

PUCRS

ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
NÍVEL: DOUTORADO – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA  
DAIANA FLORES GONÇALVES GIANNASTASIO

**AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE  
REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO***

PORTO ALEGRE

2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica  
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
NÍVEL: DOUTORADO – ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: ENDODONTIA

DAIANA FLORES GONÇALVES GIANNASTASIO

**AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE  
REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO***

PORTO ALEGRE

2019

DAIANA FLORES GONÇALVES GIANNASTASIO

**AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE  
REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO***

Linha de Pesquisa:

Etiopatogênese e tratamento das doenças periodontais e periapicais

Tese apresentada como parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção de título de Doutora em Odontologia, na área de concentração de Endodontia pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Escola de Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Blessmann Weber

PORTO ALEGRE

2019

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus por ter me dado a oportunidade de viver e chegar até aqui. Por tudo que sou e por todos que tenho... obrigada Senhor, por me abençoar todos os dias! Sou eternamente Grata!

Aos meus Pais, por terem aceito o desafio de me receber e a missão de me ajudar a ser quem eu sou. Por todas as oportunidades, por todos ensinamentos, pelos exemplos, pela atenção e carinho que sempre recebi. Sou muito feliz por ter escolhido vocês... Obrigada pela melhor herança que poderiam me deixar, meus irmãos... Juliano, Rafael e Lucas, os melhores irmãos do mundo! Aqueles à quem dedico um grande amor maternal e me sinto feliz em poder cuidá-los e ser cuidada por eles. Que bom que nos encontramos nessa família que eu amo.

Ao meu maravilhoso marido, que é meu fiel escudeiro, que cresceu ao meu lado e me viu crescer. Que me incentiva, me escuta, me acolhe e me dá colo... muito obrigada por estar comigo em todas conquistas da minha vida. Muito obrigada por realizar meu maior sonho, o de ser mãe...

Aos melhores projetos e minhas maiores conquistas... meus filhos!!! Guilherme e Gustavo, sem palavras, vocês são demais... muito obrigada por terem me escolhido.

Vocês me completam como pessoa e me fazem infinitamente feliz. Vocês são a maior alegria da minha vida e dão cor e sentido à ela. Obrigada por serem tão como pedi à Deus...

À minha tia Vera, ou melhor, Duda!!! Meu braço direito. Aquela que possibilitou minha ausência e dedicação aos estudos, pois cuidou dos meus anjos da guarda, das minha maiores joias, Guilherme e Gustavo, na minha ausência.

À todos meu amigos, amigas e familiares que de uma forma ou outra me incentivaram a seguir adiante, buscando aperfeiçoamento e crescimento.

Ao querido João Batista Blessmann Weber, meu orientador, incentivador, consolador e grande amigo! Muito obrigada por esses anos de agradável convivência. Obrigada por estar sempre disponível e atento a todas necessidades da pesquisa. Sou muito grata, és muito especial!

Ao prof. Dr. Fernando Branco Barletta por ter me apresentado as belezas da endodontia, o que pra mim já havia sido motivo de muito terror...

Ao prof. Dr. Marcus Vinícius Reis Só, por ter sido meu primeiro orientador de projeto de pesquisa. Valeu o incentivo, as dicas, a paciência e todos ensinamentos.

À profª Drª Roberta Scarparo, a quem admiro e me espelho, por ter me incentivado a seguir em frente. Por ter me mostrado que nem sempre as coisas acontecem como planejamos e que o melhor da vida, é deixar-la ir acontecendo no seu tempo, sem no entanto, perder o foco.

À profª Drª Fabiana Vier-Pelisser, minha total admiração... por toda sua doçura e dedicação na orientação da minha dissertação de Mestrado e por compartilhar comigo seu conhecimento. Foram bons momentos e grandes aprendizados.

Ao prof. Dr. José Antônio Poli de Figueiredo, por me ensinar que não precisávamos sair do mestrado melhor que ninguém, mas sim, melhor do que éramos quando iniciamos.

A todos professores que até hoje tive o prazer que ouvir.

À profª Drª Maria Martha Campos, como agradecer-te? Corrigiu, sugeriu, incentivou, elogiou. Como eu faria pra comprar antibióticos se não fosse você? Obrigada pela confiança...

As professoras Doutoras Denise Machado e Silvia de Oliveira pela participação.

Obrigada por abrirem as portas e aceitarem a parceria.

A Fernanda Majolo, grande pessoa, bióloga e pós-doutoranda. Sem teu apoio não seria possível. Muito obrigada por auxiliar intensamente em todas as etapas e por me mostrar um mundo da pesquisa que jamais imaginei participar.

A Brenda Schmitt, querida aluna de iniciação científica, pelo comprometimento com o desenvolvimento da pesquisa microbiológica. Admiro muito tua dedicação e interesse.

Aos professores da clínica de Cirurgia da Faculdade de Odontologia, representados pelo coordenador prof. Dr. Rafael Loro, pela paciência e incentivo. Foram algumas manhãs em busca da amostra perfeita” e do “n” ideal.

À todos funcionários da PUCRS, em especial à secretaria de pós-Graduação pelo suporte, paciência e ajuda.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade de realização deste Doutorado

## Sumário

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>7</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
1.1 RIZOGENESE INCOMPLETA DE DENTES NECRÓTICOS.....	10
1.2 REVASCULARIZAÇÃO.....	12
1.3 DESCONTAMINAÇÃO.....	15
1.4 CELULAS MESENQUIMAIS.....	18
1.5 FATORES DE CRESCIMENTO.....	21
1.6 SCAFFOLD.....	22
1.7 PROTOCOLO DE TRATAMENTO CONFORME AAE.....	23
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	25
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1. ASPECTOS ÉTICOS.....	26
3.2. CRITÉRIOS DE INCULUSÃO E EXCLUSÃO.....	26
3.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DE DENTES COM RIZOGÊNESE INCOMPLETA.....	27
3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CONFORME A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR.....	29
3.4.1. Citometria de Fluxo.....	30
3.4.2. Diferenciação Adipogênica e Osteogênica.....	32
3.5. PREPARO DAS MEDICAÇÕES.....	32
3.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO ENSAIO MTT.....	33
3.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	35
3.8. ANÁLISE MOLECULAR ATRAVÉS DE qRT-PC.....	36
3.9 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	38
<b>4 ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	<b>40</b>
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1. DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA E OSTEOGÊNICA.....	41
5.2. CITOTOXICIDADE PELO ENSAIO MTT.....	45
5.3. ANÁLISE MOLECULAR.....	47
5.3.1. OST (Osteocalcina).....	48
5.3.2. OPN (Osteopontina).....	49
5.3.3. ALP (Fosfatase Alcalina).....	50
5.4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA.....	51
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	<b>52</b>

6.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	52
6.2 DIFERENCIAÇÃO CELULAR.....	53
6.3 MICROBIOLOGIA.....	57
<b>7. MANUSCRITO 1 .....</b>	<b>60</b>
<b>8. MANUSCRITO 2 .....</b>	<b>89</b>
<b>9. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>100</b>
<b>10. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>100</b>
<b>SCHMALZ, G.; WIDBILLER, M.; GALLER, K. M. Signaling Molecules and Pulp Regeneration. J Endod, v. 43, n. 9S, p.S7-S11, 2017.....</b>	<b>109</b>
<b>ANEXO I – Termo de doação de dentes humanos. ....</b>	<b>113</b>
<b>ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO – MENOR..</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO III - TERMO DE ASSENTIMENTO .....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXO IV – Carta da CLÍNICA DE ESTÁGIO EM Cirurgia E TRAUMATOLOGIA BucomaxiloFacial II (CBMF) .....</b>	<b>121</b>
<b>ANEXO V – Carta Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS .....</b>	<b>122</b>
<b>ANEXO VI - Carta Laboratório de Microbiologia da PUCRS.....</b>	<b>123</b>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.: moléculas bioativas disponíveis na matriz dentinária.....	22
Figura 2.: obtenção e cultura das células de polpa e papila.....	29
Figura 3.: Caracterização das células mesenquimais com marcadores fenotípicos.....	32
Figura 4.: Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR em tempo real e gene constitutivo.....	38
Figura 5.: Fotomicrografias de culturas de células mesenquimais submetidas a diferenciação osteogênica.....	41
Figura 6.: Fotomicrografias de culturas de células mesenquimais submetidas a diferenciação adipogênica.....	41
Figura 7. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais obtidas da papila submetidas a diferenciação osteogênica sob tratamento com diferentes antibióticos.....	42
Figura 8. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais obtidas da papila submetidas a diferenciação osteogênica sob tratamento com diferentes antibióticos.....	43
figura 9.: Avaliação da citotoxicidade dos antibióticos testados em células da papila.....	45
figura 10.: Avaliação da citotoxicidade dos antibióticos testados em células da polpa.....	46
Figura 11.: Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>OST</i> e todos os grupos do estudo.....	47
Figura 12.: Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>OPN</i> e todos os grupos do estudo.....	48
Figura 13.: Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene <i>ALP</i> e todos os grupos do estudo.....	49
Figura 14.: Avaliação da atividade antimicrobianas de diferentes medicações intracanal na presença do biofilme formado por <i>E. faecalis</i> .....	50



## RESUMO

Com o objetivo de complementar o desenvolvimento radicular de dentes permanentes imaturos necróticos, o tratamento de revascularização tem se tornado alvo de muitos estudos. Por terem paredes curtas e frágeis, estes dentes não devem ser instrumentados. Sendo assim, devem ser descontaminados com o uso de medicações intracanal, que atualmente podem ser a base de antibióticos (metronidazol, minociclina e ciprofloxacina) ou a base de Hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ). Sabendo-se da existência de células mesenquimais indiferenciadas responsáveis pela formação da polpa e da raiz, julga-se necessário avaliar o quanto as medicações usadas no interior do canal podem ser consideradas lesivas a essas células. Dessa maneira, esse trabalho tem o objetivo de investigar o potencial citotóxico e a influencia no potencial de diferenciação sobre as células, assim como a capacidade das medicações em reduzir a população microbiana no canal radicular.

**Palavras-chave:** dentes permanentes imaturos, revascularização pulpar, pasta triantibiótica, hidróxido de cálcio

## **ABSTRACT**

In order to complement the root development of immature permanent necrotic teeth, revascularization treatment has become the target of many studies. Because they have short and fragile walls, these teeth should not be instrumented. Therefore, they should be decontaminated with the use of intracanal medications, which currently may be the basis of antibiotics (metronidazole, minocycline and ciprofloxacin) or calcium hydroxide base. Knowing the existence of undifferentiated mesenchymal cells responsible for the formation of pulp and root, is considered necessary to evaluate how the medications used inside the canal can be considered harmful to these cells. Thus, the objective of this work is to investigate the cytotoxic potential and the influence of differentiation potential on the cells, as well as the capacity of the microbial medications in the root canal site.

**KEY WORDS:** immature permanent teeth, pulp revascularization, triantibiotic paste, calcium hydroxide.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 RIZOGENESE INCOMPLETA DE DENTES NECRÓTICOS

A odontologia moderna caracteriza-se por apresentar avanços importantes. Seja nas técnicas, nos materiais ou nas ciências básicas, as pesquisas estão contribuindo para o aprimoramento da profissão. Associando-se o conhecimento científico ao desenvolvimento de técnicas relevantes, os dentes permanentes jovens com necrose pulpar, com ou sem rarefação periapical, foram bastante beneficiados (Shin, Albert e Mortman, 2009; Soares et al., 2013; Nosrat, Seifi e Asgary, 2011).

Sabe-se que a necrose pulpar acontece em consequência a lesão de cárie, trauma dental ou em dentes com aberração severa (European Society of Endodontology Position Statement) e, no caso de dentes permanentes imaturos, interrompe o processo de formação radicular que se completa em média três anos após a erupção do dente na cavidade oral (Moorrees, Fanning e Hunt, 1963).

O elemento dentário é classificado com rizogênese incompleta quando este processo não ocorre completamente ou seja, quando histologicamente o ápice radicular não possui dentina apical revestida por cimento. E, radiograficamente, quando a raiz não atinge o estágio 10 de Nolla, no qual se observa a formação completa do ápice.

A característica principal dos dentes com rizogênese incompleta é ter raiz curta e paredes finas. Sendo assim, apresentam estrutura frágil e risco aumentado de fraturas (Frank, 1966; Cvek *et al.*, 1992; Andreassen, Farik e Munkisgaard, 2002; Simon et al., 2007; Reynolds, Johnson e Cohenca, 2009).

Tradicionalmente, o manejo endodôntico destes visa à apicificação por meio da utilização de hidróxido de cálcio (Sheehy e Roberts, 1997; Abbott, 1998; Kerekes, Heide, Jacobsen, 1980; Petrino et al., 2010; Rafter, 2005) ou selamento apical com agregado trióxido mineral (MTA) (Simon *et al.*, 2007; Holden; Schwartz; Kirkpatrick, 2008).

A apicificação com hidróxido de cálcio é baseada nas trocas consecutivas e a longo prazo da medicação. Tem o objetivo de criar uma barreira apical calcificada para facilitar a obturação do canal radicular (Kundabala, Abhishek, e Neeta, 2010). Entretanto, o uso prolongado da medicação fragiliza as paredes da dentina deixando a raiz ainda mais suscetível ao trauma (Andreasen, Farik e Munksgaard, 2002).

Por outro lado, a barreira apical com MTA requer apenas duas sessões anteriormente a obturação. Apesar de apresentar bons resultados, não estimula a continuidade da formação radicular e portanto não reduz as chances de fratura (Kundabala, Abhishek, e Neeta, 2010).

Com o objetivo de dar continuidade à formação radicular de dentes permanente jovens, novos protocolos favorecendo a manutenção da viabilidade celular e estimulação de células-tronco foram desenvolvidos (Branchs e Trope, 2004; Iwaya, Ikawa e Kubota, 2001). Conhecida como revascularização, inicialmente a técnica era proposta para dentes imaturos reimplantados ou auto-transplantados, já que a polpa estaria necrótica, mas não infectada, podendo funcionar como estrutura tridimensional fundamental para abrigar o crescimento de um novo tecido (Skoglund, Tronstad, Wallenius, 1978; CVEK et al., 1990). Entretanto, a técnica passou a ser usada para dentes imaturos com necrose pulpar com ou sem lesão periapical (Iwaya, Ikawa e Kubota, 2001).

## 1.2 REVASCULARIZAÇÃO

A terapia de revascularização pode ser considerada um procedimento de engenharia tecidual cujo objetivo é restaurar, manter ou melhorar a função do tecido. Para isso, é necessário que exista a interação entre células indiferenciadas, uma estrutura tridimensional que as dê suporte e moléculas sinalizadoras que promovam o crescimento, proliferação e diferenciação celular (Hargreaves et al., 2008; Langer e Vacanti, 1993).

Esta técnica não requer trocas periódicas da medicação, e a principal vantagem sobre a apicificação refere-se ao desenvolvimento completo da raiz com aumento de espessura das paredes dentinárias por deposição de tecido duro (Shah et al., 2008).

Convencionalmente, após a descontaminação, insere-se um instrumento endodôntico no interior do canal até que o mesmo alcance a região periapical e promova sangramento (Tawfik et al., 2013; Soares et al., 2013; Banchs e Trope, 2004). Assim como o sangue, células mesenquimais, com capacidade de proliferação e diferenciação, presentes no periápice entrarão no canal. O coágulo servirá de arcabouço (*scaffold*), estrutura tridimensional que fornece suporte para a estabilização das células e de fonte de fatores de crescimento que irão direcionar a diferenciação celular (Tabata, 2004, Thibodeau et al., 2007; Banchs e Trope, 2004; Murray, Garcia-Godoy e Hargreaves, 2007; Hargreaves et al., 2008; Lovelace et al., 2011). Nosrat, Seifi e Asgary (2011) relatam que a entrada insuficiente de sangue no canal radicular é um dos motivos para o insucesso do tratamento de revascularização.

A revascularização tem eficácia semelhante a apicificação com plug de MTA (Roghanizadeh e Fazlyab, 2018), tendo índices de resolução de sinais e sintomas de 100 e 95%, respectivamente. Quando comparados a apicificação com hidróxido de

cálcio, este tem índice de sucesso menos efetivo (77%). Entretanto, os autores relatam que o aumento na estrutura dentária (comprimento e espessura das paredes) é substancialmente superior no procedimento de revascularização (Jeeruphan et al., 2012; Lin et al., 2017).

El Ashiry et al. (2016), relatam sucesso clínico e radiográfico no tratamento de dentes permanentes imaturos necróticos com periodontite apical. Os autores confirmam o aumento da espessura das paredes do canal e o fechamento do ápice da raiz, havendo como consequência redução da luz do canal.

Apesar de aumentar a resistência radicular, e ser considerada uma técnica segura (Kontakiotis; Filippatos; Agrafioti, 2014), a revascularização tem previsibilidade limitada (Ding et al., 2009). Sendo assim, não havendo sinal de continuidade da formação radicular em até 3 meses, deve-se proceder com tratamentos convencionais (Wang et al., 2010; BANCHS; TROPE, 2004).

Han *et al.* (2010) sugerem que ao proporcionar um microambiente similar àquele presente na região apical dos dentes imaturos, possibilita-se que células mesenquimais indiferenciadas avancem para o desenvolvimento de um tecido semelhante a cemento e ligamento periodontal. Dessa maneira promove repopularização celular de dentes anteriormente necrosados (Shah et al., 2008).

Estudos em cães demonstram que ocorre aposição de tecido cementóide ou osteóide e não de tecido dentinário como seria esperado (da Silva et al., 2010; Wang et al., 2010; Tawkik et al., 2013; Torabinejad et al., 2014). No interior do canal, está presente um tecido conjuntivo similar ao ligamento periodontal (Torabinejad et al., 2014), composto por fibroblastos cercados por fibras nervosas e vasos sanguíneos (Meschi et al., 2016) que podem permanecer por tempo indeterminado e, caso haja

necessidade, aumenta as chances de sucesso de um possível tratamento endodôntico convencional (Kerekes, Heide e Jacobsen, 1980; WANG et al., 2010). Apesar do sucesso clínico, esta técnica não promove regeneração do tecido pulpar e dentinário (Torabinejad et al., 2014; Moradi et al., 2016) portanto, é considerada reparo endodôntico guiado (Diógenes et al., 2016) mas não impede que aconteça a formação da porção apical da raiz (Nosrat et al., 2013).

Tendo em vista que os achados histológicos diferem do tecido dentinário e pulpar, conclui-se que o sucesso da terapia de revascularização está relacionado a resolução da doença e a continuidade da formação radicular (Altaii, Richards e Rossi-Fedele, 2016) pela deposição de tecido mineralizado, independente de ser ósseo, cementóide ou dentinário.

Atualmente, a Associação Americana de Endodontia prevê como sucesso da terapia, a resolução dos sinais e sintomas de doença. Portanto o aumento da espessura das paredes e do comprimento da raiz seriam objetivos secundários da técnica.

A revascularização pode ser considerada primeira opção de tratamento para dentes com necrose pulpar e rizogênese incompleta. Entretanto, não exclui a possibilidade de, em caso de falha, necessitar que seja feita a apicificação com MTA ou hidróxido de cálcio (Diógenes et al., 2016). Porém, havendo necrose do tecido neoformado após fechamento do ápice radicular, o tratamento endodôntico convencional pode ser realizado com maior chances de sucesso, assim como a reabilitação protética do dente (El Ashiry et al., 2016).

### 1.3 DESCONTAMINAÇÃO

O objetivo do tratamento de uma doença é auxiliar nos processos de cura da ferida aprimorando os mecanismos de defesa imunológica inata e adaptativa para eliminar irritantes e criar um microambiente favorável para a reparação e/ou regeneração tecidual. Infecções endodônticas primárias predominam *Bacteroides*, *Prophyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium* e *Camphylobacter* (Roças e Siqueira, 2010; Provenzano et al., 2013). Em dentes com infecção secundária (contaminação durante ou pós tratamento) há presença de microrganismos como *Enterococci*, *Streptococci*, *Lactobacilli*, *Actinomyces* e fungo (ex. *cândida*) (Love, 2001; Wang et al., 2012).

O biofilme bacteriano apresenta-se fortemente protegido pela substância polimérica extracelular, que promove adesão e troca de informações entre os microrganismos, tornando-os muito mais resistentes que aqueles na sua forma plantônica (apud Nair, 2014).

O *Enterococcus faecalis* é frequentemente encontrado em infecções endodônticas persistentes (STUART; SCHWARTZ; BEESON; OWATZ, 2006). É um microrganismo gram-positivo anaeróbio facultativo, que apresenta fatores importantes de resistência e alta virulência (KAYAOGLU; ORSTAVIK, 2004), sendo este capaz de resistir em ambientes com privação nutricional, sendo portanto difícil de removê-lo do ambiente radicular.

Para que haja a possibilidade de continuidade do desenvolvimento radicular o sistema de canais deve estar descontaminado (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Sonoyama et al., 2008; Huang et al., 2008; Thibodeau et al., 2017). Conforme Thibodeau et al. (2007), mesmo que o protocolo de tratamento seja corretamente



executado, não há continuidade da formação radicular na presença de bactérias. É considerado portanto, um tratamento baseado no conceito “esterilização da lesão e reparo do tecido (LSTR = *lesion sterilization and tissue repair*) (Hoshino et al., 1996; Alam et al., 2005).

Entretanto, Vishwanat et al. (2017) afirmam que na presença de contaminação, há alteração no perfil da diferenciação nas células da papila apical. Ou seja, acontece deposição por tecido ósseo cementário e não dentinário como seria esperado, diferente do que alguns autores já relataram anteriormente quando referiam-se à insucesso.

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é utilizado como coadjuvante na desinfecção do sistema de canais (Clarckson e Moule, 1998) e tem sua ação potencializada quando associado a irrigação ultrassônica passiva (PUI) (Ordinola-Zapata et al., 2014). Tem excelente eficácia bactericida (Bystrom e Sundqvist, 1981; Harisson, Wagner e Henry, 1990; Viana *et al.*, 2006; Martinho e Gomes, 2008; Van Der Sluis et al., 2010) possui capacidade de dissolução de material orgânico e serve como lubrificante para a instrumentação endodôntica (Hand e Smith, 1978; Harisson e Hand 1981; Yang et al., 1995). Pode ser encontrado em concentrações que variam de 0,5 a 6%, porém na terapia de revascularização pulpar, os relatos de caso têm demonstrado o uso dessa substância em concentrações elevadas, variando de 2,5% a 6% (Nosrat, Seifi e Asgary, 2011). Entretanto, Diógenes et al. (2014), sugerem que este seja usado na concentração de 1,5% seguido de irrigação final com EDTA a 17% para favorecer a manutenção celular (Trevino et al., 2011).

A dissolução do tecido e a ruptura do biofilme relacionada ao NaOCl dependem do tempo e da concentração (Ordinola-Zapata et al., 2014; Tartari et al., 2016). O aumento do tempo de exposição e da concentração de NaOCl levam ao

aumento da dissolução tecidual e conseqüentemente altera a composição dentinária pela oxidação da matriz orgânica e desnaturaçãõ do colágeno (Tartari et al., 2016). É indicado para ser usado em combinação com 17% de EDTA (ácido etilendiaminotetracético), que tem uma ação importante na redução do biofilme intracanal (Ozdemir et al., 2010) além de ser um agente quelante, que remove a porçãõ inorgânica da camada externa da luz do canal e age como um adjuvante na terapia do canal radicular (Haapasalo et al., 2014).

Associada à irrigaçãõ com hipoclorito de sódio (Windley et al., 2005; CHUEH; HUANG, 2006; Thibodeau et al., 2007; Bose, Nummikoski e Hargreaves, 2009), medicações intracanal de espera, com características específicas estãõ sendo usadas (Hoshino et al., 1996). Hoshino et al. (1996) propõs o uso da pasta triantibiótica. Ainda usada atualmente, é composta de metronidazol, ciprofloxacina e minociclina (Sato et al., 1996) e demonstra ser efetiva na desinfecçãõ do sistema de canais radiculares (Trope, 2004; Sato et al., 1996; Hoshino et al., 1996). Por ser uma infecçãõ polimicrobiana, é improvável que apenas um antibiótico seja eficaz contra os microrganismos presentes no sistema de canais radiculares (Windley et al., 2005).

