10, p. 1171-6, Oct 2008. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18793914> >.

YAN, M. et al. Mineral trioxide aggregate promotes the odonto/osteogenic differentiation and dentinogenesis of stem cells from apical papilla via nuclear factor kappa B signaling pathway. **J Endod**, v. 40, n. 5, p. 640-7, May 2014. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24767557> >.

YANG, S. F. et al. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. **J Endod**, v. 21, n. 12, p. 613-6, Dec 1995. ISSN 0099-2399. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8596083> >.

YASSEN, G. H. et al. Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. **J Endod**, v. 39, n. 2, p. 269-73, Feb 2013. ISSN 1878-3554. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23321244> >.

YASSEN, G. H. et al. The effect of medicaments used in endodontic regeneration on root fracture and microhardness of radicular dentine. **Int Endod J**, v. 46, n. 7, p. 688-95, Jul 2013. ISSN 1365-2591. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23331240> >.

YAZDIZADEH, M. et al. Evaluation of Apical Microleakage in Open Apex Teeth Using MTA Apical Plug in Different Sessions. **ISRN Dent**, v. 2013, p. 959813, 2013a. ISSN 2090-4371. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24282642> >.

ZAREI, M.; AFKHAMI, F.; MALEK POOR, Z. Fracture resistance of human root dentin exposed to calcium hydroxide intervisit medication at various time periods: an in vitro study. **Dent Traumatol**, v. 29, n. 2, p. 156-60, Apr 2013. ISSN 1600-9657. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22788719> >.

ZHAO, S. et al. Ultrastructural localisation of TGF-beta exposure in dentine by chemical treatment. **Histochem J**, v. 32, n. 8, p. 489-94, Aug 2000. ISSN 0018-2214. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11095074> >.