Visando não causar danos as células da papila e da polpa a Associação Americana de Endodontia recomenda o uso da medicaçãõ triantibiótica em baixa concentraçãõ (1 mg/ml) (Althumairy, Teixeira e Diogenes, 2014; Alghilan et al., 2016). Recentemente, estudos in vitro demonstram o potencial antimicrobiano destas (Latham, Fong e Jewett, 2016; Sabrah, Yassen e Gregory, 2013; Tagelsir et al., 2016).

Outra medicaçãõ de espera disponível é o hidróxido de cálcio. É bem conhecido e muito utilizado na endodontia (Siqueira e Lopes, 2001). Tem pH altamente alcalino, aproximando-se a 12,5 e dissocia-se em íons cálcio e hidroxila. Estes, por sua vez, apresentam diversas propriedades biológicas como capacidade

antimicrobiana (Byström, Claesson e Sundqvist, 1985), inibição da reabsorção radicular (Tronstad, 1988) e indução de formação de tecido duro (Foreman; Barnes, 1990). Dessa maneira, é uma medicação intracanal padrão ouro na endodontia. Sua capacidade antimicrobiana está relacionada a liberação de íons hidroxila que reagem com inúmeras moléculas causando danos letais às bactérias (Freeman e Crapo 1982) pelo rompimento da membrana citoplasmática, desnaturação protéica e dano ao DNA bacteriano (Siqueira & Lopes, 2001). Além disso, o hidróxido de cálcio promove a viabilidade, proliferação e adesão celular (Kitikuson; Srisuwan; Dent, 2016).

Estudos comprovam a eficácia antimicrobiana tanto da medicação triantibiótica quanto do hidróxido de cálcio (Tagelsir et al., 2016; Shokraneh et al., 2014; Jacobs et al., 2017) e demonstram sucesso quando utilizados em técnicas regenerativas (Nagata et al., 2014).

As medicações auxiliares usadas para descontaminação do canal radicular alteram a rugosidade na superfície, redução da molhabilidade e alteração química da estrutura dentinária (Yassen et al., 2015). Entretanto, dada a necessidade de descontaminação do canal sem ação mecânica, é preciso apostar nas medicações mesmo com suas limitações, considerando-se a importância do uso de agentes químicos (Diogenes et al., 2013).

#### 1.4 CELULAS MESENQUIMAIS

Na endodontia, o descobrimento, a caracterização e os processos de utilização das células-tronco, dos tecidos dentários, estão trazendo grandes colaborações para a prática clínica (Gronthos et al., 2000; Gronthos et al., 2002; Huang et al., 2008; Sonoyama et al., 2008).

Os dentes tem origem embriológica da interação entre células epiteliais e células mesenquimais (da crista neural). As primeiras células-tronco isoladas de dentes humanos adultos foram as células-tronco da polpa dental. Estas foram isoladas de terceiros molares permanentes e apresentaram alto potencial de proliferação e alta frequência de formação de nódulos densamente calcificados (Gronthos et al., 2000).

As células-tronco são células indiferenciadas, ou seja, células não especializadas, que podem ser definidas por duas propriedades peculiares: auto-renovação e potencial de diferenciação. A auto-renovação é a capacidade que as células-tronco têm de proliferar, gerando células idênticas à original (outras células-tronco). O potencial de diferenciação é a capacidade que as células-tronco têm de, quando em condições favoráveis, gerar células especializadas e de diferentes tecidos (LaNCE - laboratório Nacional de Células Tronco Embrionárias).

Várias populações de células-tronco foram isoladas de diferentes partes dos dentes humanos. Dentre elas, destacam-se as células da polpa dental (*dental pulp stem cells* – DPSC), as células-tronco da polpa de dentes decíduos (*stem cell from human exfoliated deciduous teeth* – SHED), célula-tronco da papila apical (*stem cell of apical papilla* – SCAP), célula-tronco do ligamento periodontal (*periodontal ligament stem cell* – PDL) e célula-tronco do folículo dental (*dental follicle cell* – DFC) (Volponi, Pang e Sharpe, 2010).

O uso de células-tronco dentais possuem diversas vantagens. Os resultados presentes sugerem que os dentes são fontes viáveis de células mesenquimais adultas para uma vasta gama de aplicações clínicas (Volponi, Pang e Sharpe, 2010). Por não serem órgãos vitais, não são considerados alvos principais para a medicina regenerativa quando comparados a doenças neurais ou cardíacas. Dessa maneira, o

tratamento torna-se mais acessível e em caso de falha não requer tratamento cirúrgico de maior complexidade (Volponi, Pang e Sharpe, 2010).

As células mesenquimais da papila apical são, supostamente, responsáveis pela continuidade da formação radicular (Nosrat, Seifi e Asgary, 2011; Sonoyama, Lim e Fang, 2006; Huang et al., 2008; Sonoyama et al., 2008). Segundo Sonoyama, Lim e Fang (2006), a remoção cirúrgica da papila apical interrompe formação da raiz, reforçando a hipótese de que as células da papilla apical, e não as da polpa, seriam as responsáveis pela formação radicular. São células com altas taxas de proliferação e alta capacidade de diferenciação odontogênica (Sonoyama et al., 2008).

Mesmo em casos de necrose pulpar e lesão periapical, estas podem se manter viáveis por estarem situadas em uma zona ricamente vascularizada (Sonoyama et al., 2001), mantendo suas características de células indiferenciadas, mesmo quando comparadas aquelas encontradas em dentes vitais (Ruparel et al., 2013). Contribuindo com os estudos anteriormente citados, Chrepan et al. (2016) concluem que, mesmo diante de um processo inflamatório instalado, as células da papila apical apresentam-se inflamadas mas se mantêm viáveis e indiferenciadas, assim como apresentam aumento no potencial de diferenciação osteogênica e de angiogênese.

Duarte et al. (2014) induziram lesão periapical em dentes imaturos de ratos e avaliaram, histologicamente, a polpa e a papila. Os autores relatam que após 60 dias, o tecido da papila e da polpa da região apical apresentavam processo inflamatório semelhante. Entretanto, quando observadas após 90 dias, o tecido pulpar estava completamente necrótico, enquanto a papila continuava vital.

Segundo Sonoyama et al., 2008, a papila apical é considerada fonte de odontoblastos durante a formação do dente. A medida que os odontoblastos diferenciados depositam dentina primária e a papila dental é envolvida pela estrutura

dentinária, esta transforma-se então, em tecido pulpar.

## 1.5 FATORES DE CRESCIMENTO

A dentina armazena grandes quantidades de fatores de crescimento e citocinas (Robert-clark e Smith, 2000; Goldberg e Smith, 2003; Cooper, Takahashi e Grahem, 2010). Estes são aprisionados na matriz dentinária durante a dentinogênese através de suas interações com proteoglicanos e outros componentes da matriz extracelular (Baker *et al.*, 2009; Smith, Mattheews e Hall, 1998) e funcionam como um reservatório de moléculas sinalizadoras para fatores de crescimento e pró-angiogênicos (Robert-Clark e Smith, 2000; Cassidy *et al.*, 1997). Alguns desses fatores, como o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de transformação do crescimento beta-1 (TGF- $\beta$ 1) tem grande eficácia em promover a proliferação e diferenciação das células mesenquimais (Robert-Clark e Smith, 2000; Cassidy *et al.*, 1997). Conforme Macdonald, Cheung e Anseth (2010), o TGF- $\beta$ 1 demonstra ser quimiostático a células oriundas da papila apical. Além destes, a matriz dentinaria também aprisiona outros fatores de crescimento como Fator de crescimento de fibroblastos 2 (FGD-2), proteína óssea morfogenética 2 (BMP-2), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e fator de crescimento epidérmico (EGF) (Robert-Clark, 2000).

Na terapia de revascularização, as moléculas bioativas ou sinalizadoras são liberadas de remanescentes pulpares, são mobilizados a partir da dentina adjacente, que os mantém aprisionados ou são introduzidos no canal através estímulo do coágulo sanguíneo (Schmalz, Widbiller e Galler, 2017).

#### Moléculas sinalizadoras derivadas da dentina

##### Fatores de crescimento e citocinas

- Proteína morfogenética óssea 2, 4 e 7
- Fator neurotrófico derivado do cérebro
- Fator de crescimento epidérmico
- Fator de crescimento fibroblástico
- Fator neurotrófico derivado da linhagem glial
- Fator de crescimento hepatócito
- Fator de crescimento insulínico 1 e 2
- Fator de crescimento nervoso
- Fator de crescimento placentário
- Fator de crescimento derivado de plaquetas
- Fator de crescimento transformador  $\beta 1$ ,  $-\beta 2$  e  $-\beta 3$
- Fator de crescimento vascular endotelial

##### Glicoproteínas de ligação

- Sialoproteína óssea
- Proteína da matriz de dentina 1
- Fosfoproteína dentinária
- Sialoproteína da dentina
- Fosfoglicoproteína extracelular da matriz
- Osteopontina

##### Outras proteínas

- Adrenomodulina
- Imunoglobulina G, A e M
- Interleucina 8 e 10

**FIGURA 1.** Moléculas bioativas disponíveis na matriz dentinária (Schmalz, Widbiller, e Galler, 2017).

## 1.6 SCAFFOLD

Scaffold é uma réplica tridimensional da matriz extracelular, que dá suporte as células e propicia um ambiente favorável a migração, proliferação e diferenciação destas (Zhang e Yelick; YELICK, 2010). É considerada uma estrutura essencial para o tratamento de revascularização (Murray et al., 2007). Sua biodegradação deve coincidir com a formação tecidual, até que sua estrutura seja substituída por matrix extracelular (Schopper et al., 2005).

A indução do coágulo sanguíneo, quando comparado com a ausência deste, resulta em maior deposição de tecido duro e formação de novo tecido vital (Thibodeau

et al., 2007). Portanto, os autores reforçam a importância deste em abrigar fatores de crescimento necessários para promover crescimento e diferenciação celular.

## 1.7 PROTOCOLO DE TRATAMENTO CONFORME AAE

Primeira consulta:

- Anestesia local, isolamento absoluto e acesso;
- Irrigação copiosa com 20 ml de hipoclorito de sódio (1,5%) + 10 ml de soro com agulha de irrigação posicionada 1 mm aquém do final da Raiz, para minimizar a citotoxicidade às células mesenquimais da do tecido apical.
- Secar o canal com cones de papel;
- Inserir medicação intracanal a base de hidróxido de cálcio ou pasta triantibiótica em baixa concentração. Levar a medicação ao canal com auxílio de seringa;
- Caso opte-se pelo uso da pasta triantibiótica, considerar o selamento da cavidade coronária com sistema adesivo e deixá-la abaixo da junção amelo-cementária, para minimizar o risco de pigmentação da dentina) e misturar metronidazol:minociclina:ciprofloxacina 1:1:1 em concentração final de 1 mg/ml);
- Selamento da cavidade com material temporário como Cavit<sup>®</sup> , IRM<sup>®</sup>, ou ionômero de vidro.
- Dispensar o paciente entre 1 e 4 semanas.

Segunda consulta (após 1 ou 4 semanas)

Avaliar a resposta ao tratamento inicial. Havendo algum sinal ou sintoma de doença, considerar tratamento adicional com medicação intracanal. Caso contrário, segue com a segunda etapa do protocolo de tratamento.



- Anestesia local com mepivacaína 3% sem vasoconstritor e isolamento dental.
  - Irrigação copiosa com 20 ml de EDTA 17%;
  - Secar o canal com cones de papel;
  - Provocar o sangramento através da sobreinstrumentação do canal radicular (indução do sangramento rotacionando um instrumento pré-curvado tipo K passando 2 mm além do forame).
  - Aguardar que todo canal seja preenchido com sangue (abaixo do nível da junção amelo-cementária) e sobre o coágulo sanguíneo, colocar uma camada de 3-4 mm de material de capeamento pulpar. Entre o coágulo e o material de capeamento é possível usar uma membrana reabsorvível;
  - Sobre o material de capeamento pulpar inserir uma camada de 3-4 mm de cimento de ionômero de vidro autopolimerizável (e.g., Fuji IILCTM, GC America, Alsip, IL, USA) e posteriormente o material restaurador.
- Follow-up: exame clínico e radiográfico.
- Ausência de dor, edema ou fístula (entre a primeira e segunda consulta);
  - Resolução da radiolucidez periapical (observada entre 6 e 12 meses após o tratamento)
  - Aumento da espessura das paredes dentinárias e do comprimento do dente (observado entre 12 e 24 meses após o tratamento).
  - Teste de sensibilidade pulpar (ausência de sensibilidade não significa insucesso).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a citotoxicidade e o potencial de diferenciação das células da papila apical e da polpa dentária em contato com a pasta de hidróxido de cálcio e com a medicação triantibiótica, bem como testar o potencial antimicrobiano de ambas. Com base nos resultados, sugerir a medicação de demora mais indicada para os casos de revascularização pulpar, que seja capaz de descontaminar o sistema de canais radiculares mantendo a viabilidade celular.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- avaliar e comparar a citotoxicidade das medicações utilizadas na descontaminação do sistema de canal radicular sobre as células mesenquimais indiferenciadas da papila apical e polpa dentária de dentes extratidos;
- avaliar a capacidade das células mesenquimais da papila apical e da polpa dentária na diferenciação em osteoblastos após permanecerem 21 dias em contato com as medicações utilizadas para descontaminação do sistema canal radicular;
- avaliar o potencial antimicrobiano das medicações utilizadas para descontaminação do sistema de canais radiculares;
- relacionar a capacidade de descontaminação à manutenção da viabilidade celular sem alterar o potencial de diferenciação.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. ASPECTOS ÉTICOS**

O presente estudo está em conformidade com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução nº 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012).

Esta pesquisa foi avaliada e aprovada pela Comissão Científica da Escola de Ciência da Saúde da PUCRS e pelo Comitê de Ética em Pesquisas da PUCRS (CEP).

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Terapia Celular do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) e no Laboratório de Imunologia e Microbiologia Escola de Ciências da PUCRS.

#### **3.2. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO**

Após aprovação da Comissão Científica da Escola de Saúde e do Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) foi solicitada a doação de dentes de pacientes que procuram a Clínica de Especialização em Cirurgia Bucomaxilo Facial da Faculdade de Odontologia da PUCRS (ANEXO I). Aqueles que concordaram, assinaram o Termo de Doação de Dentes (ANEXO II) e em caso de doadores menores o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Menores (ANEXO III) e Termo de Assentimento para os pais ou responsáveis (ANEXO IV). Para compor o grupo de participantes, foram incluídos na pesquisa terceiros molares com rizogênese incompleta com indicação prévia de exodontia.

### 3.3. OBTENÇÃO DE CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS A PARTIR DE DENTES COM RIZOGÊNESE INCOMPLETA

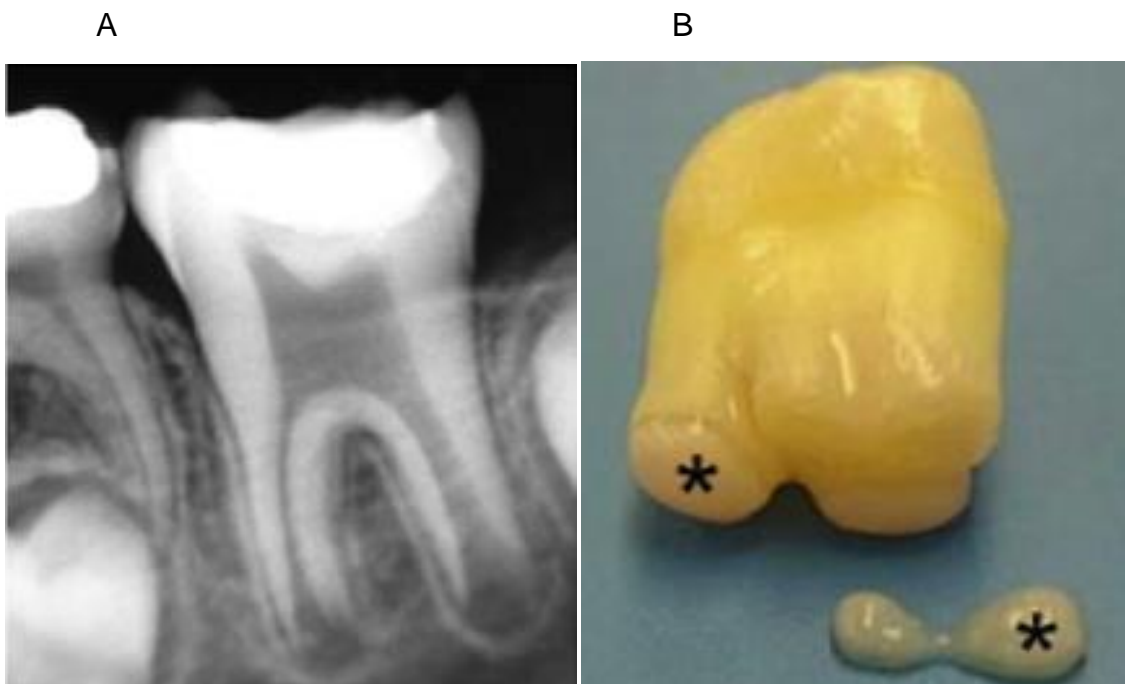
Foram obtidos 10 terceiros molares com rizogênese incompleta de diferentes pacientes com idade entre 17 e 21 anos, com indicação de extração. Imediatamente após a exodontia, os dentes foram enxaguados com solução salina tamponada.

A papila apical e a polpa foram cuidadosamente separadas da superfície radicular e picadas em fragmentos com aproximadamente 2 x 2 x 1 mm, no Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Terapia Celular do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (ANEXO V). Os fragmentos foram transferidos para o meio de cultura completo DMEM (Gibco® – Invitrogen Corporation, Grand Island, EUA) contendo a 10% de soro fetal bovino (SFB), 10 U/ml de penicilina, 10 µg/ml de estreptomicina e 10 µg/ml de gentamicina (Gibco® – Invitrogen Corporation, Grand Island, EUA) e mantidos numa atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub> e 95% de umidade. O meio de cultura foi substituído a cada três dias. Foram utilizadas células de quinta a nona passagem após atingirem confluência de 70% - 80%. Foi realizada a diferenciação osteogênica e adipogênica e citometria de fluxo com o objetivo de caracterizar a cultura de células mesenquimais antes de serem expostas as medicações.

As células de fibroblastos de camundongo da linhagem NIH-3T3 foram usadas como padrão ouro comparativo, conforme ISO 10993-5 (1992): “*Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*”.

Para detectar uma diferença de magnitude  $E/S \geq 1,2$  unidades de desvio padrão em amostras emparelhadas foi estimado que um número de 10 observações por grupo experimental e por grupo de tempo atingiriam um poder estatístico de 90%. O estudo possui 5 tratamentos (fórmula triantibiótica, metronidazol, minociclina, ciprofloxacina e hidróxido de cálcio) e dois grupos controles (DMEM e hipoclorito de

sódio). Para a avaliação da citotoxicidade, os testes foram feitos em 3 tempos, tanto para células da papila quanto para as da polpa, através de triplicatas. Assim, cada paciente contribuiu com 126 dosagens em um total de 1260 dosagens. Para avaliar o potencial de diferenciação, os testes foram realizados em 1 tempo, mantendo as células em contato com as medicações durante 21 dias tanto para células da papila quanto para as da polpa. Assim, cada paciente contribuiu com 42 dosagens em um total de 420 medições. A ação microbiana foi avaliada em 1 tempo, ou seja, 14 dias após o contato dos medicamentos com o biofilme formado.



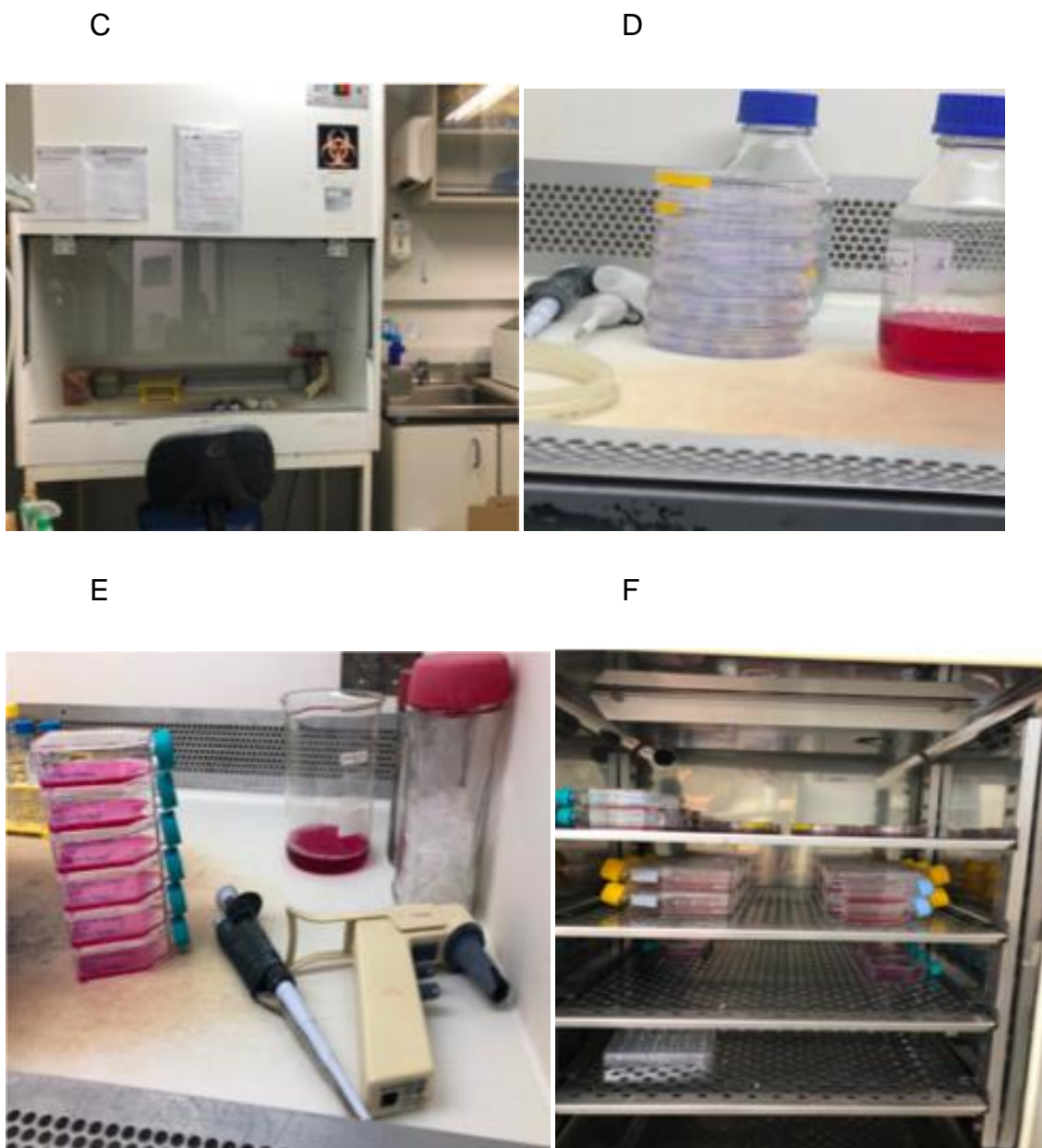


FIGURA 2 (A - F): Obtenção e cultura das células de polpa e papila

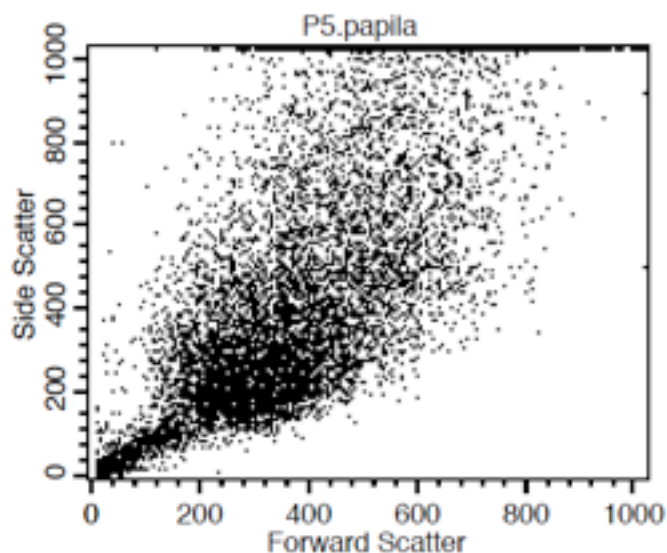
### 3.4. CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS-TRONCO MESENQUIMAIS CONFORME A SOCIEDADE INTERNACIONAL DE TERAPIA CELULAR

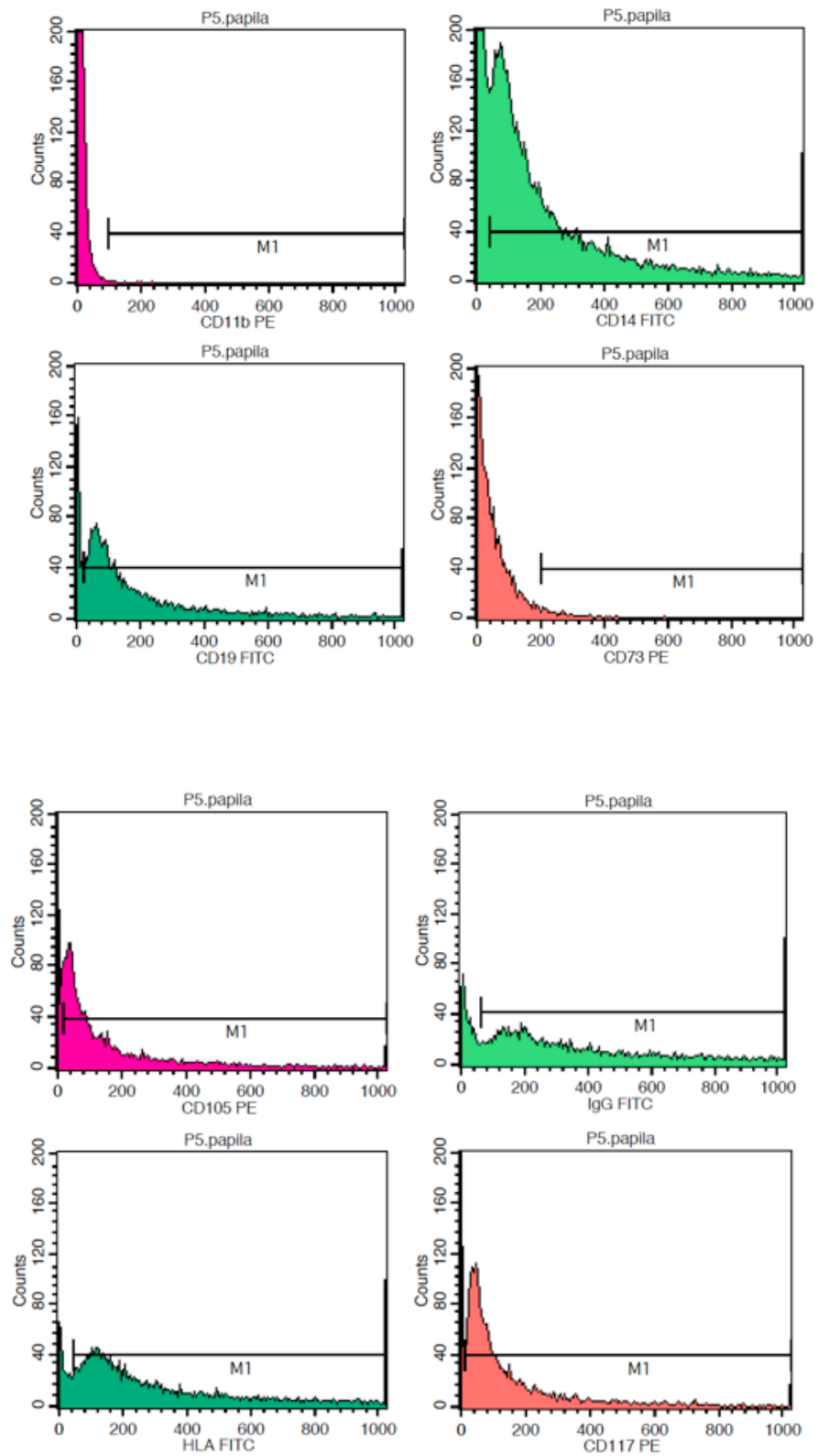
Uma alíquota das células foi submetida a caracterização conforme preconizado pela ISCT (International Society for Cell Therapy) que considera MSCs somente aquelas capazes de adesão à superfície de cultura, que possuem capacidade de

diferenciação adipogênica, osteogênica e condrogênica que apresentam um determinado perfil de marcadores de superfície celular.

### 3.4.1. Citometria de Fluxo

Células da papila e polpa dentária foram testadas com marcadores positivos (CD73, CD90, CD105, and CD146) e negativos (CD11b, CD19, CD34, CD 45 and HLA-DR) para células mesenquimais indiferenciadas, Laboratório de Biologia Celular e Molecular no Centro de Terapia Celular do Instituto do Cérebro do Rio Grande do Sul (InsCer) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (ANEXO V), conforme o protocolo do fabricante.





**Figura 3.** Caracterização das células mesenquimais com marcadores fenotípicos



### 3.4.2. Diferenciação Adipogênica e Osteogênica

A diferenciação adipogênica foi induzida pelo cultivo das células obtidas em meio DMEM suplementado com  $10^{-8}$  mol/L de dexametasona e 5 µg/mL de insulina, por quatro semanas. Para confirmação da diferenciação adipogênica, os meios de cultura foram retirados e a cultura foi lavada com DPBS. As células foram fixadas com paraformaldeído (PFA) 4% a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período o PFA foi retirado, as células foram lavadas com DPBS e coradas com a solução *Oil Red O* por 5 minutos (Phinney et al., 1999).

A diferenciação osteogênica foi induzida pelo cultivo das células obtidas em meio DMEM suplementado com  $10^{-8}$  mol/L de dexametasona, 5µg/mL de ácido ascórbico 2-fosfato e  $10^{-8}$  mmol/L de β- glicerolfosfato durante quatro semanas. Para a detecção dos depósitos de cálcio, as culturas foram lavadas com DPBS e coradas por cinco minutos a temperatura ambiente com coloração de *Von Kossa* pH 4,2 (Phinney et al., 1999).

### 3.5. PREPARO DAS MEDICAÇÕES

As medicações foram manipuladas de forma asséptica, na capela de fluxo laminar, com material estéril.

Para os testes com os três antibióticos associados foram misturados 1 mg de metronidazol (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) + 1 mg minociclina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) + 1 mg ciprofloxacina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) em 1 ml do meio de cultura. Também serão avaliados os antibióticos individualmente, misturando 1 mg de cada em 1 ml do meio de cultura. Todos antibióticos tiveram grau de pureza superior a 95%.

O hidróxido de cálcio pró análise ( $\text{Ca(OH)}_2$  P.A) (Biodinâmica, Ibiporã, Brasil) foi utilizado misturando 1 mg em 1 ml do meio de cultura.

### 3.6 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO ENSAIO MTT

O teste de citotoxicidade foi realizado segundo a normativa ISO 10993-5 (1992): *Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods*.

A citotoxicidade foi medida através da análise com 3-(4,5dimetil-2-tiazolil) 2,5-difenil-2H-tetrazoliobrometo (MTT), sendo baseada na habilidade da enzima mitocondrial desidrogenase succinato, presente em células metabolicamente ativas, de converter o sal tetrazólio amarelo em cristais de formazan. Esse produto insolúvel em água, azul escuro, fica armazenado no citoplasma das células, e é solúvel posteriormente, produzindo uma coloração azulada. A intensidade da coloração está diretamente relacionada com a viabilidade das células.

As análises com MTT foram realizadas nos períodos de 24, 48, 72 após o contato das células com a medicação.

As células de fibroblastos de camundongo da linhagem NIH-3T3 foram usadas como padrão ouro comparativo, conforme ISO 10993-5 (1992): *“Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods”*.

Em um período de 24 h antes de atingir o tempo de exposição dos tratamentos respectivos, foram preparadas placas de 96 poços com uma densidade celular de  $3,2 \times 10^5$  células por poço, sendo cada poço preenchido com quantidade de células estabelecidas e 200 $\mu$ L de meio DMEM suplementado.

Passado essas 24 h, o meio de cultura celular foi removido dos poços, deixando-se apenas o residual celular no qual então foi adicionado a cada poço,

200µL do meio de cultura contendo o eluído das amostras (meio de extração), sendo então incubadas por 24, 48 e 72 horas. Os experimentos foram realizados através de triplicatas para cada grupo. Para comparação dos resultados foram utilizados grupos controle, onde o controle negativo consistiu no tratamento apenas com DMEM suplementado e o controle positivo consistiu no tratamento com hipoclorito de sódio 1%.

Após estes períodos de exposição, as células foram submetidas a uma marcação com brometo de 3(4,5-dimetilazol-2il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), (Sigma-Aldrich Brasil LTDA, São Paulo, SP, Brasil), diluído a 0,5% em meio DMEM sem suplementação. Após a aplicação da solução de MTT, as células foram colocadas na incubadora nas mesmas condições citadas anteriormente durante 2 horas e 30 minutos. Após o período de incubação, a solução de MTT foi aspirada, e os cristais de *formazan* foram solubilizados com a adição de 100µL de DMSO. A absorbância de cada poço foi obtida através de espectrofotometria em leitora de Elisa (Bio-Rad Laboratories, Inc, Califórnia, CA,USA) em um comprimento de 570nm.

Os resultados foram expressos como a porcentagem média da absorbância das triplicatas nos diferentes tratamentos, inclusive nos controles e no branco. Em seguida subtraiu-se a média da absorbância da triplicata dos poços em branco de todas as médias dos testes, inclusive dos controles. O valor obtido pela subtração da média dos brancos da média do controle (que não foi colocado nenhum tratamento, contendo somente células e meio DMEM suplementado) deve ser considerado como 100% de células viáveis. Para os demais testes foi feito uma regra de três.

Esquemas de divisão dos grupos:

- G1 (papila/tri): 24, 48, 72 horas
- G2 (papila/metro): 24, 48, 72 horas
- G3 (papila/mino): 24, 48, 72 horas
- G4 (papila/cipro): 24, 48, 72 horas
- G5 (papila/Ca(OH)<sub>2</sub>): 24, 48, 72 horas
- G6 (papila/DMEM): 24, 48, 72 horas
- G7 (papila/hipoclorito de sódio): 24, 48, 72 horas

- G1 (polpa/tri): 24, 48, 72 horas
- G2 (polpa/metro): 24, 48, 72 horas
- G3 (polpa/mino): 24, 48, 72 horas
- G4 (polpa/cipro): 24, 48, 72 horas
- G5 (polpa/Ca(OH)<sub>2</sub>): 24, 48, 72 horas
- G6 (polpa/DMEM): 24, 48, 72 horas
- G7 (polpa/hipoclorito de sódio): 24, 48, 72 horas

### 3.7. AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE DIFERENCIAÇÃO CELULAR

As células foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade celular de  $2 \times 10^5$  células por poço. Culturas subconfluentes foram incubadas em meio de indução osteogênica (DMEM suplementado com 10% de SFB, 10mM de  $\beta$ -glicerol fosfato, 50  $\mu$ g/ml de ácido ascórbico e  $10^{-8}$ M de dexametasona) e meio de indução adipogênica (DMEM suplementado com 10% de SFB, 5  $\mu$ g/ml de insulina e  $10^{-9}$  M de dexametasona) durante aproximadamente 3 semanas (Phinney, 1999). O meio foi substituído a cada 2-3 dias. A calcificação da matriz extracelular e o acúmulo de vesículas lipídicas foram verificados por meio de coloração de Von Kossa (Sheehan, 1980) e coloração de Oil Red O (Pittenger, 1999; Novikoff, 1980), respectivamente. A

diferenciação foi analisada por PCR em tempo real após 21 dias em contato com as medicações, para detectar a expressão de sialofosfoproteína da dentina (DSPP).

*Coloração de von Kossa:* Para avaliar a formação de uma matriz extracelular calcificada, as células foram fixadas com 10% de formalina, coradas com 5% de nitrato de prata (AgNO<sub>3</sub>), lavadas com água destilada fixadas com 5% de tiosulfato de sódio (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e contracoradas com Nuclear Fast Red a 0,1% para detecção do núcleo celular.

*Coloração de Oil Red O:* Para identificar o acúmulo de lipídeos, as células foram fixadas com 10% de formalina e 60% de isopropanol e coradas com 0,3% de Oil Red O.

### 3.8. ANÁLISE MOLECULAR ATRAVÉS DE qRT-PCR

As análises moleculares dos genes relacionados à osteocalcina (BGLAP), osteopontina (SPP1) e fosfatase alcalina (ALP) foram realizadas pela extração do RNA total das células em cultura, seguida de uma reação de transcrição reversa (RT-PCR) e reação em cadeia da polimerase em tempo real (QT-PCR) usando oligonucleotídeos iniciadores específicos para cada uma dessas proteínas. A extração do RNA foi realizada através do kit RNA SV-Total (Promega). As amostras foram expostas a um tampão de lise, aquecidas a 70° por 3 minutos e centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi coletado e adicionado a ele 200 µL de álcool 95%. O conteúdo foi transferido para uma coluna de sílica e centrifugado a 12.000 G por 1 minuto. Foi adicionado 600 µL de tampão e novamente centrifugado a 12.000 G por 1 minuto. Foi adicionado enzima DNase diluída em tampão e cloreto de manganês (MnCl<sub>2</sub>) e incubado por 15 minutos a temperatura ambiente. Foi adicionado

tampão de bloqueio da enzima e as colunas foram novamente centrifugadas a 12.000 G por 1 minuto. As colunas foram lavadas com tampão de lavagem e o RNA retido na sílica foi eluído com 100 µL de água livre de RNase através de centrifugação a 12.000 G por 2 minutos. A quantificação do RNA extraído foi realizada através do fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas de 5 µL de cada amostra de RNA extraído foram adicionados a 195 µL de tampão contendo uma sonda RNA HS Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

O SuperScript VILO MasterMix (Life Technologies) foi utilizado para a síntese de cDNA conforme orientação do fabricante. Foi adicionado 16 µL de RNA em 4 µL da *master mix* SuperScript VILO e expostas aos ciclos térmicos (25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos) utilizando termociclador Verit (Life Technologies). O DNA complementar ao RNA extraído foi quantificado utilizando o fluorômetro Qubit 2.0 (Life Technologies) conforme orientação do fabricante. Alíquotas de 1 µL de cada amostra de cDNA foram adicionados a 199 µL de tampão contendo uma sonda ssDNA Assay (Life Technologies) e realizada a leitura para quantificação.

A partir da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction*) em tempo real foram realizadas as análises da expressão gênica, utilizando equipamento SpetOne Plus (Life Technologies). Amplificações a partir de 20 ng de cDNA foram realizadas para cada amostra. Os ensaios foram realizados em placas individuais para cada gene utilizando o gene GAPDH como controle endógeno de expressão. Na figura 4 constam os genes utilizados com seus respectivos *primers* complementares a sequência dos RNAs.

	Forward	Reverse
<b>OST</b>	5'-TCA CAC TCC TCG CCC TAT TG-3'	5'-TCG CTG CCC TCC TGC TTG-3'
<b>OPN</b>	5'-CA GCCACAAGCAGTCCAGATTAT-3'	5'-CTTT TGGGGTCTACAACCAGCATA-3'
<b>ALP</b>	5'- CCA ACG TGG CTA AGA ATG TC-3'	5'-CAT CTC GTT GTC TGA GTA CC - 3'
<b>GAPDH</b>	5'- TGAAGGTCGGAGTCAACGGATTTGGT- 3'	5'- CATGTGGGCCATGAGGTCCACCAC- 3'

**Figura 4** - Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR em tempo real e gene constitutivo.

### 3.9 AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA

Culturas de *E. faecalis* (ATCC 29212) foram obtidas e cultivadas no Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (ANEXO VI). As bactérias foram cultivadas em Brain Heart Infusion (BHI) por 18 a 24 horas a 37°C em estufa. A cultura de *E. faecalis* foi ajustada para a densidade óptica de 0,5 obtida por meio da leitura a 600 nm, e diluída até 10<sup>-8</sup> em solução salina. As diluições 10<sup>-6</sup> a 10<sup>-8</sup> foram cultivadas em ágar sangue, em triplicata, a 37°C por 24 horas para a determinação da densidade celular do inóculo. A formação de biofilme foi realizada por 21 dias em placas de cultura contendo 24 poços. A cada poço, foram adicionados 1,9 mL de caldo BHI e uma alíquota de 100 µL do inóculo. A cada 48 h, 1 mL do meio de cultivo foi renovado. Semanalmente, o meio de cultivo removido foi semeado em ágar sangue e cultivado por 24 horas a 37°C, com subsequente análise morfológica das colônias e coloração de Gram para verificação da pureza da cultura.

Após o período de formação do biofilme, o meio de cultivo foi removido e os poços foram lavados duas vezes com tampão fosfato-salino (PBS) para a remoção de células planctônicas. Um volume de 2 ml da medicação triploantibiótica, metronidazol,

minociclina, ciprofloxacina, hidróxido de cálcio, hipoclorito de sódio (controle positivo) ou de solução salina (controle negativo) foi adicionado aos poços, sendo mantidos por 14 dias. Cada composto antimicrobiano e os controles foram testados em triplicata. As medicações foram retiradas com o auxílio de uma seringa esterilizada, e os poços foram lavados cinco vezes com PBS. Uma alíquota de 2 mL de PBS foi adicionada a cada poço com biofilme, que, subsequentemente, foi desagregado em um banho de ultrassom Cleaner 1400A (Unique) por 10 minutos. Uma alíquota de 50 µL do biofilme desestruturado foi removida dos poços de cultura e transferida para um tubo contendo 450 µL de solução salina a 0,85% estéril. O material foi diluído até  $10^{-8}$ , 100 µL de cada diluição foram semeados, em triplicata, em ágar sangue, que foi incubado a 37°C por 24 horas para a determinação do número de células sobreviventes aos tratamentos.

Divisão dos grupos conforme medicação a ser testada contra *E. Faecalis*:

G1: fórmula triantibiótica

G2: ciprofloxacina

G3: minociclina

G4: metronidazol

G5: hidróxido de cálcio

G6: solução salina

G7: hipoclorito de sódio (NaOCl)



#### **4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados resultantes do experimento foram de nível de medida quantitativo (dados contínuos), usando a técnica de equações de estimativas generalizadas com matriz de correlação não-estruturada e foram descritos inicialmente por média e desvio-padrão. Para comparação dos grupos utilizamos um modelo linear misto tendo como efeito fixo os grupos de tratamento e o tempo e como efeito randômico os pacientes. Diferenças entre médias múltiplas foram identificadas através de procedimentos de post-hoc. O nível de significância adotado foi de  $\alpha=0,05$ . Os dados foram processados e analisados com o auxílio dos programas SPSS versão 22.0 e R versão 3.3.

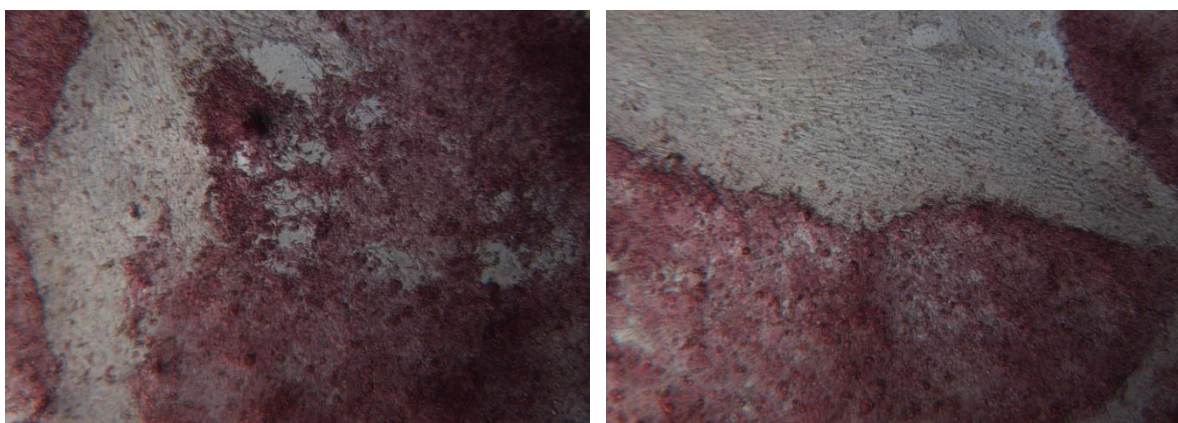
## 5. RESULTADOS

### 5.1. DIFERENCIAÇÃO ADIPOGÊNICA E OSTEOGÊNICA

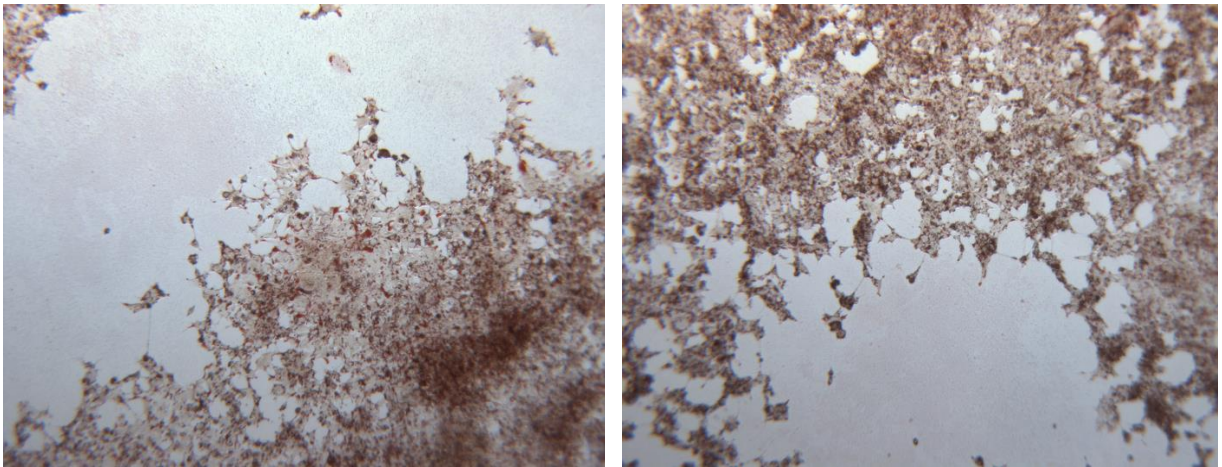
As células da polpa e da papila apical de dentes com rizogênese incompleta, após cultivo por quatro semanas em meios específicos para diferenciação mesodérmica (osteogênica e adipogênica), foram caracterizadas por métodos de coloração específicos para células ósseas e de gordura.

O processo de diferenciação das MSCs para a linhagem óssea foi comprovado com por meio do corante Von Kossa que permite a identificação dos depósitos de cálcio (Figura 5). Encontram-se regiões avermelhadas nas células diferenciadas, isto é, depósitos de minerais provenientes da formação de uma matriz mineralizada, semelhante a do tecido ósseo.

Outra característica marcante é a mudança de morfologia das células osteodiferenciadas, que alteram o seu formato para células mais largas, alongadas e alinhadas, recobrimo toda placa de cultura e em alguns lugares formando aglomerados celulares. A indução adipogênica foi demonstrada após três semanas de cultivo quando foi possível identificar uma grande quantidade de vesículas lipídicas intracelulares coradas com Oil Red O (Figura 6), que evidencia as gotículas lipídicas.



**Figura 5.** Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais submetidas a diferenciação osteogênica. Depósitos de cálcio em vermelho (400 X).



**Figura 6.** Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais submetidas a diferenciação adipogênica. Depósitos lipídicos (400 X).

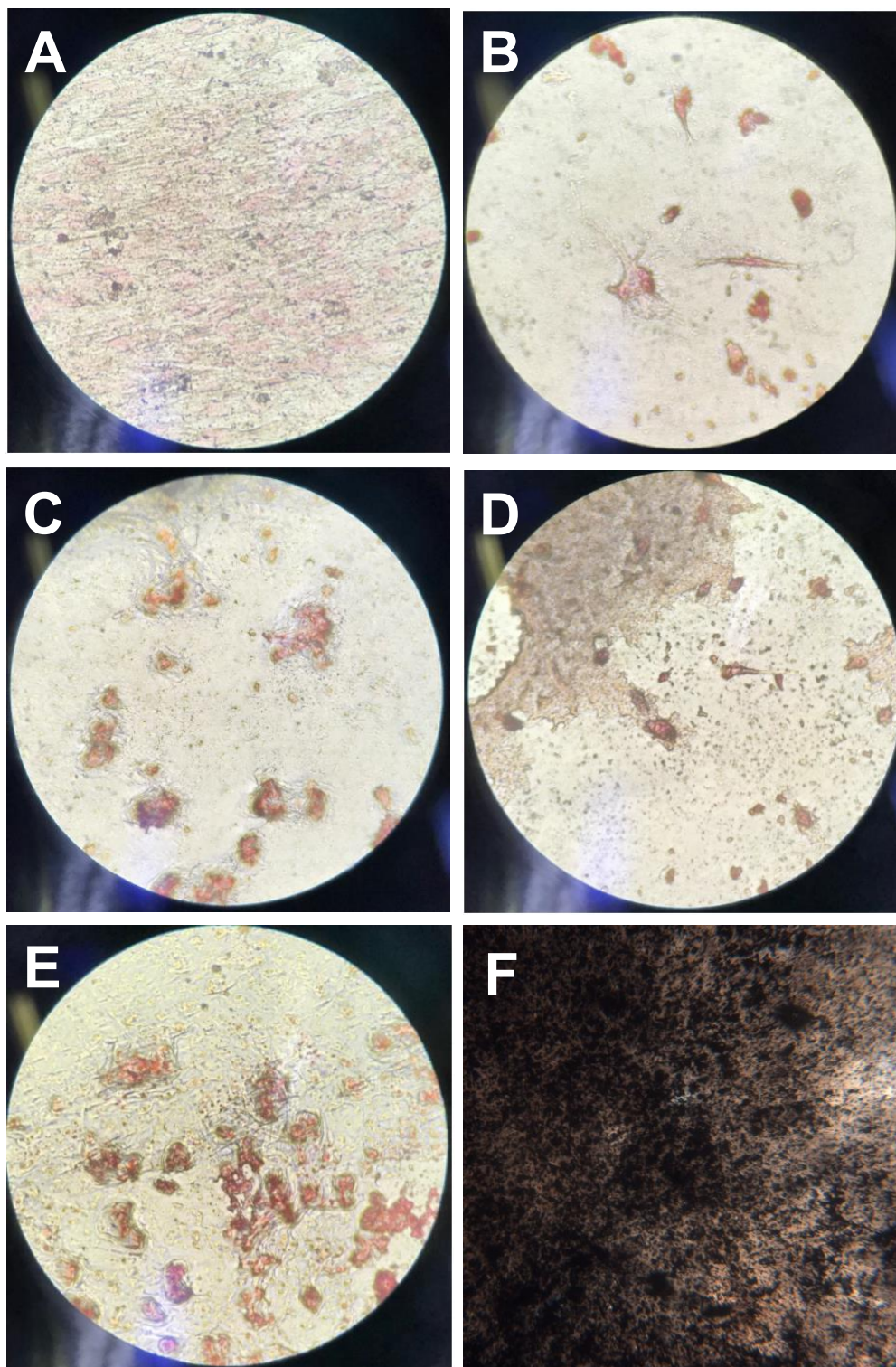
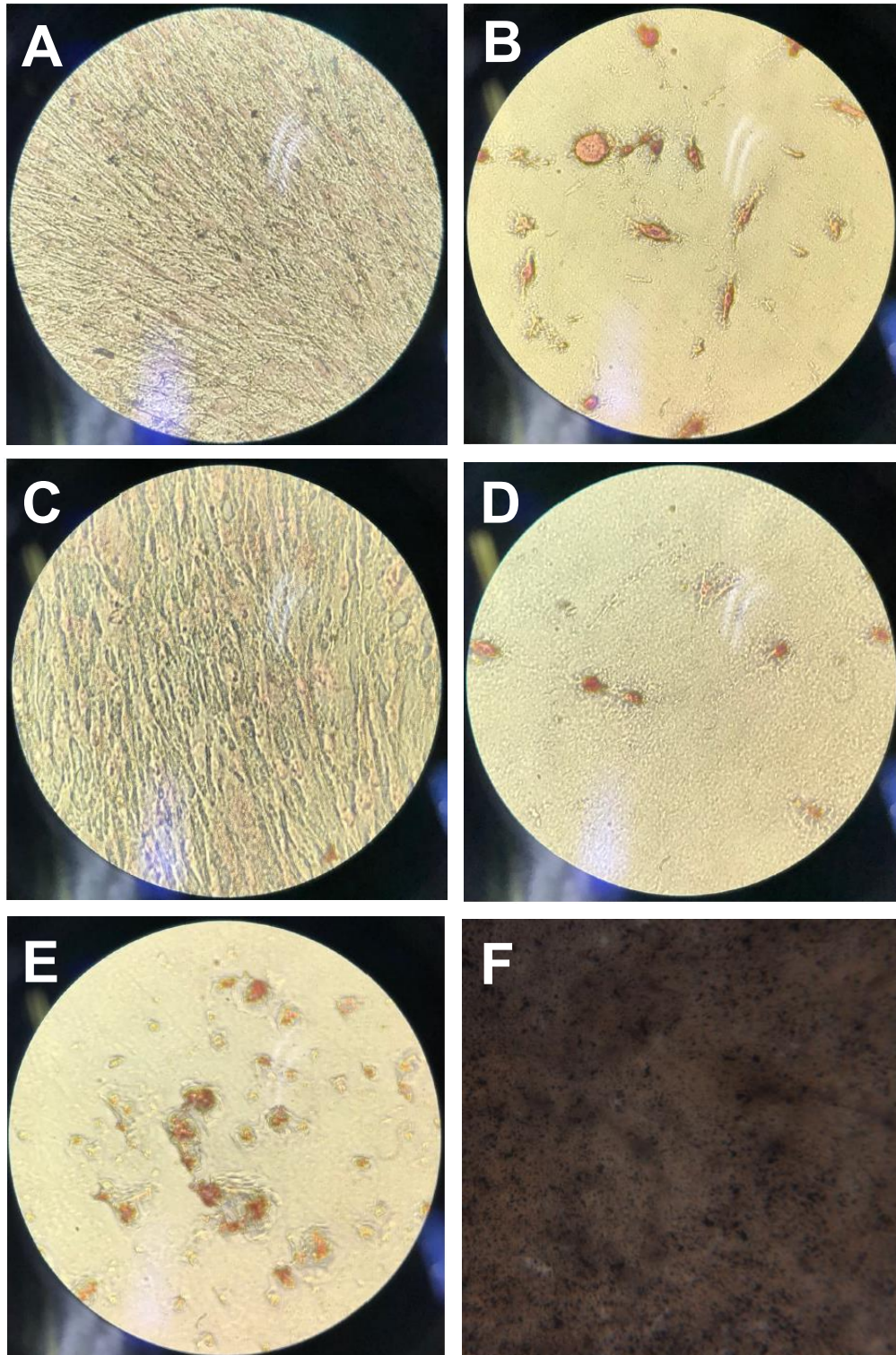


Figura 7. Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais obtidas da papila submetidas a diferenciação osteogênica sob tratamento com diferentes antibióticos. **A.** Controle **B.** Diferenciação Ósteogênica + Fórmula Triantibiótica **C.** Diferenciação Ósteogênica + Metronidazol **D.** Diferenciação Ósteogênica + Minociclina **E.** Diferenciação Ósteogênica + Ciprofloxacina **F.** Diferenciação Ósteogênica + hidróxido de cálcio

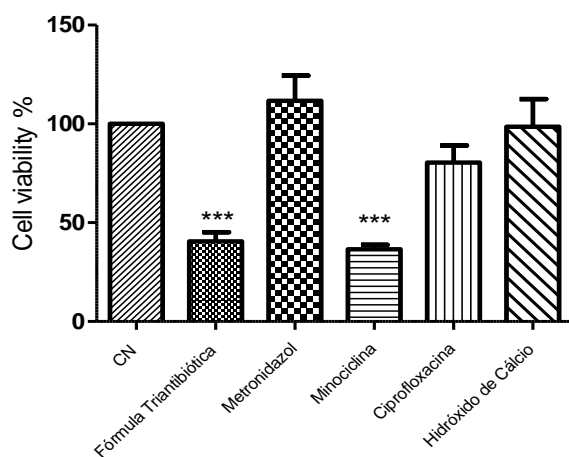


**Figura 8.** Fotomicrografias de culturas de células-tronco mesenquimais obtidas da papila submetidas a diferenciação osteogênica sob tratamento com diferentes antibióticos. **A.** Controle **B.** Diferenciação Ósteogênica + Fórmula Triantibiótica **C.** Diferenciação Ósteogênica + Metronidazol **D.** Diferenciação Ósteogênica + Minociclina **E.** Diferenciação Ósteogênica + Ciprofloxacina **F.** Diferenciação Ósteogênica + hidróxido de cálcio.

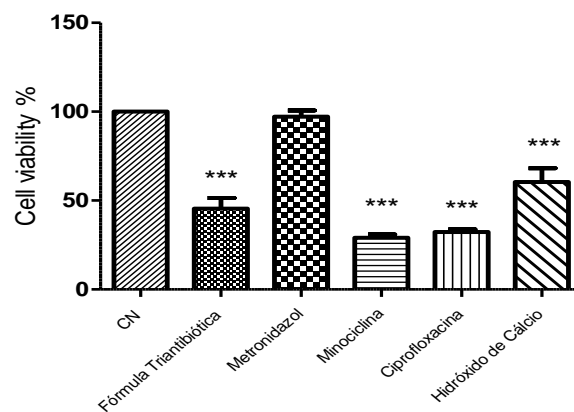
## 5.2. CITOTOXICIDADE PELO ENSAIO MTT

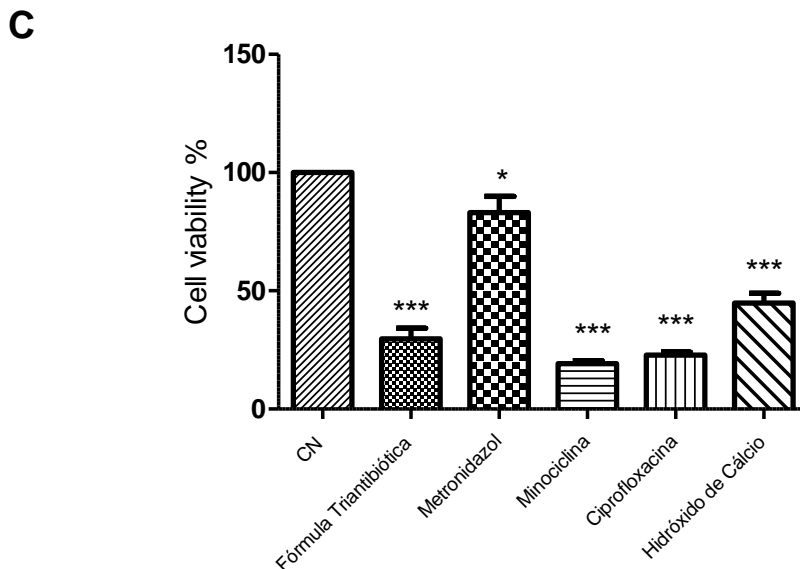
No período de 24 horas, as células da papila sob tratamento com medicação triantibiótica e minociclina apresentaram uma diminuição significativa na viabilidade celular, permanecendo com a viabilidade celular abaixo de 50% (40,54 e 36,52%, respectivamente) (Figura 9.A). O mesmo se manteve nos tratamentos por 48 (45,45 e 29,12%) e 72 hrs (29,63 e 19,2%) (Figura 9.B e C). No período de 48 hrs o hidróxido de cálcio (60,42%) e a ciprofloxacina também apresentaram uma diminuição na viabilidade celular em comparação ao controle negativo, sendo a ciprofloxacina com diminuição da viabilidade celular abaixo de 50% (32,34%) (Figura 9.B). Em 72 hrs de tratamento o hidróxido de cálcio também passou a apresentar uma viabilidade celular abaixo de 50% (44,79%) (Figura 9.C). A viabilidade celular com o tratamento com Metronidazol por 24 e 48hrs se manteve semelhante ao controle negativo (111,70 e 97,24) (Figura 9.A e B) com uma diminuição para 83,04% no período de 72 hrs de tratamento (Figura 9.C).

**A**



**B**

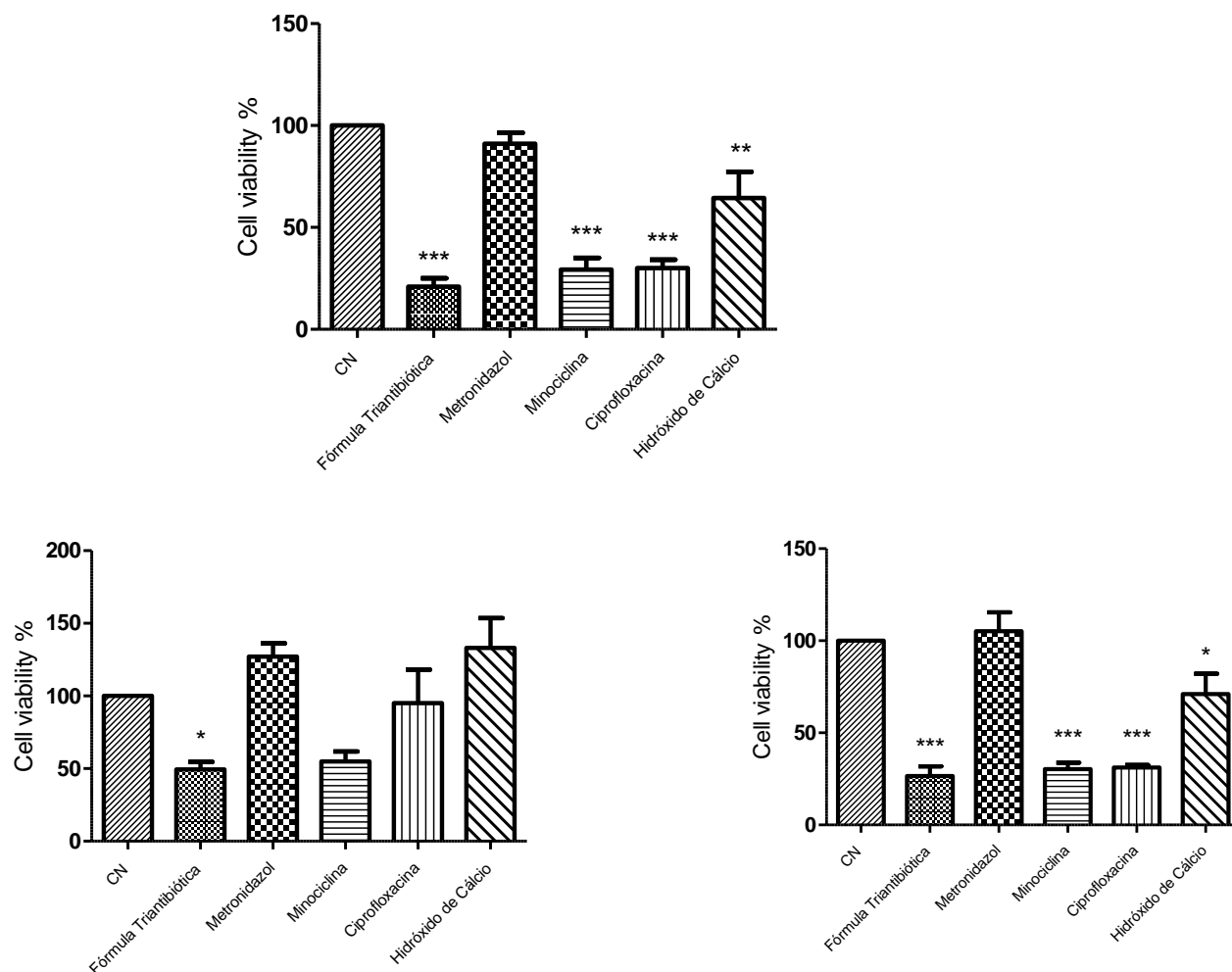




**Figura 9.** Avaliação da citotoxicidade dos antibióticos testados em células da papila. **A.** 24 horas de tratamento **B.** 48 horas de tratamento **C.** 72 horas de tratamento. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão e utilizando o controle da porcentagem, a qual foi atribuído um valor de 100%.

No período de 24 horas, as células da polpa sob tratamento com a medicação triantibiótica apresentaram uma diminuição significativa da viabilidade celular, permanecendo abaixo de 50% (49%) (Figura 10.A). O mesmo se manteve no tratamento por 48hrs (20,9%) e 72 hrs (26,6%) (Figura 10. B e C). No período de 48 hs a minociclina (29,2%) e a ciprofloxacina (30,1%) também apresentaram diminuição da viabilidade celular abaixo de 50% em comparação ao controle negativo (Figura 10.B). Em 72 hrs de tratamento o mesmo se manteve abaixo de 50% de viabilidade celular para as células tratadas com medicação triantibiótica, minociclina e ciprofloxacina (26,6, 30,37 e 31,2%) (Figura 10.C). A viabilidade celular com o tratamento com Metronidazol por 24, 48 e 72 horas se manteve semelhante ao controle negativo (127,00; 91,00; 105,21%) (Figura 10.A, B e C). No período de 24 h, as células da polpa tratadas com hidróxido de cálcio apresentaram viabilidade celular

semelhante àquelas do controle negativo (133,11%) (Figura 10.A). Nos períodos de 48 e 72 h de tratamento, houve redução do número de células viáveis (64,48; 71,05%), mantendo mais da metade da população celular, porém com diferença estatística quando comparado com o controle negativo (Figura 10.B e C).



**Figura 10.** Avaliação da citotoxicidade dos antibióticos testados em células da polpa. **A.** 24 horas de tratamento **B.** 48 horas de tratamento **C.** 72 horas de tratamento. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão e utilizando o controle da porcentagem, a qual foi atribuído um valor de 100%.

### 5.3. ANÁLISE MOLECULAR

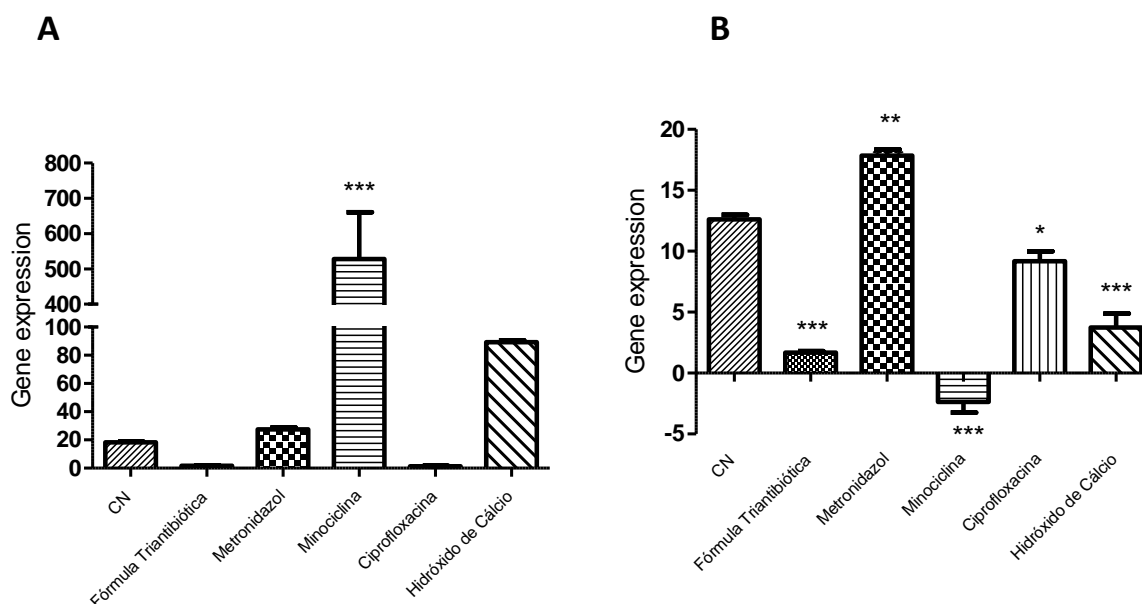


Foi avaliada a expressão dos genes representativos de diferenciação osteogênica denominados osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina (OST, OCN e ALP, respectivamente) em células tratadas com o meio de indução.

### 5.3.1. OST (Osteocalcina)

Em relação a expressão relativa do gene *OST* nas células da papila, destaca-se o tratamento com Minociclina que apresentou 28,9 vezes mais expressão gênica, quando comparado ao controle negativo (CN), que contém células apenas com DMEM. Células tratadas com hidróxido de cálcio e metronidazol apresentaram expressão gênica 4,9 e 1,5 vezes maior que o controle. A medicação triploantibiótica e a ciprofloxacina apresentaram expressões semelhantes de 1,6 e 1,4, respectivamente (Figura 11.A) sendo significativamente inferior quando comparadas ao CN.

Já nas células da polpa, em relação ao grupo CN, o tratamento com metronidazol expressou 1,4 vezes mais o gene. O tratamento com minociclina apresentou expressão negativa (-2,36), sendo 13,61 vezes inferior ao CN (Figura 11.B).

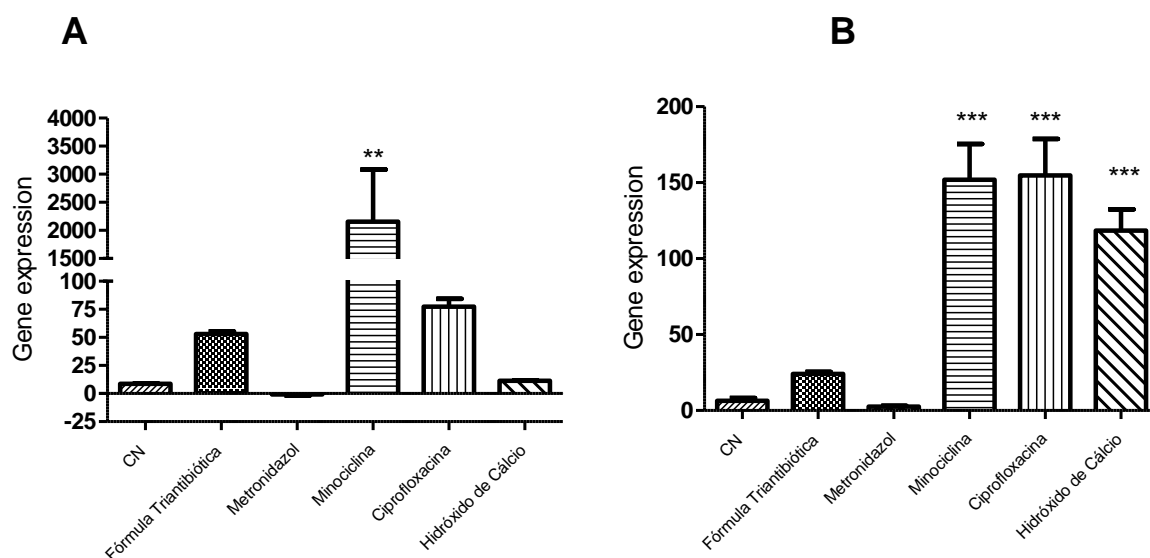


**Figura 11.** Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *OST* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador o Controle Negativo (DMEM). **A.** Células da papila; **B.** Células da polpa. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \* Representam diferenças significativas (\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett) quando comparado com o controle.

### 5.3.2. OPN (Osteopontina)

A expressão relativa do gene *OPN* nas células da papila tratadas com Minociclina, Ciprofloxacina e a medicação triantibiótica, apresentaram, respectivamente, um aumento de 246,1; 8,8 e 6,05 vezes mais, em relação ao CN. O tratamento com Metronidazol apresentou uma expressão negativa (-0,75 vezes), ou seja, 9,51 menos expressa que no controle negativo. As células tratadas com hidróxido de cálcio mantiveram a expressão do gene semelhante ao CN (Figura 12.A).

Em relação ao CN, as células da polpa tratadas com minociclina, ciprofloxacina e hidróxido de cálcio apresentaram um aumento na expressão de 24,1; 23,9; 19,14 vezes. O tratamento com a medicação triantibiótica expressou 3,79 vezes mais o gene quando comparado ao CN. Entretanto, o metronidazol, apresentou uma pequena redução da expressão do gene (3,72) quando comparado ao controle (Figura 12.B).

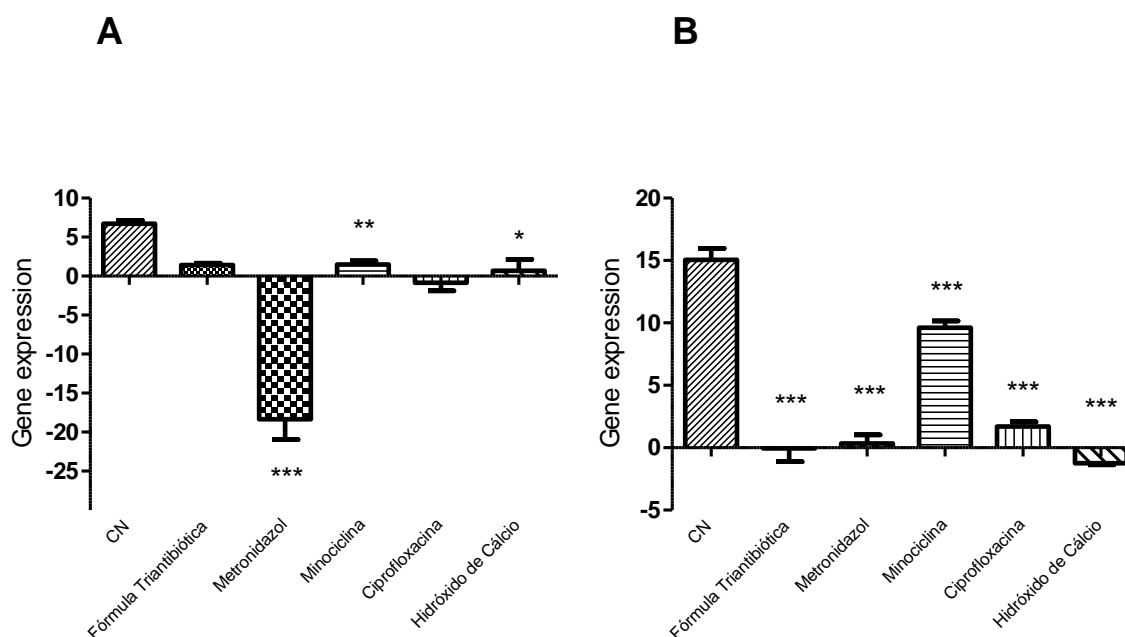


**Figura 12.** Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *OPN* e todos os grupos do estudo. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador o Controle Negativo (DMEM). **A.** Células da papila; **B.** Células da polpa. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \* Representam diferenças significativas (\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett) quando comparado com o controle.

### 5.3.3. ALP (Fosfatase Alcalina)

A expressão relativa do gene *ALP* nas células da papila tratadas com os diferentes medicamentos apresentaram expressões semelhantes, porém menores que o CN, com destaque ao metronidazol e a ciprofloxacina que tiveram expressão gênica negativa (-18,33 e -0,86, respectivamente) (Figura 13.A).

Já nas células da polpa todas as células tratadas apresentaram significativa redução na expressão do marcador quando comparados ao controle. As células tratadas com minociclina, ciprofloxacina e metronidazol apresentaram uma redução na expressão do gene em relação ao grupo controle (15,06) para 9,61; 1,70 e 0,35 respectivamente. Os tratamentos com a medicação triantibiótica e Hidróxido de cálcio apresentaram expressões negativas, sendo elas -0,04 e -1,24, respectivamente (Figura 13.B).



**Figura 13.** Resultado da quantificação relativa através de qRT-PCR do gene *ALP* e todos os grupos do estudo. **A.** Células da papila; **B.** Células da polpa. Os resultados estão apresentados utilizando como calibrador o Controle Negativo (DMEM). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão. \* Representam diferenças significativas (\*  $p < 0,1$ ; \*\*\*  $P < 0,001$ ; ANOVA seguido pelo teste de Dunnett) quando comparado com o controle.

#### 5.4. AVALIAÇÃO DA AÇÃO ANTIMICROBIANA

O biofilme bacteriano composto por *E. faecalis* e tratado com diferentes medicações intracanal mostrou-se igualmente suscetível quando em contato com a medicação triantibiótica, com a minociclina e com o hidróxido de cálcio. Entretanto, quando em contato com o metronidazol e a ciprofloxacina, esta não teve a mesma eficácia antimicrobiana.

GRUPOS	MÉDIA	+/-	SD
Medicação triantibiótica	5612,33	+ -	9,33E+07 <sup>a</sup>
Ciprofloxacina	428100,00	+ -	4,88E+09 <sup>a</sup>
Minociclina	7586,67	+ -	4,96E+07 <sup>a</sup>
Metronidazol	84866,67	+ -	5,83E+08 <sup>b</sup>
Hidróxido de cálcio	6153,33	+ -	3,95E+07 <sup>b</sup>
Controle negativo	910266,67	+ -	1,26E+10 <sup>b</sup>
Controle positivo	2553,33	+ -	1,29E+07 <sup>b</sup>

**Figura 14.** Avaliação da atividade antimicrobianas de diferentes medicações intracanal na presença do biofilme formado por *E. faecalis*.

## 6. DISCUSSÃO

### 6.1. TESTE DE CITOTOXICIDADE

Em 24 horas, na papila, o metronidazol, a ciprofloxacina e o hidróxido de cálcio ( $\text{Ca(OH)}_2$ ) não tiveram diferença estatística significativa, sendo que mantiveram a viabilidade celular próxima ao do controle negativo (CN) (cultura celular com DMEM). Entretanto, em 48 e 72 horas, apenas o metronidazol não manteve diferença estatística quando comparado ao CN. Porém, em 48 horas, apesar de apresentar diferença estatística quando comparado ao controle, o  $\text{Ca(OH)}_2$ , mantém viabilidade celular superior a 60% ficando inferior a 50% apenas em 72 horas.

Quando realizada a mesma observação com as células da polpa, percebe-se que em 24 horas não houve diferença estatística na viabilidade celular entre o CN, o  $\text{Ca(OH)}_2$ , o metronidazol e a ciprofloxacina. Já em 48 e 72 horas apenas o metronidazol e o  $\text{Ca(OH)}_2$  mantiveram a viabilidade celular superior a 50% e sem diferença estatística quando comparados ao CN.

O presente estudo está de acordo com Chuensombat et al (2013) onde os autores avaliaram os diferentes antimicrobianos que compõe a pasta triantibiótica e verificaram que todas as drogas, exceto o metronidazol, são citotóxicos às células da papila.

Apesar de reduzir a população de células da papila para 44% em 72 horas, o Hidróxido de cálcio, quando comparado com a medicação triantibiótica, é menos citotóxico (Althumairy, Teixeira e Diogenes 2014) em todos os tempos. Já nas células da polpa, o hidróxido de cálcio mantém a viabilidade celular superior a 50% em todos os tempo estudados, confirmando os estudos realizados por Alghilan et al (2016) que verifica que apenas a modificação da pasta triantibiótica, confeccionada sem a

presença da minociclina tem capacidade de manter a viabilidade celular. No presente estudo, verificou-se redução abaixo de 50% da viabilidade das células mantidas em contato com a minociclina, estando de acordo com o resultado encontrado no estudo anteriormente citado.

A medicação triantibiótica utilizada no experimento foi manipulada na concentração indicada pela Associação Americana de Endodontia e quando em contato com as células da papila apical mantém a viabilidade celular abaixo de 50% em todos os tempos estudados (24, 48 e 72 horas) estando de acordo com o observado por Alghilan et al (2016). O mesmo acontece com as células da polpa nos diferentes tempos observados. Sendo assim, deve ser considerado a substituição desta medicação por outra que assim como ela, tenha potencial antimicrobiano, sem no entanto reduzir a viabilidade celular drasticamente.

Rouhani et al (2018) avaliou a quantidade residual de  $\text{Ca(OH)}_2$ , própolis e pasta triantibiótica e verificou que ambas medicações deixam resquícios no interior do canal após o tempo de permanência necessário para descontaminação. Sendo assim, é de suma importância que considere-se a medicação a ser usada, pois sabe-se que a manutenção das células é um ponto fundamental para que o tratamento de revascularização tenha sucesso (Chrepa et al., 2017). Além disso, conforme Kitikuson e Arisuwan (2016) há um maior número de células aderidas à dentina em grupos tratados com  $\text{Ca(OH)}_2$  quando comparado as diferentes concentração da medicação triantibiótica.

## 6.2 DIFERENCIAÇÃO CELULAR

Apesar do sucesso clínico, a revascularização não promove regeneração tecidual (Torabinejad et al., 2014; Moradi et al., 2016) pois a

complementação da formação radicular acontece por aposição de tecido cementóide ou osteóide e não de tecido dentinário como seria esperado (da Silva et al., 2010; Wang et al., 2010; Tawkik et al., 2013; Torabinejad et al., 2014). Além disso, no interior do canal, está presente um tecido conjuntivo similar ao ligamento periodontal (Torabinejad et al., 2014), composto por fibroblastos cercados por fibras nervosas e vasos sanguíneos (Meschi et al., 2016).

Sendo assim, moléculas sinalizadoras para tecido ósseo como osteocalcina, osteopontina e fosfatase alcalina são utilizados como marcadores específicos para confirmar a presença de células osteoblásticas nos processo de diferenciação celular.

A matriz extracelular do osso é 100% composta por proteínas sintetizadas pelo próprio odontoblasto. 90% são proteínas colágenas (97% de colágeno tipo I e 3% de colágeno tipo V) e 10% de proteínas não-colágenas (osteocalcina, osteonectina, sialoproteínas, proteoglicanos, osteopontina, fibronectina, fatores de crescimento, BMPs e outras) (Anselme, 2000). As proteínas não colagenosas possuem efeitos celulares distintos, regulando o crescimento e a diferenciação de células sem ter um papel direto no início da formação do cristal, no progresso e no término da mineralização, mas são potentes reguladores do metabolismo ósseo (Malavalet al., 1994).

A osteocalcina é uma proteína de ligação com cálcio dependente de vitamina K, produzida exclusivamente pelos osteoblastos durante o processo de síntese da matriz óssea, sendo descrita como um promotor e inibidor da mineralização (Lemos, 2008). É a principal proteína não-colágena de osso altamente expressa em osteoblastos maduros, é a mais específica e a última a ser expressa, sendo

indetectável em pré-osteoblastos e abundantemente expressa somente em osteoblastos pós-mitóticos e maduros (Aubin, 1998b).

A osteopontina também é uma proteína não-colágena de osso e tem seu aumento regulado pela vitamina D. Além disso, tem um papel crucial na larga escala de formação da hidroxiapatita. Sua expressão é regulada em resposta aos níveis elevados de fosfato extracelular, sendo a fosfatase alcalina um de seus maiores estimulantes por estar ligada a produção de fosfato (Lemos, 2008). A osteopontina é detectável nos primeiros estágios da diferenciação tendo seus níveis regulados positivamente em alguns pré-osteoblastos e aumentados em osteoblastos (Aubin, 1998b).

Nas papila apical, as células expostas à fórmula triantibiótica e a minociclina expressam mais osteopontina (32,5 e 4,9 respectivamente). Enquanto no controle negativo, com metronidazol e com hidróxido de cálcio a expressão de osteocalcina é maior (2,37 e 7,9 vezes, respectivamente) que a expressão de osteopontina. Dessa maneira, sugere-se que as células expostas a medicação triantibiótica e a minociclina tem um perfil fenotípico característico de formação de osteoblastos imaturos, enquanto no controle negativo e com hidróxido de cálcio os osteoblastos diferenciados apresentam-se com perfil de maturidade celular.

Nas células da polpa, houve maior expressão de osteopontina quando expostas à Fórmula triantibiótica, à minociclina e ao hidróxido de cálcio (15,5; 66,6 e 32,7 vezes, respectivamente), sem diferença estatística quando comparadas ao grupo controle. Já o metronidazol apresentou 2,4 vezes menor expressão de osteopontina que o CN, havendo diferença estatística significativa.



Percebe-se que tanto na papila quanto na polpa, o controle negativo e o metronidazol apresentam maior expressão de osteocalcina que osteopontina, sugerindo que haja células diferenciadas com perfil de maturidade. Sendo o metronidazol uma medicação com baixa toxicidade, sem diferença significativa quando comparada ao grupo controle, sugere-se que haja relação direta entre a capacidade de diferenciação e maturação celular com a viabilidade das mesmas.

As células do grupo controle apresentaram maior expressão de osteocalcina na papila que na polpa, confirmando os achados de (sonoyama et al., 2008; Bakopoulou et al., 2011) que relatam que as células da papila apical exibem capacidade proliferativa e potencial de mineralização duas vezes superior as células da polpa. Sendo assim, a papila apical pode ser uma fonte melhor de células mesenquimais para as terapias de engenharia tecidual (Huang et al., 2008).

Entretanto, quando se avalia a citotoxicidade relacionada as medicações utilizadas no tratamento de revascularização, percebe-se que as células da polpa tem diferença estatística significativa quando compara-se a viabilidade celular destas entre a medicação triantibiótica e o hidróxido de cálcio. Não havendo diferença estatística entre o hidróxido de cálcio e o grupo controle, conclui-se que esta é uma medicação não tóxica para as células mesenquimais do tecido pulpar. Esta correlação não é observada com as células da papila, pois apenas em 24 horas percebe-se semelhança de resultados.

A fosfatase alcalina é um marcador das primeiras fases da formação de osteoblastos sendo também altamente positiva no meio da progressão da linhagem de osteoblastos. Comparando a expressão de fosfatase alcalina no grupo controle,

nota-se maior expressão entre as células da polpa, reforçando o menor potencial de maturidade deste grupo celular.

### 6.3 MICROBIOLOGIA

Apesar da contaminação do canal radicular ser polimicrobiana, e de encontrarmos *Enterococcus faecalis* em infecções endodônticas persistentes (Stuart et al., 2006), este foi o microrganismo de escolha por ser bastante estudado e, portanto, alvo em experimentos de desinfecção (Wall et al., 2017). É um microrganismo gram-positivo anaeróbio facultativo, que apresenta fatores importantes de resistência e alta virulência (Kayaoglu e Orstavik, 2004), capaz de adaptar-se a ambientes com privação nutricional.

Considerando a necessidade de descontaminação do canal radicular baseado no uso de substâncias químicas, faz-se o uso de agentes de irrigação como o hipoclorito de sódio (Clarckson e Moule, 1998) e de medicações intracanal, como a pasta triantibiótica (Hoshino et al., 1996) e o hidróxido de cálcio (Siqueira e Lopes, 2001).

O hipoclorito de sódio (NaOCl) é utilizado como coadjuvante na desinfecção do sistema de canais pois tem excelente eficácia bactericida (Bystrom e Sundqvist, 1981; Harisson, Wagner e Henry, 1990; Viana et al., 2006; Martinho e Gomes, 2008), capacidade de dissolução de material orgânico e serve como lubrificante para a instrumentação endodôntica (Hand, Smith e Harrison, 1978; Harisson e Hand, 1981; Yang et al., 1995). Conforme Stojicic et al (2012), quando em contato direto, destrói o biofilme de *E. Faecalis* em apenas 3 minutos. Por essa razão, foi selecionado como controle positivo para o presente estudo.

Hoshino et al. (1996) propôs o uso da pasta triantibiótica. Ainda usada atualmente, é composta de metronidazol, ciprofloxacina e minociclina (Sato et al., 1996; Hoshino et al., 1996) e demonstra ser efetiva na desinfecção do sistema de canais radiculares (Trope, 2004; Sato et al., 1996; Hoshino et al., 1996). Entretanto, algumas modificações relacionadas a concentração foram feitas com objetivo de preservar a viabilidade das células mesenquimais (Althumairy; Teixeira; Diogenes, 2014; Alghilan; Windsor; Palasuk; Yassen, 2016; AAE, 2016) sem que sua capacidade antimicrobiana seja prejudicada, (Latham, Fong e Jewett, 2016; Sabrah; Yassen, Gregory, 2013; Tagelsir et al., 2016) estando de acordo com o que foi encontrado no presente estudo.

O hidróxido de cálcio tem pH altamente alcalino, aproximando-se a 12,5 e dissocia-se em íons cálcio e hidroxila. Sua capacidade antimicrobiana está relacionada ao rompimento da membrana citoplasmática, desnaturação protéica e dano ao DNA bacteriano (Siqueira e Lopes, 2001). Conforme observado, tem potencial antimicrobiano semelhante a pasta triantibiótica.

Os resultados obtidos referindo-se a determinação do número de células microbianas viáveis após o tratamento confirmam as citações de Tagelsir, Yassen, Gomez e Gregory (2016); Shokrane, Farhad, Farhadi, Saatchi e Hasheminia (2014) e Jacobs et al., (2017) que comprovam a eficácia antimicrobiana tanto da medicação triantibiótica quanto do  $\text{Ca(OH)}_2$  (Pereira et al, 2016) sendo capazes de promover a descontaminação do sistema de canais radiculares e demonstram sucesso quando utilizados em técnicas regenerativas (Nagata et al., 2014) sem, no entanto, apresentar ação antimicrobiana residual (Jacobs et al. 2017).

Considerando-se que as medicações antibióticas foram avaliadas em conjunto e isoladamente, percebeu-se que apenas a minociclina apresentou diferença

estatística significativa quando comparada com o grupo controle negativo (água destilada) e teve sua ação semelhante ao  $\text{Ca(OH)}_2$  e a fórmula triantibiótica. Diógenes e Hargreaves (2017) ressaltam que, além de descontaminar o canal radicular, novas pesquisas devem ser realizadas avaliando o possível envolvimento de antígenos bacterianos residuais envolvidos na capacidade de proliferação e diferenciação das células da papila apical. A partir desses achados, questiona-se a ação da ciprofloxacina e do metronidazol. Entretanto, deve-se considerar o uso de monocultura e não biofilme misto como normalmente encontrado no canal radicular, o que provavelmente influenciaria no resultado.

## 7. MANUSCRITO 1

Immature Permanent Teeth with Pulp Revascularization: An update review

Daiana Flores Gonçalves Giannastasio<sup>1\*</sup>, Fernanda Majolo<sup>2\*</sup>, Denise Cantarelli Machado<sup>2</sup>, João Batista Blessmann<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Postgraduate Program in Odontology (PUCRS)*; <sup>2</sup> *Brain Institute of Rio Grande do Sul (Brains)*.

**\*Corresponding author:** Programa de Pós Graduação em Odontologia <sup>1</sup> Postgraduate Program in Odontology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90610000, Brazil. *E-mail address:* daianagiannastasio@terra.com.br

Abstract

Revascularization/revitalization therapy is an regenerative endodontics procedure for immature permanent teeth. It is an accepted treatment for the management of endodontic pathology and is used to obtain apical closure of teeth from the reestablishing blood flow. This treatment involve disinfection of root canal systems, stem cells, scaffolds, and growth factors. Many studies have shown promising results and made important conclusions beyond pulp revascularization allowing a better understanding of cellular and molecular aspects. Due to the accumulating knowledge, the aim of this revision is to present an update of all publications until now related to pulp revascularization focusing on immature permanent teeth. According to this, we noticed a significant increase in the number of studies demonstrating interest in the

subject. However, the lack of establishment of a treatment protocol, makes further research necessary.

Pulp revascularization in immature permanent teeth is a kind of treatment that function and may become a standard treatment to immature necrotic permanent teeth but there is not a based sure protocol to be followed.

**Keywords:** stem cell; incomplete root; regenerative therapy.

## **Introduction**

Loss of pulp vitality in an immature permanent tooth arrests root development. This leads to tooth with open apex short roots and thin walls. Thus, they have fragile structure and increased risk of fractures (Cvek *et al.*, 1992; Frank, 1966; Andreassen, Farik, Munkisgaard, 2002; Simom et al 2007; Reynolds; Johnson, Cohenca, 2009). So, with the objective of giving continuity to the root formation of young permanent teeth, new protocols favoring the maintenance of cell viability and stimulation of stem cells were developed. Many studies have shown promising results and made important conclusions beyond pulp revascularization in immature permanent teeth allowing a better understanding of cellular and molecular aspects. Due to the accumulating knowledge, the aim of the present revision is to present an update of all publications until now related to pulp revascularization focusing on immature permanent teeth.

### **1. Material and method**

Electronic databases, using Pubmed, were searched for articles to collect all data until now related to pulp revascularization and immature permanent teeth. Only full-text English-language articles were included. If the abstract met the inclusion

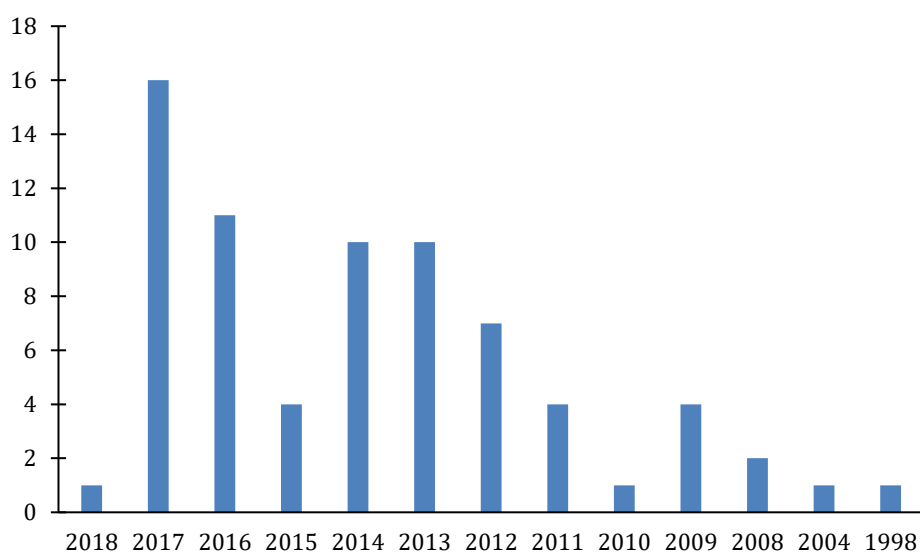
criteria, the full-text article was obtained and reviewed. The flow diagram below shows which terms have been searched in the search engine, how many articles were excluded in which steps and the reason (Figure 1).



Figure 1. Flow diagram with the terms searched in the search engine.

### 3. Results

A total of 70 studies were identified. With the past of the year, the number of publications has increased significantly (FIGURE 2). The greatest part of the studies were performed in humans (number of articles). The other studies were made in animal, that should be in dogs (x studies) or rats (x studies) (TABLE 1). The main advance related to revascularization therapy is related to establishing consensus among researchers, so that a protocol can be reached and with this a good and predictable prognosis.



**Figure 2.** Number of all published studies until now related to immature permanent teeth with pulp revascularization.

**Table 1.** update of all publications until now involving pulp revascularization approach in immature permanent teeth.

Target	Model	Major findings	Year	Reference
To evaluate the effect of exogenous stem cells from apical papillae (SCAP) in the pulp revascularization treatment for the immature permanent tooth with periapical periodontitis.	Dogs	It is difficult to achieve real tissue regeneration due to the lack of endogenous SCAP in apical area, therefore delivering adequate exogenous SCAP isolated and cultured in vitro could be a promising approach to overcome the challenge.	2018	Yang et al
To compare the effect of Nd:YAP laser and Hoshino's triple antibiotic paste on root canal disinfection in the treatment of pulp revascularization, and to provide reference for root canal disinfection in dental pulp revascularization.	Humam	Nd:YAP laser can be used for effective root canal disinfection without obvious effect on the prognosis of dental pulp revascularization.	2017	Liu et al
To evaluate the effect of age on the potential of dental pulp regeneration in young permanent teeth with periapical periodontitis.	Humam	Root canal revascularization can be widely used in the treatment of dental pulp necrosis in young permanent teeth. The closer the age is to the eruption time, the higher the potential of dental pulp regeneration, and the more suitable for root canal revascularization	2017	Cai et al
To perform a meta-analysis on apical revascularization.	Humam	Post-operative tooth-root development in immature permanent teeth represents a generalized challenge to regenerate diseased pediatric tissues that must grow to avoid organ defects.	2017	He et al
To report of two cases is to evaluate the outcome of revascularization protocol modified by fabrication of an autogenous TDM (treated dentin matrix) on root dentinal walls of necrotic immature teeth with open apices.	Humam	Modification of root regeneration through a TDM protocol may seem more predictable treatment and improve maturogenesis than traditional therapy.	2017	Mehrvarzfar et al



To design a clinical trial in which we hypothesized that there is no difference in success between immediate or delayed induction protocols.		All successful cases started at stage 9 of root development (Nolla), and the majority showed healing type 2. Determination of the stage of root formation and etiology are possible critical factors for any therapeutic decision.	2017	Botero et al
To present a series of cases, as well as gather information about revascularization, the technique, and results.	Humam	The discussion of the results leads to debate about different restorative materials and other published protocols.	2017	Carmen et al
To compare the effect of platelet rich fibrin (PRF), induced bleeding technique and Platelet Rich Plasma (PRP) in the revascularization of tooth with necrotic pulp and open apex.	Humam	Induced bleeding technique is the standard endodontic procedure for revascularization of non vital permanent tooth.	2017	Shivashankar et al
To survey endodontists on the use of these 2 treatment options (apexification and regenerative endodontics).	Humam	Endodontists consider both clinical and patient factors when treating immature teeth with pulpal necrosis. Increase in continuing education options may increase adoption of regenerative endodontic therapy.	2017	St Paul et al
To describes the histologic observation of a human immature permanent tooth clinically diagnosed as symptomatic irreversible pulpitis after a revascularization/regeneration procedure.	Humam	Regeneration of the pulplike tissue and the periodontium existed after a revascularization/regeneration procedure in an immature permanent tooth clinically diagnosed as symptomatic irreversible pulpitis.	2017	Peng et al
To assess the clinical and radiological outcomes of a revascularization procedure in immature teeth with apical periodontitis using platelet-rich plasma (PRP). The PRP protocol and conventional revascularization protocol, which used a blood clot as the scaffold, were compared.		PRP can serve as a successful scaffold for regenerative endodontic treatment. With the exception of a significant increase in root length, the results of treatment with PRP were not significantly different from those of the conventional protocol using a blood clot as the scaffold.	2017	Alagl et al
To detail a successful RET (regenerative endodontic treatment) in an immature permanent mandibular molar diagnosed with a partially necrotic pulp in an 8-year-old child.	Humam	This case supports the evidence of revascularization as a biological treatment option for the management of necrotic young permanent teeth.	2017	Schmoeckel et al
To present a case of retreatment of failed revascularization of an orthodontically treated immature traumatized permanent maxillary incisor.		Clinical, radiographic, and cone-beam computed tomography follow-up examination revealed an asymptomatic tooth, with evidence of periapical healing and root maturation.	2017	Al-Tammami et al
To evaluate the long-term clinical and radiographic outcomes of REPs of immature necrotic permanent teeth over a 30 month period.	human	Teeth treated with REPs presented resolution of symptoms. Although clinical meaningful change was not achieved in all cases, increased root thickness, root length, and apical closure were observed at 30 months.	2017	Chan et al
To define reliable methods to regenerate pulp-like tissues in tooth root segments (RSs). G1 RSs were injected with human dental pulp stem cells (hDPSCs) and human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) encapsulated in 5% gelatin methacrylate (GelMA) hydrogel. G2 RSs injected with acellular GelMA alone, and G3 empty RSs were used as controls.	Rats	GelMA hydrogels can support the formation of highly cellularized and vascularized hDPC/HUVEC-derived pulp like tissue in in vivo implanted human tooth RSs, facilitate attachment of cells to the tooth root inner dentin surface, and promote the formation of cellular extensions into the dentin tubules and elaboration of reparative dentin matrix formation. In contrast, acellular GelMA and empty tooth root constructs exhibited host cell infiltration into the pulp chamber but no host cell attachment to the tooth root inner dentin surface.	2017	Khayat et al

To evaluate the treatment effectiveness of revascularization in immature permanent teeth with diffuse pulpitis and to provide an alternative approach for the treatment of these teeth.	Humam	Pulp revascularization in young permanent teeth with diffuse pulpitis resulted in similar clinical outcomes in root development and root canal wall formation compared with the contralateral control teeth.	2017	Peng et al
To assessed the time to resolution of clinical symptoms and radiographic changes in root dimensions in immature permanent necrotic teeth with dens evaginatus.	humam	In this study, revascularization allowed the continued development of roots in teeth with necrotic pulp as well as excellent overall survival and success rates.	2017	Li et al
Revascularization/revitalization treatment protocol should be considered a permanent procedure?	Humam	This case demonstrates that once the increased thickening of the canal walls, incrementing the root length, apical closure and the total resolution of the apical lesion are observed, the main canal of a previously treated tooth with an RR procedure can be filled.	2016	Plascencia et al
To evaluate the effect of age and apical diameter on the regenerative potential of young permanent immature teeth with necrotic pulps.	Humam	Regarding the apical diameter, regeneration procedures were successful with apical diameters as small as 0.5 mm. However, teeth with preoperative wider diameters (1 mm) demonstrated greater increase in root thickness, length, and apical narrowing.	2016	Estefan et al
To investigate the outcome of the revascularization procedure in necrotic immature teeth.	Humam	Healing of periapical periodontitis and maturation of roots occurs, is fairly high, making it a viable treatment option in comparison with apexification.	2016	Bukhari et al
To examine the effect of a pulpal revascularization procedure on immature necrotic teeth with apical periodontitis.	Humam	Clinical and radiographic evidence showed successful revascularization treatments of immature necrotic permanent teeth with apical periodontitis. More studies are necessary to understand the underlying mechanisms and to perform histopathology of the pulp space contents after revascularization procedures.	2016	El Ashiry et al
To evaluate the inductive effect of platelet-rich plasma (PRP) on expression of angiogenesis factors and pulpal revascularization of immature necrotic teeth.	Dogs	PRP could not increase the formation of new vital tissue. VEGF and factor VIII played a pivotal role in the formation of new vessels inside the root canals of immature, non-vital teeth.	2016	Moradi et al
To present “unsuccessful” revascularization/revitalization treatment of permanent immature teeth with apical periodontitis.	Humam	There are numerous probable causes of revascularization/revitalization treatment failures. The most probable is residual infection or reinfection of root canal system.	2016	Zizka et al
To describe a novel method of revascularization therapy done in a non-vital, immature permanent tooth using Platelet-rich fibrin (PRF)	human	PRF is potentially an ideal scaffold material for regeneration of pulp-dentin complex in non-vital, immature permanent teeth.	2016	Nagaveni et al
This report illustrates a revascularization protocol through a case where platelet-rich fibrin (PRF) was utilized as an autologous scaffold for traumatized, necrotic, immature teeth with incomplete root development.	Humam	Demonstrates a clinically feasible protocol utilizing platelet-rich fibrin as an autologous scaffold for pulp revascularization. Studies have demonstrated that PRF is rich in growth factors, which enhances cellular proliferation, differentiation, and angiogenesis. It allows for the slow and continuous release of growth factors for revascularization and regulates inflammatory reactions.	2016	Ray et al
This case series evaluates the efficacy of revascularization procedure in immature, non vital permanent teeth.	Humam	It was concluded that the triad of a disinfected canal, a matrix (blood clot) in to which new tissue could grow and an effective coronal seal produced the desirable environment for successful revascularization.	2015	Dudeja et al

The time to resolution of clinical symptoms, radiographic periapical healing, and radiographic changes in root dimension were investigated in a cohort of patients receiving standardized revascularization/revitalization therapy in traumatized anterior teeth	Humam	Although clinical success was highly predictable with this procedure, clinically meaningful radiographic root thickening and lengthening are less predictable after 1-year of follow-up. Apical closure is the most consistent radiographic finding.	2014	Saoud et al
The aim of this case report was to describe a new proposal for pulp revascularization with disinfection of pulp canal space using a unique combination of a photosensitizer solution and low-power laser light.	Humam	This report of pulp revascularization shows that disinfection with photodynamic therapy combined with platelet-rich fibrin leads to satisfactory root development in necrotic immature teeth.	2014	Johns et al
The purpose of this study was to investigate the effect of conditioned medium (CM) from murine preameloblasts on the cellular differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs) in immature teeth with necrotic pulp and apical periodontitis.	Dog	CM from preameloblasts rendered a favorable effect in providing a physiologic microenvironment for the differentiation of MSCs after revascularization treatment.	2014	Yoo et al
To present a case of pulp revascularization in a severely intruded immature maxillary right incisor.	Human	Although revascularization can promote continued root development and root dentin apposition, long-term root canal treatment may be required due to treatment results with periapical inflammation in intruded teeth with open apices.	2014	Cantekin et al
These three case reports describe the treatment of necrotic or immature teeth with periradicular periodontitis, which was not treated with conventional apexification techniques.	Humam	Our clinical observations support a shifting paradigm toward a biologic approach by providing a favorable environment for tissue regeneration. The mechanism of this continued development and formation of the root end and faster tissue healing is discussed.	2014	Shieh-zadeh et al
The purpose of this case report was to describe successful revascularization treatment of an immature mandibular right second premolar with apical periodontitis in a 9-year-old female patient.		The successful outcome of this case suggests that MTA is reliable and effective for endodontic treatment in the pediatric dentistry.	2014	Saeki et al
To evaluate the microbial composition of traumatized immature teeth and assessed their reduction during different stages of the revascularization procedures performed with 2 intracanal medicaments. (TAP X calcium hydroxide + 2% chlorhexidine gel)	Humam	The greatest bacterial reduction was promoted by the irrigation solutions. The revascularization protocols that used the tested intracanal medicaments were efficient in reducing viable bacteria in necrotic immature teeth.	2014	Nagata et al
This article reports the management of type II DI in a child with dental anxiety and supraventricular tachycardia (SVT) who presented with an infected necrotic pulp of the permanent maxillary left lateral incisor (plug MTA) and later, facial cellulitis associated with a necrotic pulp of the permanent maxillary right lateral incisor (revascularization).	Humam	This case demonstrates possible pulpal regeneration of an infected maxillary right lateral incisor with dens invaginatus and an immature apex after minimal canal debridement.	2014	Kumar et al
The present study was performed to assess the regenerative potential of young permanent	Humam	The regenerative endodontic procedure allowed the continued development of roots in teeth with necrotic pulps. The use of artificial	2014	Nagy et al

immature teeth with necrotic pulp after the following treatment protocols: (1) a mineral trioxide aggregate (MTA) apical plug, (2) the regenerative endodontic protocol (blood clot scaffold), and (3) the regenerative endodontic protocol with a blood clot and an injectable scaffold impregnated with basic fibroblast growth factor.		hydrogel scaffold and basic fibroblast growth factor was not essential for repair.		
To evaluate and compare apexogenesis induced by revascularization, with and without platelet rich plasma (PRP) in non-vital, immature anterior teeth.	Humam	There was a marked difference in periapical healing, apical closure and dentinal wall thickening of teeth treated by revascularization with PRP.	2013	Jadhav et al
To describe histologically a human immature mandibular premolar after a revascularization/revitalization procedure that initially had infected necrotic pulp and a chronic apical abscess.	Humam	The tissue formed in the canal of a human revascularized/revitalized tooth was soft connective tissue similar to that in the periodontal ligament and cementum-like or bone-like hard tissue.	2014	Becerra et al
Despite of increasing numbers of case reports, a uniform treatment protocol has not been set.		The outcome should be evaluated radiographically and clinically. Currently, this procedure should be limited to incisor or premolar teeth in which the crown is longer than the root, or the canal's width is larger than that of the dentinal wall.	2013	Slutzky-Goldberg & Heling
The present regenerative therapy of a traumatized immature maxillary central incisor with apical abscess was compared with contralateral tooth that treated using vital pulp therapy.	Humam	Considering the root development of these contralateral teeth it can be concluded that revascularization is an appropriate treatment method in immature necrotic teeth.	2013	Forghani et al
These 3 case reports the outcome of revascularization treatment in necrotic immature molars.	humam	Revascularization/regeneration using 3Mix-MP method could be effective for managing immature permanent molar teeth with pulpal necrosis.	2013	Sonmez et al
To present two case reports describing the treatment of immature teeth with necrotic pulps using concentrated platelet-rich plasma (cPRP) with 12-month clinical and radiographic follow-up.	Humam	At the 12-month follow-up apical closure by narrowing of the apical foramen and convergence of the apical walls in the treated teeth was observed.	2013	Bezgin et al
To test the effectiveness of pulp revascularization in the treatment of immature dens invaginatus with periapical periodontitis, this article presents a clinical case applying pulp revascularization as a conservative method to successfully treat a maxillary lateral incisor with necrotic pulp, type II dens invaginatus, and large periapical lesion.	Humam	For type II immature dens invaginatus with large periapical lesion, conservative endodontic treatment should be considered before periapical surgery. With sufficient infection control, pulp revascularization can be an effective alternative method.	2013	Yang et al
To observe the effect of revascularization for treatment of immature teeth with endodontic infection mediated by calcium hydroxide.	Humam	Revascularization by calcium hydroxide sealing can promote root development of immature permanent teeth with pulpitis or periradicular periodontitis.	2013	Huang et al
To discuss the clinical and radiological outcome of a revascularization procedure in an immature tooth with a necrotic pulp using platelet-rich fibrin	Humam	At 12- and 15-month follow-up, the tooth responded positively to cold and an electric pulp test, and similarly to adjacent lateral incisor and canine teeth. Radiographic examination demonstrated continued thickening	2013	Keswani & Pandey

(PRF), a second- generation platelet concentrate.		of root canal walls, root lengthening and apical closure		
To assess the regenerative potential of immature teeth with necrotic pulps following revascularization procedure in dogs.	Dogs	The revascularization procedure allowed the continued development of roots in teeth with necrotic pulps.	2013	Tawfik et al
Presented here is a variant approach for the treatment of immature dens invaginatus type II with periapical periodontitis, which combines filling of the invagination and pulp revascularization.	Humam	For type II immature dens invaginatus with large periapical lesion, conserva- tive endodontic treatment should be considered before periapical surgery. With sufficient infection control, pulp revascularization can be an effective alternative method.	2013	Yang et al
To present a case of pulp revascularization in an immature necrotic tooth	Humam	With an increasing breadth of clinical evidence and practitioner acceptance, regenerative techniques may become a standard technique in treating immature necrotic permanent teeth.	2012	Gelman & Park
To report on the use of a technique of revascularization for necrotic immature permanent teeth, several problems encountered, and solutions to those problems.	Humam	Three problems were encountered during the treatment: (1) bluish discoloration of the crown; (2) failure to produce bleeding; and (3) collapse of the mineral trioxide aggregate (MTA) material into the canal. Modifications to solve these problems included: changing one of the antibiotics, using a local anesthesia without epinephrine, and adding collagen matrix to the blood clot.	2012	Dabbaqh et al
To evaluate radiographic and clinical outcomes of immature teeth treated with 1 of these 3 methods. (22 calcium hydroxide apexification cases, 19 MTA apexification cases, and 20 revascularization cases)	Human	Revascularization was associated with significantly greater increases in root length and thickness in comparison apexification as well as excellent overall survival rates.	2012	Jeeruphan et al
To describe the management of severely extruded immature maxillary incisors and the outcome of revascularization to treat subsequent pulp necrosis	Human	Complete periradicular healing was observed after 3 months, followed by progressive thickening of the root walls and apical closure. Follow-up observations confirmed the efficacy of the regenerative treatment as a viable alternative to conventional apexification in endodontically involved, traumatized immature teeth.	2012	Cehreli ZC, Sara S, Aksoy B.
To describe the histological findings of tissue formed in the canal space of an immature permanent tooth with irreversible pulpitis without apical periodontitis after revascularization.	Human	Regeneration of pulp-like tissue is possible after revascularization.	2012	Shimizu et al
To identify potentially important parameters that can guide the design of future prospective clinical trials. To report conditions in which it was not necessary to evoke intracanal bleeding to have continued root development.	Humam	Regeneration/revascularization of the nonvital immature permanent tooth constitute a growing case series suggesting that biologically based treatment approaches might be of particular value in restoring root development and apical closure in these otherwise difficult cases.	2012	Jung et al
To review and discuss the strategies available for the regeneration of tooth tissues based on principles of tissue engineering. revisão sistemática		The field of tissue engineering has recently shown promising results and is a good prospect in dentistry for the development of the ideal restorations to replace the lost tooth structure.	2012	Pramila & Muthu

The purpose of this report was to present the revascularization of an immature permanent maxillary central incisor that had evidence of external root resorption.	Human	At 18 months, the tooth remained vital and had evidence of continued root development.	2012	Miller et al
To report several types of response of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and either apical periodontitis or abscess to revascularization procedures.	Human	Five types of responses of these immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures were observed.	2011	Chen et al
To describe the successful revascularization treatment of an immature maxillary lateral incisor that was initially diagnosed with apical periodontitis.	Human	The follow-up showed evidence of progressive thickening of the dentinal walls, development of root length and apical closure.		Kottoor et al
To demonstrate the outcome of revascularization treatment with intracanal medicament of calcium hydroxide in immature necrotic molars.	Human	The present cases demonstrate a favorable outcome of the revascularization procedure in immature necrotic molars by using calcium hydroxide medication in the coronal third of the root canals.	2011	Cehereli et al
To determine the effect of sodium hypochlorite (NaOCl) on human pulp cells to provide an aid in determining its optimum concentration in maintaining the viability of remaining pulp cells in the revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis.	Human (in-vitro)	The lowest concentration of NaOCl tested did not affect the viability of cells. This may prove beneficial in developing a new treatment protocol to help preserve existing vital pulp cells in revascularization cases.	2011	Essner et al
An immature mandibular central incisor with periapical involvement was treated to promote revascularization using copious irrigation with dressing of calcium hydroxide compound for disinfection. The case was observed for up to 13 years and root development was confirmed.	Human	The larger the diameter of the apical foramen, the more blood supply into the root canal would be anticipated. In the present case, the diameter was more than 1.1 mm as measured on the radiograph taken at the initial visit.	2011	Iwaya et al
To describe successful revascularization treatment of 2 necrotic immature first mandibular molars.	Human	Revascularization is a realistic treatment in immature necrotic molars. In addition, placing calcium enriched mixture (CEM) cement as a new endodontic biomaterial over the blood clot formed inside the canals provided good seal and favorable outcomes.	2011	Nosrat et al
To present a coronal discoloration after triple antibiotic therapy in an immature tooth. Additional objectives were to (1) investigate the possible cause of the discoloration and (2) assess the performance of a dentin bonding agent in the prevention of tooth discoloration.		The possible esthetic problems with the tooth color should be considered when using minocycline as a canal medication.	2010	Kim et al
To describe a case in which a mandibular right second premolar with a necrotic pulp, sinus tract, periradicular radiolucency and an immature apex underwent revascularization via a single treatment approach.	Human	The noninstrumentation procedure using 6% NaOCl and 2% chlorhexidine coronal irrigation may help preserve the remaining vital dental pulp stem cells believed to be critical for pulp revascularization. A single visit pulp revascularization protocol can be a favourable treatment option for an immature permanent tooth with a partially necrotic pulp.	2009	Shin et al
To present the case of a patient wherein revascularization of the necrotic infected pulp space of an immature permanent maxillary		This treatment approach offers clinicians great potential to avoid the need for traditional apexification and can help rescue infected	2009	Thibodeau et al

central incisor tooth was induced in vivo by stimulation of a blood clot from the periapical tissues into the canal space.		immature teeth by physiologically strengthening the root walls.		
To examine the effect of a pulpal revascularization procedure for immature necrotic teeth with apical periodontitis.	Human	Revascularization could be effective for managing immature permanent teeth with apical periodontitis with appropriate case selection.	2009	Ding et al
To present a case report in which the pulp of two bilateral mandibular premolars with dens evaginatus were revascularized using a modified novel technique to avoid undesired crown discolouration.	Human	During the 18-month follow-up period the patient remained asymptomatic. Clinically, both mandibular second premolars responded within normal limits to cold test using 1, 1, 1, 2-tetrafluoroethane. No tenderness to percussion or palpation was noted and the periodontal examination revealed no pocket depths over 3 mm and normal physiological mobility. The radiographs demonstrated evidence of periradicular bone healing and significant root development with maturation of the dentine as compared with the preoperative radiographs .	2009	Reynolds et al
To determine the level of agreement between pediatric dentists and endodontists at a pulp therapy symposium conjointly sponsored by the American Association of Endodontists (AAE) and the American Academy of Pediatric Dentistry (AAPD).		Pulp revascularization and regeneration will be viable treatment modalities in the future. The AAE and the AAPD are positioned to begin preparation of best practice guide-lines that share common language and treatment recommendations for pulp therapies performed by both specialties.	2008	Seale & Glickman
To report conditions in which it was not necessary to evoke intracanal bleeding to have continued root development.	Human	Biologically based treatment approaches might be of particular value in restoring root development and apical closure in these otherwise difficult cases.	2008	Jung et al
To present a new technique to revascularize immature permanent teeth with apical periodontitis	Human	The combination of a disinfected canal, a matrix into which new tissue could grow, and an effective coronal seal appears to have produced the environment necessary for successful revascularization.	2004	Banchs et al

## Discussion

Root canal revascularization was first introduced in the 1970s by Dr Nygaard Otsby. It is a biologically based procedure designed to replace damaged tooth structures by regenerating the pulp-dentin complex by using the principles of tissue engineering. This therapy may be considered a tissue engineering procedure whose purpose is to restore, maintain or improve tissue function (Hargreaves, Geisler, Henry, Wang, 2008). Revascularization can be widely used in the treatment of dental pulp necrosis in young permanent teeth (Cai et al, 2017; Feiqin et al, 2017) and is a valuable

treatment for nonvital immature teeth, allowing continuation of root development (Jung et al, 2008; Cehereli et al, 2011; Miller et al, 2012; Pramila & Muthu, 2012; Tawfik et al, 2013; Bezgin et al, 2013; Nagata et al, 2014; Mehrvarzfar et al, 2017; Schmoeckel et al, 2017).

It depends of the disinfected canal, the scaffold, in which new tissue/cells could grow and an effective coronal seal producing the desirable environment for successful revascularization (Dudeja et al, 2015). Besides that, there must be interaction between undifferentiated cells, signaling molecules that promote cell growth, proliferation and differentiation (Hargreaves, Geisler, Henry, Wang, 2008; Langer, Vacanti, 1993). The American Association of Endodontists (AAE), recognize that the revascularization treatment must considered the case selection as: 1) tooth with necrotic pulp and an immature apex; 2) pulp space not needed for post/core, final restoration; 3) compliant patient/parent; 4) patients not allergic to medicaments and antibiotics necessary to complete procedure (ASA 1ou 2).

According to Thibodeau et al. (2007), even if the treatment protocol is correctly executed, there is no continuity of root formation in the presence of bacteria. The greatest bacterial reduction was promoted by the irrigation solutions (Yang et al, 2013). Therefore, the association of irrigation with sodium hypochlorite (Windley, Teixeira, Levin, Sigurdsson, trope, 2005; Chueh, Huang, 2006; Thibodeau, Teixeira, Yamauchi, Caplan, Trope, 2007; Bose, Nummikoski, Hargreaves 2009), with the triantibiotic paste (metronidazole, ciprofloxacin and minocycline) (Sato, Kurihara-Ando, Kota, Iwaku, Hoshino, 1996; Hoshino et al, 1996; Shin et al, 2009; Sonmez et al, 2013; Nagata et al, 2014) or hidróxido de cálcio (Nagata et al, 2014; Shokraneh et al , 2014; Talgesir et al, 2016; Jacobs et al, 2017), is shown to be effective in the disinfection of the root



canal system. The lowest concentration of NaOCl irrigant tested did not affect the viability of stem cells.

Dentin stores growth factors and cytokines (Robert-Clark, Clark, Smith, 2000; Goldberg, Smith, 2004; Smith, 2003; Cooper, Takahashi, Grahem, 2010) that function as a reservoir of signaling molecules for growth and pro-angiogenic effects (Robert-Clark, Smith, 2000; Cassidy et al 1997). The blood clot will serve as a scaffold, a three-dimensional structure that provides support for the stabilization of cells and the source of growth factors that will direct cellular differentiation (Thibodeau et al, 2007; Murray, Garcia-Godoy, Hargreaves, 2007; Hargreaves, Geisler, Henry, Wang, 2008; Lovelace et al, 2011).

Han et al. (2010) suggest that by providing a microenvironment similar to that present in the apical region of immature teeth, it is possible that undifferentiated mesenchymal cells progress to the development of cementum-like tissue and periodontal ligament. Revascularization may be considered the first treatment option for teeth with pulp necrosis and incomplete rizogenesis. However, it does not exclude the possibility that, in case of failure, it will be necessary to apply the MTA or calcium hydroxide (Diogenes, Ruparel, Shiloah, Hargreaves, 2016).

Apical revascularization cases are examples of cell homing (He et al, 2017). SCAP has an important role in the treatment when infection is well controlled in young permanent teeth with periapical periodontitis (Yang et al, 2018). The apical papilla and the Hertwig's epithelial root sheath may survive in an immature permanent tooth despite irreversible pulpitis but without apical periodontitis (Shimizu et al, 2012). Younger age groups were better candidates for revascularization procedure than older ones (Iwaya et al, 2011; Estefan et al, 2016) and the smaller the root formation, the more appropriate for revascularization of the root canal (Cai et al, 2017). However,

teeth with preoperative wider diameters (1 mm) demonstrated greater increase in root thickness, length, and apical narrowing (Estefan et al, 2016).

Pulp revascularization in young permanent teeth with diffuse pulpitis resulted in similar clinical outcomes in root development and root canal wall formation compared with the contralateral control teeth, but reinfection might occur (Forghani et al, 2013; Peng et al, 2017). Nevertheless, it has been shown that continued root development including apical closure and root thickening is possible in the absence of true pulp regeneration (Feiqin et al, 2017). On the other hand, Peng et al (2017) says that regeneration of the pulplike tissue and the periodontium existed after a revascularization/regeneration procedure in an immature permanent tooth clinically diagnosed as symptomatic irreversible pulpitis. Anyway, for El Ashiry et al (2016), more studies are necessary to understand the underlying mechanisms and to perform histopathology of the pulp space contents after revascularization procedures.

As it must have a three-dimensional structure that supports cells, the induced bleeding is the standard endodontic procedure for revascularization (Shivashankar et al, 2017). Alagl et al (2017) compare the results of treatment with platelet-rich plasma (PRP) and saw that were not significantly different from those of the conventional protocol using a blood clot as the scaffold. PRP could not increase the formation of new vital tissue (Moradi et al, 2016). In contrast, Ray et al (2016) demonstrates that Platelet-rich fibrin (PRF) is rich in growth factors, which enhances cellular proliferation, differentiation, and angiogenesis and allows slow and continuous release of growth factors for revascularization as an autologous scaffold for pulp revascularization. Nagaveni et al (2016) says that PRF is an ideal scaffold material for this kind of treatment. In this study they refer to regeneration but says that more long term prospective trials and histological studies are strictly needed. This prevents them from

asserting that tissue regeneration occurs, because they don't have the histologic responses about. As Becerra et al (2014) say, the tissue formed in the canal of a human revascularized/revitalized tooth was soft connective tissue similar to that in the periodontal ligament and cementum-like or bone- like hard tissue.

Clinical, radiographic, and cone-beam computed tomography follow-up examination revealed an asymptomatic tooth, with evidence of periapical healing and root maturation (Reynolds et al, 2009; Kewani & Pandey, 2013; Chen et al, 2015; El Ashiry et al, 2016; Al-Tammami et al, 2017), showing continued development of roots in teeth with necrotic pulp as well as excellent overall survival and success rates (Li et al, 2016) and resolution of symptoms (Chan et al, 2016). Complete periradicular healing was observed after 3 Months, followed by progressive thickening of the root walls and apical closure (Cehereli et al, 2012). Investigating retrospective case series about of the revascularization outcome, the healing of periapical periodontitis and maturation is fairly high, making it viable treatment option in comparison with apexification (Bukhari et al, 2016). Although clinical success was highly predictable with this procedure, clinically meaningful radiographic root thickening and lengthening are less predictable after 1-year follow-up (Saoud et al, 2014). Diferent from the others authors, Plascencia et al (2016) relate that once the increased thickening of the canal walls, incrementing the root length, apical closure and the total resolution of the apical lesion are observed, the main canal of a previously treated tooth with an revascularization/revitalization procedure can be filled.

Many authors considered this a successful technic, but there are numerous probable causes of revascularization/revitalization treatment failures. The most probable is residual infection in the root canal system (Zizka et al, 2016). Three problems can be encountered during the treatment: (1) bluish discoloration of the

crown; (2) failure to produce bleeding; and (3) collapse of the mineral trioxide aggregate (MTA) material into the canal (Slutzky-Goldberg & Heling, 2013; Dabbaqh et al, 2012).

However, apical revascularization represents a challenge to tooth-root development, because lacks consistency in promoting root lengthening, widening or apical closure (He et al, 2017). Probably, the determination of the stage of root formation and etiology are possible critical factors for this therapeutic decision.

## 1. Conclusion

Regenerative techniques may become a standard treatment to immature necrotic permanent teeth (Gelman & Park, 2012). Revascularization was associated with significantly greater increases in root length and thickness (Jeeruphan et al, 2012) and apical closure is the most consistent radiographic finding (Saoud et al, 2014). As could be saw in the articles, there are so many doubts to solve. It's a kind of treatment that function but there is not a based sure protocol to be followed, showing us the importance to continue investigating this issue. Maybe, the main advance related to revascularization therapy should be to establish a consensus among researchers, because it is important to have a treatment protocol in an attempt to obtain good and predictable prognosis.

**Acknowledgement:** The authors are grateful to CAPES-Brazil and the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) for the scholarships for the first and second authors.

Declarations of interest: none.

## References

Czvek M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. *Endodontics Dental Traumatology*, v. 8, n. 2, p. 45-55, 1992. DOI: [10.1111/j.1600-9657.1992.tb00228.x](https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1992.tb00228.x)

Frank A. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. *J Am Dent Association*. 1066 7(1):78-93. DOI: [10.14219/jada.archive.1966.0017](https://doi.org/10.14219/jada.archive.1966.0017)

Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental Traumatology*. 2002 18(3):134-137. DOI: [10.1034/j.1600-9657.2002.00097.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2002.00097.x)

Simon S, Rilliard F, Berdol A, Machtou P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod Journal*. 2007 46:186-197. DOI: [10.1111/j.1365-2591.2007.01214.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2007.01214.x)

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J*. 2009 Jan;42(1):84-92. doi: [10.1111/j.1365-2591.2008.01467.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01467.x)

Yang J, Wang WJ, Jia WQ, Zhao YM, Ge LH. Effect of exogenous stem cells from apical papillae in the pulprevascularization treatment for the immature permanent tooth with periapical periodontitis. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2018 Jul 9;53(7):459-465. doi: [10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2018.07.006](https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2018.07.006).

Liu X, Yao YF, Xu XY. Application of Nd:YAP laser in dental pulp revascularization. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 2017 Dec;26(6):628-632.

Cai WF, Li S, Xie L, Yao LL, Wang CH, Ren ZH. Influence of age on the effectiveness of revascularization in immature permanent teeth. Shanghai Kou Qiang Yi Xue. 2017 Oct;26(5):545-548.

He L, Zhong J, Gong Q, Kim SG, Zeichner SJ, Xiang L, Ye L, Zhou X, Zheng J, Liu Y, Guan C, Cheng B, Ling J, Mao JJ. Treatment of Necrotic Teeth by Apical Revascularization: Meta-analysis. Sci Rep. 2017 Oct 24;7(1):13941. doi: 10.1038/s41598-017-14412-x.

Mehrvarzfar P<sup>1</sup>, Abbott PV<sup>2</sup>, Akhavan H<sup>1</sup>, Savadkouhi ST<sup>1</sup>. Modified Revascularization in Human Teeth Using an Intracanal Formation of Treated Dentin Matrix: A Report of Two Cases. J Int Soc Prev Community Dent. 2017 Jul-Aug;7(4):218-221. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD\_80\_17. Epub 2017 Jul 31.

Botero TM, Tang X, Gardner R, Hu JCC, Boynton JR, Holland GR. Clinical Evidence for Regenerative Endodontic Procedures: Immediate versus Delayed Induction? J Endod. 2017 Sep;43(9S):S75-S81. doi: 10.1016/j.joen.2017.07.009.

Carmen L, Asunción M, Beatriz S, Rosa YV. Revascularization in Immature Permanent Teeth with Necrotic Pulp and Apical Pathology: Case Series. Case Rep Dent. 2017;2017:3540159. doi: 10.1155/2017/3540159. Epub 2017 Aug 3.

Shivashankar VY, Johns DA, Maroli RK, Sekar M, Chandrasekaran R, Karthikeyan S, Renganathan SK. Comparison of the Effect of PRP, PRF and Induced Bleeding in the Revascularization of Teeth with Necrotic Pulp and Open Apex: A Triple Blind Randomized Clinical Trial. J Clin Diagn Res. 2017 Jun;11(6):ZC34-ZC39. doi: 10.7860/JCDR/2017/22352.10056. Epub 2017 Jun 1.

St Paul A, Phillips C, Lee JY, Khan AA. Provider Perceptions of Treatment Options for Immature Permanent Teeth. *J Endod.* 2017 Jun;43(6):910-915. doi: 10.1016/j.joen.2017.01.038. Epub 2017 Apr 27.

Peng C, Zhao Y, Wang W, Yang Y, Qin M, Ge L. Histologic Findings of a Human Immature Revascularized/Regenerated Tooth with Symptomatic Irreversible Pulpitis. *J Endod.* 2017 Jun;43(6):905-909. doi: 10.1016/j.joen.2017.01.031. Epub 2017 Apr 14.

Alagl A, Bedi S, Hassan K, AlHumaid J. Use of platelet-rich plasma for regeneration in non-vital immature permanent teeth: Clinical and cone-beam computed tomography evaluation. *J Int Med Res.* 2017 Apr;45(2):583-593. doi: 10.1177/0300060517692935. Epub 2017 Jan 1.

Schmoeckel J, Mourad MS, Splieth CH, Santamaria RM. Management of an immature, partially necrotic permanent molar by pulp revascularization: Two-year follow-up. *Quintessence Int.* 2017;48(4):309-313. doi: 10.3290/j.qi.a37801.

Al-Tammami MF, Al-Nazhan SA. Retreatment of failed regenerative endodontic of orthodontically treated immature permanent maxillary central incisor: a case report. *Restor Dent Endod.* 2017 Feb;42(1):65-71. doi: 10.5395/rde.2017.42.1.65. Epub 2016 Oct 28.

Chan EK, Desmeules M, Cielecki M, Dabbagh B, Ferraz Dos Santos B. Longitudinal Cohort Study of Regenerative Endodontic Treatment for Immature Necrotic Permanent Teeth. *J Endod.* 2017 Mar;43(3):395-400. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.035. Epub 2017 Jan 19.

Khayat A, Monteiro N, Smith EE, Pagni S, Zhang W, Khademhosseini A, Yelick PC. GelMA-Encapsulated hDPSCs and HUVECs for Dental Pulp Regeneration. *J Dent Res.* 2017 Feb;96(2):192-199. doi: 10.1177/0022034516682005. Epub 2016 Dec 15.

Peng CF, Zhao YM, Yang Y, Liu H, Qin M. Retrospective analysis of pulp revascularization in immature permanent teeth with diffuse pulpitis]. *Zhonghua*

Kou Qiang Yi Xue Za Zhi. 2017 Jan 9;52(1):10-15. doi: 10.3760/cma.j.issn.1002-0098.2017.01.003.

Li L, Pan Y, Mei L, Li J. Clinical and Radiographic Outcomes in Immature Permanent Necrotic Evaginated Teeth Treated with Regenerative Endodontic Procedures. J Endod. 2017 Feb;43(2):246-251. doi: 10.1016/j.joen.2016.10.015. Epub 2016 Dec 9.

Plascencia H, Cruz Á, Díaz M, Jiménez AL, Solís R, Bernal C. Root Canal Filling after Revascularization/Revitalization. J Clin Pediatr Dent. 2016;40(6):445-449.

Estefan BS, El Batouty KM, Nagy MM, Diogenes A. Influence of Age and Apical Diameter on the Success of Endodontic Regeneration Procedures. J Endod. 2016 Nov;42(11):1620-1625. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.020. Epub 2016 Sep 9.

Bukhari S, Kohli MR, Setzer F, Karabucak B. Outcome of Revascularization Procedure: A Retrospective Case Series. J Endod. 2016 Dec;42(12):1752-1759. doi: 10.1016/j.joen.2016.06.021. Epub 2016 Oct 7.

El Ashiry EA, Farsi NM, Abuzeid ST, El Ashiry MM, Bahammam HA. Dental Pulp Revascularization of Necrotic Permanent Teeth with Immature Apices. J Clin Pediatr Dent. 2016;40(5):361-6. doi: 10.17796/1053-4628-40.5.361.

Moradi S, Talati A, Forghani M, Jafarian AH, Naseri M, Shojaeian S. Immunohistological Evaluation of Revascularized Immature Permanent Necrotic Teeth Treated by Platelet-Rich Plasma: An Animal Investigation. Cell J. 2016 Fall;18(3):389-96. Epub 2016 Aug 24.

Žižka R, Buchta T, Voborná I, Harvan L, Šedý J. Root Maturation in Teeth Treated by Unsuccessful Revitalization: 2 Case Reports. J Endod. 2016 May;42(5):724-9. doi: 10.1016/j.joen.2016.02.004. Epub 2016 Mar 5.

Nagaveni NB, Pathak S, Poornima P, Joshi JS. Revascularization Induced Maturogenesis of Non-Vital Immature Permanent Tooth Using Platelet-Rich-Fibrin: A



Case Report. *J Clin Pediatr Dent.* 2016 Winter;40(1):26-30. doi: 10.17796/1053-4628-40.1.26.

Ray HL Jr, Marcelino J, Braga R, Horwat R, Lisien M, Khaliq S. Long-term follow up of revascularization using platelet-rich fibrin. *Dent Traumatol.* 2016 Feb;32(1):80-4. doi: 10.1111/edt.12189. Epub 2015 Jun 11.

Dudeja PG, Grover S, Srivastava D, Dudeja KK, Sharma V. Pulp Revascularization- It's your Future Whether you Know it or Not? *J Clin Diagn Res.* 2015 Apr;9(4):ZR01-4. doi: 10.7860/JCDR/2015/10149.5768. Epub 2015 Apr 1.

Saoud TM, Zaazou A, Nabil A, Moussa S, Lin LM, Gibbs JL. Clinical and radiographic outcomes of traumatized immature permanent necrotic teeth after revascularization/revitalization therapy. *J Endod.* 2014 Dec;40(12):1946-52. doi: 10.1016/j.joen.2014.08.023. Epub 2014 Oct 16.

Johns DA, Shivashankar VY, Krishnamma S, Johns M. Use of photoactivated disinfection and platelet-rich fibrin in regenerative Endodontics. *J Conserv Dent.* 2014 Sep;17(5):487-90. doi: 10.4103/0972-0707.139850.

Yoo YJ, Lee W, Cho YA, Park JC, Shon WJ, Baek SH. Effect of conditioned medium from preameloblasts on regenerative cellular differentiation of the immature teeth with necrotic pulp and apical periodontitis. *J Endod.* 2014 Sep;40(9):1355-61. doi: 10.1016/j.joen.2014.02.009. Epub 2014 Apr 16.

Cantekin K, Herdem G, Peduk K. Revascularization in an immature necrotic permanent incisor after severe intrusive luxation injury: a case report. *Eur J Paediatr Dent.* 2014 Jul;15(2 Suppl):203-6.

Shiehazadeh V, Aghmasheh F, Shiehazadeh F, Joulae M, Kosarieh E, Shiehazadeh F. Healing of large periapical lesions following delivery of dental stem cells with an injectable scaffold: new method and three case reports. *Indian J Dent Res.* 2014 Mar-Apr;25(2):248-53. doi: 10.4103/0970-9290.135937.

Saeki K, Fujita Y, Shiono Y, Morimoto Y, Maki K.

Pulp revascularization in immature permanent tooth with apical periodontitis using mineral trioxide aggregate. *Case Rep Med.* 2014;2014:564908. doi: 10.1155/2014/564908. Epub 2014 May 14.

Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP. Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulprevascularization. *J Endod.* 2014 Jun;40(6):778-83. doi: 10.1016/j.joen.2014.01.038. Epub 2014 Apr 29.

Kumar H, Al-Ali M, Parashos P, Manton DJ. Management of 2 teeth diagnosed with dens invaginatus with regenerative endodontics and apexification in the same patient: a case report and review. *J Endod.* 2014 May;40(5):725-31. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.030. Epub 2013 Dec 15.

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 Feb;40(2):192-8. doi: 10.1016/j.joen.2013.10.027. Epub 2013 Dec 15.

Jadhav GR, Shah N, Logani A. Comparative outcome of revascularization in bilateral, non-vital, immature maxillary anterior teeth supplemented with or without platelet rich plasma: A case series. *J Conserv Dent.* 2013 Nov;16(6):568-72. doi: 10.4103/0972-0707.120932.

Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM. Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod.* 2014 Jan;40(1):133-9. doi: 10.1016/j.joen.2013.07.017. Epub 2013 Aug 31.

Slutzky-Goldberg I, Heling I. Revascularization? Only as the last resort!. *Refuat Hapeh Vehashinayim* (1993). 2013 Jul;30(3):30-5, 62.

Forghani M, Parisay I, Maghsoudlou A. Apexogenesis and revascularization treatment procedures for two traumatized immature permanent maxillary incisors: a case report. *Restor Dent Endod*. 2013 Aug;38(3):178-81. doi: 10.5395/rde.2013.38.3.178. Epub 2013 Aug 23.

Sönmez IS, Akbay Oba A, Erkmen Almaz M. Revascularization/Regeneration performed in immature molars: case reports. *J Clin Pediatr Dent*. 2013 Spring;37(3):231-4.

Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, Sönmez H. Concentrated platelet-rich plasma used in root canal revascularization: 2 case reports. *Int Endod J*. 2014 Jan;47(1):41-9. doi: 10.1111/iej.12144. Epub 2013 Jun 17.

Yang Y, Peng CF, Qin M. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 2013 Feb;48(2):81-5.

Huang Y, Chen K, Zhang Y, Xiong H, Liu C. Effect of revascularization treatment of immature permanent teeth with endodontic infection.

Keswani D, Pandey RK. Revascularization of an immature tooth with a necrotic pulp using platelet-rich fibrin: a case report. *Int Endod J*. 2013 Nov;46(11):1096-104. doi: 10.1111/iej.12107. Epub 2013 Apr 13.

Tawfik H, Abu-Seida AM, Hashem AA, Nagy MM. Regenerative potential following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J*. 2013 Oct;46(10):910-22. doi: 10.1111/iej.12079. Epub 2013 Mar 11.

Yang J, Zhao Y, Qin M, Ge L. Pulp revascularization of immature dens invaginatus with periapical periodontitis. *J Endod*. 2013 Feb;39(2):288-92. doi: 10.1016/j.joen.2012.10.017. Epub 2012 Nov 13.

Gelman R, Park H. Pulp revascularization in an immature necrotic tooth: a case report. *Pediatr Dent*. 2012 Nov-Dec;34(7):496-9.

Dabbagh B, Alvaro E, Vu DD, Rizkallah J, Schwartz S. Clinical complications in the revascularization of immature necrotic permanent teeth. *Pediatr Dent*. 2012 Sep-Oct;34(5):414-7.

Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM. Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod*. 2012 Oct;38(10):1330-6. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.028. Epub 2012 Aug 15.

Cehreli ZC, Sara S, Aksoy B. Revascularization of immature permanent incisors after severe extrusive luxation injury. *J Can Dent Assoc*. 2012;78:c4.

Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM. Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *J Endod*. 2012 Sep;38(9):1293-7. doi: 10.1016/j.joen.2012.06.017. Epub 2012 Jul 20.

Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *Tex Dent J*. 2012 Jun;129(6):601-16.

Pramila R, Muthu M. Regeneration potential of pulp-dentin complex: Systematic review. *J Conserv Dent*. 2012 Apr;15(2):97-103. doi: 10.4103/0972-0707.94571.

Miller EK, Lee JY, Tawil PZ, Teixeira FB, Vann WF Jr. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatr Dent*. 2012 Jan-Feb;34(1):66-9.

Chen MY, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulptissue and apical

periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J.* 2012 Mar;45(3):294-305. doi: 10.1111/j.1365-2591.2011.01978.x. Epub 2011 Nov 14.

Kottoor J, Velmurugan N. Revascularization for a necrotic immature permanent lateral incisor: a case report and literature review. *Int J Paediatr Dent.* 2013 Jul;23(4):310-6. doi: 10.1111/ipd.12000. Epub 2012 Sep 20.

Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G. Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod.* 2011 Sep;37(9):1327-30. doi: 10.1016/j.joen.2011.05.033. Epub 2011 Jul 13.

Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011 Nov;112(5):662-6. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.04.030.

Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol.* 2011 Feb;27(1):55-8. doi: 10.1111/j.1600-9657.2010.00963.x.

Nosrat A, Seifi A, Asgary S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *J Endod.* 2011 Apr;37(4):562-7. doi: 10.1016/j.joen.2011.01.011.

Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010 Jun;36(6):1086-91. doi: 10.1016/j.joen.2010.03.031.

Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J.* 2009 Dec;42(12):1118-26. doi: 10.1111/j.1365-2591.2009.01633.x.

Thibodeau B. Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent*. 2009 Mar-Apr;31(2):145-8.

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 May;35(5):745-9. doi: 10.1016/j.joen.2009.02.009.

Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: a case report. *Int Endod J*. 2009 Jan;42(1):84-92. doi: 10.1111/j.1365-2591.2008.01467.x.

Seale N, Glickman GN. Contemporary perspectives on vital pulp therapy: views from the endodontists and pediatric dentists. *Pediatr Dent*. 2008 May-Jun;30(3):261-7.

Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM. Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod*. 2008 Jul;34(7):876-87. doi: 10.1016/j.joen.2008.03.023. Epub 2008 May 16.

Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod*. 2004 Apr;30(4):196-200.

Hargreaves K, Geisler T, Henry M, Wang Y. Regeneration Potential of the Young Permanent Tooth: What Does the Future Hold? *Journal of Endodontics*, v. 34, n. 7S, p.51-56, 2008

Feigin K, Shope B. Regenerative Endodontics. *J Vet Dent*. 2017 Sep;34(3):161-178. doi: 10.1177/0898756417722022.

Langer R, Vacanti JP. Tissue engineering. *SCIENCE*, v.14, n. 260 (5110), p.920-6, 1993.

AAE (2013) Endodontists' 2013 Guide to CTD. [WWW document].  
[https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/04/ConsiderationsForRegEndo\\_AsOfApril2018.pdf](https://www.aae.org/specialty/wp-content/uploads/sites/2/2018/04/ConsiderationsForRegEndo_AsOfApril2018.pdf)  
[accessed on September 2018].

Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan D, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.*, v. 33, n. 6, p. 680-689, 2007.

Windley W, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson S, Trope M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod.*, v. 31, n.6 , p. 433-439, 2005.

Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *Journal Endodontics*, v. 32, n. 12, p. 1205-1213, 2006.

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. *Journal Endodontics*, v. 35, n. 10, p. 1343-1349, 2009.

Sato I, Kurihara-Ando N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod Journal*, v. 29, n. 2, p. 118-124, 1996.

Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod Journal*, v. 29, p. 125–130, 1996.

Shokraneh A, Farhad A, Farhadi N, Saatchi M, Hasheminia S. Antibacterial effect of triantibiotic mixture versus calcium hydroxide in combination with active agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Dental Material Journal*. 2014;33(6):733-8.

Talgesir A, Yassen GH, Gomez GF, Gregory R. Effect of antimicrobials used in regenerative endodontic procedures on 3 week old *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endodon.* 2016 Feb;42(2):258-62. doi: 10.1016/j.joen.2015.09.023. Epub 2015 Nov 11.

Jacobs JC, Troxel A, Ehrlich Y, Spolnik K, Bringas JS, Gregory RL, Yassen GH. Antibacterial effects of antimicrobials used in regenerative endodontics against biofilm bacteria obtained from mature and immature teeth with necrotic pulps. *J Endodon.* 2017 Apr;43(4):575-579. doi: 10.1016/j.joen.2016.12.014. Epub 2017 Feb 16.

Roberts-Clark D, Smith AJ. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.*, v. 45, p. 1013-1016, 2000.

Goldberg M, Smith AJ. Cells and extracellular matrices of dentine and pulp: biological strategies for repair and tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.*, v. 15, p. 4-12, 2004.

Smith AJ. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.*, v. 67, p. 678-689, 2003.

Cooper PR, Takahashi Y, Graham LW. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal Dent.*, v. 38, p. 687-697, 2010.

Cassidy N, Fahey M, Prime S, Smith J. Comparative analysis of transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ ) isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biology*, v. 42, p. 219-223, 1997.



Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *Journal Endodontics*, v. 33, p. 377-390, 2007.

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 Endodon*, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2011.

C, Yang Z, Zhou W, Jin F, Song Y, Wang Y, Huo N, Chen L, Qian H, Hour R, Duan Y, Jin Y. Periapical follicle stem cell: a promising candidate for cementum/periodontal ligament regeneration and bio-root engineering. *Stem Cells Dev.*, v. 19, n. 9, p. 1405-1416, 2010.

Diogenes A, Ruparel N, Shiloah Y, Hargreaves K. Regenerative endodontics – A way forward. *J Am Dent Association*, v. 147, n. 5, p. 372-80, 2016.

## 8. MANUSCRITO 2

### **Antimicrobial effect of intracanal medicaments used in revascularization**

Daiana Flores Gonçalves Giannastasio<sup>1\*</sup>, Fernanda Majolo<sup>2\*</sup>, Brenda Landvoigt Schmitt<sup>3</sup>, Sílvia Dias de Oliveira<sup>3</sup>, João Batista Blessmann Weber<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Postgraduate Program in Dentistry (PUCRS)*; <sup>2</sup> *Brain Institute of Rio Grande do Sul (BraIns)*; <sup>3</sup> *Laboratory of Immunology and Microbiology of School of Sciences (PUCRS)*

**\*Corresponding author:** Postgraduate Program in Dentistry, School of Science, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS 90610000, Brazil. *E-mail address:* daianagiannastasio@terra.com.br

### **Abstract**

**Keywords:** Immature teeth, biofilm, disinfection

### **1. Introduction**

Revascularization is a novel treatment proposed for immature teeth with or without pulpar necrosis (Iwaya, Ikawa, Kubota, 2001). The main objective is promoting root formation and maintain or contribute to periapical health (Lin et al, 2017). The protocol comprises minimal instrumentation, irrigation, use of intracanal medicament,

bleeding induction and, consequently, the formation of blood clot inside the root canal (Nygaard-Ostby, 1966) and mesenchymal stem cells arrival.

However, even if the treatment protocol is correctly performed, there is no continuity of root formation in the presence of bacteria (Thibodeau et al, 2007; Fouad, 2011; Verma et al, 2017). According to Lin (2014), the key to the success of revascularization therapy is to effectively control the root canal infection. Antimicrobial activity and biofilm destruction appear to be the most important objectives targeted towards the etiology of pulp and periradicular infections (Neelakantan et al, 2017). Therefore, given the need for decontamination of the canal, with minimal mechanical action, one must consider the importance of the use of chemical agents (Diógenes, 2013). By the way, there are two groups of chemical agents used in endodontics, which are root canal irrigators or intracanal medicaments.

The objectives of root canal irrigation are to dissolve vital or necrotic pulp tissues, disrupt endodontic biofilms, neutralize endotoxins and remove the smear layer (Neelakantan et al, 2017). Sodium hypochlorite (NaOCl) is a potent disinfectant/irrigant used in endodontics due to its great ability to dissolve vital and necrotic tissues and its antibacterial activity (Zehnder, 2006; Good, El Karim, Hussey, 2012; Haapasalo et al, 2014), and should have their effectiveness maximized when associated with passive ultrasonic irrigation (PUI) (Ordinola-Zapata et al, 2014).

To help irrigants, intracanal medicaments are used to obtain disinfection. It's placed between visits to control residual bacterial infection but includes anti-inflammatory properties, prevents re-infection and inflammatory root resorption (Good, Karin, Hussey, 2012).

Proposed by Hoshino et al. (1996), the triple antibiotic paste (TAP) is composed of metronidazole, ciprofloxacin and minocycline (Sato et al, 1996; Hoshino

et al, 1996). It has an excellent activity against *Enterococcus faecalis*, and is recommended for use of intracanal dressings in revascularization treatment of teeth with incomplete root formation (Maniglia-Ferreira et al, 2016).

Calcium hydroxide (Ca(OH)<sub>2</sub>) is another one effective intracanal medicament (Jacobs et al, 2017). Calcium hydroxide has a highly alkaline pH, approaching 12.5 and dissociates into calcium and hydroxyl ions. Its antimicrobial capacity is related to the rupture of the cytoplasmic membrane, protein denaturation and damage to bacterial DNA (Siqueira, lopes, 2001).

Therefore, the present study aimed to test the antimicrobial activity of different intracanal medicaments against *E. faecalis* biofilm.

## **2. Material and method**

### **2.1. Drugs**

Metronidazole, minocycline and ciprofloxacin (Sigma-Aldrich. St Louis, MO, USA) and calcium hydroxide (Biodinâmica. Iporã, PR, BR) as pure pharmaceutical grade dry powder were employed in the experiments.

Drugs were diluted in distilled water at a concentration of 1 mg/mL. The groups of drugs to be tested against *E. faecalis* were divided as follows: G1 - triple antibiotic formula (metronidazole, minocycline and ciprofloxacin); G2 - metronidazole; G3 - minocycline; G4 - ciprofloxacin; G5 - calcium hydroxide; G6 – negative control (distilled water); G7 - sodium hypochlorite (NaOCl).

### **2.2. Antimicrobial activity**

*E. faecalis* ATCC 29212 was grown in Brain Heart Infusion (BHI) (Oxoid, Basingstone, Hampshire, England) for 24 h at 37° C. The culture of *E. faecalis* was adjusted to an optical density of 0.5 at 600 nm (GENESYS 20 Visible

Spectrophotometer, Thermo Scientific™. Waltham, MA, USA), and diluted to  $10^{-8}$  in 0.85% saline solution. Dilutions  $10^{-6}$  to  $10^{-8}$  were spread on 5% sheep blood agar, in triplicate, and incubated at 37° C for 24 h for determination of initial cell density. *E. faecalis* was cultured under biofilm condition for 21 days in culture plates containing 24 wells. At each well, 1.9 mL of BHI broth and an aliquot of 100  $\mu$ L containing  $2.3 \times 10^8$  colony-forming units (CFU) of *E. faecalis* were added. Every 48 h, a 1 mL-aliquot of culture medium was replaced by sterile fresh BHI. Weekly, the BHI removed was spread on 5% sheep blood agar and incubated for 24 h at 37°C, with subsequent colony morphological analysis and Gram staining to observe the culture purity.

After 21 days, BHI was discarded and the wells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) to remove planktonic cells. A volume of 2 mL of the triple antibiotic medication, metronidazole, minocycline, ciprofloxacin, calcium hydroxide, distilled water (negative control) or sodium hypochlorite was added to the wells and maintained for 14 days at room temperature. Each antimicrobial compound and controls are tested in triplicate. The medications were removed, and the wells were washed five times with PBS. An aliquot of 2 mL of PBS was added to each well, and the biofilm was disrupted in a Cleaner 1400A ultrasonic water bath (Unique. Indaiatuba, SP, BR) for 10 min. An aliquot of 50  $\mu$ L of disrupted biofilm was removed from the wells and transferred to a microtube containing 450  $\mu$ L of sterile 0.85% saline. The material was diluted to  $10^{-8}$  and 100  $\mu$ L of each dilution were spread in triplicate, on 5% sheep blood agar, which was incubated at 37° C for 24 h in order to determine the number of cells surviving the treatments.

### 2.3. Statistical analysis

The data were a quantitative average level to compare the groups. We used a linear model with the purpose of adjusting the treatment groups and the time and

effect of the patients. The level of significance was  $\alpha = 0.05$ . The data will be processed and analyzed in the SPSS program version 22.0.

### **3. Results**

The effect of triple antibiotic formulation in 21 days-biofilm formed by *E. faecalis* was similar to that obtained with minocycline and calcium hydroxide, whilst single treatment with metronidazole or ciprofloxacin showed lower action against this biofilm.

### **4. Discussion**

Translational science in regenerative endodontics must analyze the presence of microorganisms, because adequate disinfection and neutralization of their toxins represent major challenges still to be overcome. The etiology of apical periodontitis can be associated with fungi and viruses, but mainly with bacteria. It should be considered as a bacterial infection disease (Siqueira & Rôças, 2009) and the permanence of microorganism is the main cause of failure (Botero, 2017). Bacterial infection in the apical root canal system, organized as biofilm, is always present in all necrotic teeth associated with periapical radiolucency and sinus tract (Ricucci et al, 2018).

Intraradicular bacterial biofilms were usually thick and composed of several layers of bacterial cells (Ricucci & Siqueira, 2010). The parameter used by Hall-Stoodley, Costerto, Stoodley (2004), to classify bacterial community structures as biofilms followed this definition: "Microbial biofilms are populations of microorganisms that are concentrated at an interface and typically surrounded by an extracellular polymeric substance matrix".

Biofilm is responsible to alter the osteogenic differentiation of Stem cell of apical papila (SCAP) and the histologic profile of the tissue. It downregulated dentinogenic

genes such as sialoprophosphoprotein and upregulated osteoblastic genes such as bone sialoprotein and osteocalcin. It results in formation of cementum and bone instead of dentine (Vishwanat et al, 2017).

It has been reported that *E. faecalis* is a microorganism often found in persistent endodontic infections (Stuart, 2006). Since this microorganism has been widely studied and presented ability to survive several stressful conditions, it has been used as a target in disinfection experiments (Wall et al, 2017). *E. faecalis* can synthesize proteins that can constitute virulence determinants, such as enterococcal surface protein and gelatinase involved in the evasion of the host immune system (Toledo-Arana, 2001).

Considering the need to decontaminate the root canal based on the use of chemical substances, irrigation agents (Clarckson, Moule, 1998) and intracanal medications, such as triple antibiotic paste (Hoshino et al, 1996) and calcium hydroxide (Siqueira, Lopes, 2001), are being used.

Sodium hypochlorite (NaOCl) is used as a coadjuvant in the disinfection of the canal system because it has excellent bactericidal efficacy (Bystrom, Sundqvist, 1981; Harisson, Wagner, Henry, 1990; Martinho, Gomes, 2008), ability to dissolve organic material and serves as a lubricant for the endodontic instrumentation (Hand, Smith, Harisson, 1978; Harisson, Hand, 1981; Yang et al, 1995). According to Stojicic et al (2012), when in direct contact, it destroys *E. faecalis* biofilm in only 3 min. For this reason, it was chosen as a positive control for the present study. However, subinhibitory NaOCl concentration can upregulate ECM (extracellular matrix) production and increase biofilm growth (Yoo et al, 2018).

Tissue dissolution and biofilm disruption related to NaOCl is time and concentration dependent (Ordinola-Zapata et al, 2014; Tartari et al, 2016). It alters dentin composition over time because in high quantities it can dissolve the organic

matter and deproteinate the collagen of dentin (Tartari et al, 2016). However, when used combined with 17% EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), it has an important action in reduce intracanal biofilm (Ozdemir et al, 2010). EDTA is a chelating agent that remove the inorganic portion of the smear layer and act as an adjuvant in root canal therapy (Haapasalo et al, 2014).

Hoshino et al. (1996) proposed the use of the triple antibiotic paste. It's still used today as intracanal medicament and is composed of metronidazole, ciprofloxacin and minocycline, demonstrating that is effective in disinfection (Sato et al, 1996; Hoshino et al, 1996). However, some modifications related to concentration were made with the objective of preserving the viability of mesenchymal cells (Althumairy, Teixeira, Diógenes, 2014; Alghilan et al, 2016; AAE, 2016), without losing their antimicrobial capacity (Latham, Fong, Jewett, 2016; Sabrah, Yassen, Gregory, 2013; Tagelsir et al, 2016) agreeing with what was found here.

The American Association of Endodontics (AAE) recommends the use of the triple antibiotic medication in low concentration (1 mg/mL) in order to avoid damaging the papilla and pulp cells (Althumairy, Teixeira, Diogenes, 2014; Alghilan et al, 2016). Recently, *in vitro* studies have demonstrated the antimicrobial potential of these medication (Latham; Fong, Jewett, 2016; Sabrah, Yassen, Gregoty, 2013; Tagelsir et al, 2016).

Considering the antimicrobial action of calcium hydroxide (Ca (OH<sub>2</sub>)), the results obtained here are in agreement with Siqueira and Lopes (2001) that showed reduction in the number of live bacterial cells.

The results obtained referring to the determination of the number of viable microbial cells after treatment confirm the quotations of Tagelsir et al (2016), Shokraneh et al (2014) and Jabobs et al (2017), demonstrating the antimicrobial



efficacy of the triple antibiotic medication and calcium hydroxide. It is able to promote the decontamination of the root canal system and demonstrate success when used in regenerative techniques (Nagata et al, 2014), but do not present antimicrobial residual action in this low concentration (Jacobs et al, 2017).

When antibiotic medications were evaluated individually, it was observed that only minocycline presented a statistically significant difference when compared to the negative control group (distilled water), and had its action similar to calcium hydroxide and triple antibiotic formula. From these findings, the presence of ciprofloxacin and metronidazole in the formula can be questioned. However, the use of monoculture instead mixed biofilm, as usually found in the root canal, should be considered, since it could influence the results. Maybe, it should be better investigated using complex microbial cultures usually found in the root canal. Biofilm community lifestyle provides microorganisms with a series of advantages and skills that are not observed for individual cells (Marsh, 2005) and association of medications would be necessary to reach the microbial diversity.

Botero et al (2017) compare the success rate of revascularization treatment between cases using intracanal medication (delayed induction of blood clot) and not (immediate induction of blood clot). They observe that 77% for delayed cases and 33% for immediate cases have success. It should show the importance of root decontamination for this treatment, because the permanence of microorganism is the main cause of failure.

## 7. Conclusion

The use of the medications proposed for revascularization therapy present ability to decontaminate root canal. But maybe we must to evaluate the medications associated with a mixed biofilm, which should be the nearest condition the reality. It is primordial too, to associate with this knowledge the interaction of medications with the cells that will popularize the environment. In this way, we consider important to evaluate the influence of the medications on the viability and differentiation capacity of apical papilla cells, because it must decontaminate but preserve the cells.

**Acknowledgement:** The authors are grateful to CAPES-Brazil and the Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) for the scholarships for the first and second authors. This work was supported by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – [Finance Code 001]. SDO is Research Career Awarded of the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

**Declarations of interest:** none.

## References

Alghilan M, Windsor L, Yassen G. Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *Int Endod J*. 2017 Jul;50(7):667-675. doi: 10.1111/iej.12669.

Althumairy R, Teixeira F, Diogenes A. Effect of dentin conditioning with intracanal medicaments on survival of stem cells of apical papilla. *J Endod*. 2014 Apr;40(4):521-5. doi: 10.1016/j.joen.2013.11.008.

Botero TM, Tang X, Gardner R, Hu J, Boynton JR, Holland G. Clinical Evidence for Regenerative Endodontic Procedures: Immediate versus Delayed Induction? *J Endod.* 2017 Sep;43(9S):S75-S81. doi: 10.1016/j.joen.2017.07.009

Fouad AF. The microbial challenge to pulp regeneration. *Adv Dent Res.* 2011 Jul;23(3):285-9. doi: 10.1177/0022034511405388.

Good M, El Karim I, Hussey DL. Endodontic 'solutions' part 1: A literature review on the use of endodontic lubricants, irrigants and medicaments. *Dent Update.* 2012 May;39(4):239-40, 242-4, 246.

Haapasalo M, Shen Y, Wang Z, Gao Y. Irrigation in endodontics. *Br Dent J.* 2014 Mar;216(6):299-303. doi: 10.1038/sj.bdj.2014.204.

Hall-Stoodley L, Costerton JW, Stoodley P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2004 2(2):95-108.

Iwaya S, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol.* 2001 Aug;17(4):185-7.

Jacobs J C, Troxel A, Ehrlich Y, Spolnik K, Bringas SJ, Gregory RL, Yassen GH. Antibacterial Effects of Antimicrobials Used in Regenerative Endodontics against Biofilm Bacteria Obtained from Mature and Immature Teeth with Necrotic Pulps. *J Endod.* 2017 Apr;43(4):575-579. doi: 10.1016/j.joen.2016.12.014.

Lin LM, Shimizu E, Gibbs J, Loghin S, Ricucci D. Histologic and histobacteriologic observations of failed revascularization/revitalization therapy: a case report. *J Endod.* 2014 Feb;40(2):291-5. doi: 10.1016/j.joen.2013.08.024.

Lin J, Zeng Q, Wei X, Zhao W, Cui M, Gu J, Lu J, Yang M, Ling J. Regenerative endodontics versus apexification in immature permanent teeth with apical periodontitis: A prospective randomized controlled study *J Endod.* 2017 Nov;43(11):1821-1827. doi: 10.1016/j.joen.2017.06.023

Maniglia-Ferreira C, Almeida-Gomes F, Pinto MM, Sousa Barbosa F, 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 Aug;17(4):251-5. doi: 10.1007/s40368-016-0236-x.

Marsh PD. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J Clin Periodontol*. 2005;32(6):7-15.

Neelakantan P, Romero M, Vera J, Daood U, Khan A, Yan A, Cheung G. Biofilms in Endodontics—Current Status and Future Directions. *Int J Mol Sci*. 2017 Aug 11;18(8). doi: 10.3390/ijms18081748.

Nygaard-Ostby B. Mortal or vital treatment of the inflamed pulp? *SSO Schweiz Monatsschr Zahnheilkd*. 1966 Jun;76(6):545-51.

Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Aprecio RM, Handysides R, Jaramillo DE. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int Endod J*. 2014;47:659–666. doi:10.1111/iej. 12202.

Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S, Stabholz A, Steinberg D. Effect of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite irrigation on *Enterococcus faecalis* biofilm colonization in young and old human root canal dentin: In vitro study. *J. Endod*. 2010 36(5):842–846. doi.org/10.1016/j.joen.2010.01.008

Ricucci D, Loghin S, Gonçalves LS, Roças IN, Siqueira Jr J. Histobacteriologic Conditions of the Apical Root Canal System and Periapical Tissues in Teeth Associated with Sinus Tracts. *J Endodon*. 2017 44(3):405–413. doi:10.1016/j.joen.2017.12.005.

Siqueira Jr JF, Rôças IN. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*. 2009 88(11):969–981. <https://doi.org/10.1177/0022034509346549>

Tartari T, Bachmann L, Maliza AG, Andrade FB, Duarte MA, Bramante CM. Tissue dissolution and modifications in dentin composition by different sodium hypochlorite concentrations. *J. Appl. Oral Sci*. 2016 24:291-298. doi.org/10.1590/1678-775720150524

Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta M, Cucarella C, Lamata M, Morena B, Leiva J, Penadés J, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl Environ Microbiol*. 2001 67:4538–4. DOI: 10.1128/AEM.67.10.4538–4545.2001

Verna P, Nosrat A, kim JR, prince JB, Wang P, Bair E, Xu H, Fouad AF. Effect of residual bacteria on the outcome of pulp regeneration In vivo. *J Dent Res*. v. 96, n. 1, p. 100-106, 2017. DOI: 10.1177/0022034516671499.

Waal SV, Soet JJ, Wessekink PR, Crielaard W. Calcium hydroxide does not alter the susceptibility of enterococcus faecalis biofilm to sodium hypochlorite. Eur Endodon J. 2017 2(30):2-5. DOI: 10.5152/eej.2017.17022

Yoo A, Rossi-Fedele G, Kidd S P, Rogers AH, Zilm PS. Association between Extracellular Material and Biofilm Formation in Response to Sodium Hypochlorite by Clinical Isolates of Enterococcus faecalis. J. Endodon. 2018 44(2):269-273. DOI: 10.1016/j.joen.2017.08.025.

Zehnder M. Root canal irrigants. J. Endod. 2006 32(5):389-398. DOI: 10.1016/j.joen.2005.09.014.

## **9. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

O tratamento de revascularização apresenta altos índices de sucesso. Diferentes estudos relatam remissão dos sinais e sintomas de doenças assim como a complementação da formação radicular. O presente trabalho confirma os achados anteriores referente ao potencial de diferenciação das células da papila e da polpa. Mesmo que apresentem diferente perfil de maturação celular, ambas são capazes de se diferenciar e assumir o perfil fenotípico de osteoblastos. Vale ressaltar que o hidróxido de cálcio exibe menor citotoxicidade quando comparado a medicação triantibiótica. Com relação ao potencial antimicrobiano das células, pode-se afirmar que as medicações utilizadas na terapia de revascularização possuem capacidade de promover a descontaminação do canal radicular e dessa maneira proporcionar o sucesso do tratamento.

## **10. REFERÊNCIAS**

ABBOTT P. V. Apexification with calcium hydroxide: when should the dressing be changed? the case for regular dressing changes. Australian Endodontics Journal, v. 24, p. 27-32, 1998.

AUBIN, J. E. Bone stem cells. J Cell Biochem Suppl. v.30, n.31, p.73-82, 1998b.

ALGHILAN, M.; WINDSOR, L.; PALASUK, J.; YASSEN, G. Attachment and proliferation of dental pulp stem cells on dentine treated with different regenerative endodontic protocols. *Int Endod Journal*. Jun 8; 2016.

AKCAY, M.; ARSLAN, H.; YASA, B.; KAVRIK, F.; YASA, E. Spectrophotometric Analysis of Crown Discoloration Induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *Journal Endodontics*, v. 40, n. 6, p. 845-848, 2014.

ALAM, T.; NAKAZAWA, F.; NAKAJO, K.; UEMATSU, H.; HOSHINO, E. Susceptibility of *Enterococcus faecalis* to a combination of antibacterial drugs (3Mix) in vitro. *Journal Oral Bioscience*, v. 47, n. 4, p. 315-320, 2005.

ALTAII, M.; RICHARDS, L.; ROSSI-FEDELE, G. Histological assesment of regenerative endodontic treatment in animal studies with different scaffolds: a systematic review. *Dent Traumatol*, v. 33, n. 4, p. 235-244, 2017.

ALTHUMAIRY, R.; TEIXEIRA, F.; DIOGENES, A. Effect of Dentin Conditioning with Intracanal Medicaments on Survival of Stem Cells of Apical Papilla. *Journal Endodontics*, v. 40, n. 4, p. 521-525, 2014.

American Association of Endodontists. AAE clinical considerations for a regenerative procedure. Available at:  
[https://www.aae.org/uploadedfiles/publications\\_and\\_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf](https://www.aae.org/uploadedfiles/publications_and_research/research/currentregenerativeendodonticconsiderations.pdf). Accessed jan2019.

ANDREASEN, J. O.; FARIK, B.; MUNKSGAARD, E. C. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental Traumatology*, v. 18, n. 3, p. 134-137, 2002.

ANSELME, K. Osteoblast adhesion on biomaterials. *Biomaterials*. v.21, n.7, p.667-81, 2000.

BAKOPOULOU A, LEYHAUSEN G, VOLK J, et al. Comparative analysis of in vitro osteo/ odontogenic differentiation potential of human dental pulp stem cells (DPSCs) and stem cells from the apical papilla (SCAP). *Arch Oral Biol*. v. 56, p. 709-21, 2011.

BANCHS, F.; TROPE, M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? *Journal Endodontics*, v. 30, n. 4, p. 196-200, 2004.

BAKER, M.; SUGARS, V.; WENDEL, M.; SMITH, J.; WADDINGTON, J.; COOPER, R.; SLOAN, J. TGF-beta/extracellular matrix interactions in dentin matrix: a role in regulating sequestration and protection of bioactivity. *Calc Tiss Interntional*, v. 85, p. 66-74, 2009.

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. *Journal Endodontics*, v. 35, n. 10, p. 1343-1349, 2009.

BOTERO, T.M; TANG, X; GARDNER, R; HU, J;. BOYNTON, J.R; HOLLAND, G. Clinical Evidence for Regenerative Endodontic Procedures: Immediate versus Delayed Induction? *J Endodon*, V. 43, N. 9S, p.75-81, 2017.

BYSTROM, A.; SUNDQVIST, G. Bacteriologic evaluation of the efficacy of mechanical root canal instrumentation in endodontic therapy. *Scand J Dent Research*, v. 89, p. 231-328, 1981.

BYSTRÖM, A.; CLAESSION, R.; SUNDQVIST, G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endodontics and Dental Traumatology*, v. 1, p. 170-175, 1985.

CASSIDY, N.; FAHEY, M.; PRIME, S.; SMITH J. Comparative analysis of transforming growth factor-beta (TGF-  $\beta$ ) isoforms 1-3 in human and rabbit dentine matrices. *Arch Oral Biology*, v. 42, p. 219-223, 1997.

CHUEH, L. H.; HUANG, G. T. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endodon*, v. 32, n. 12, p. 1205-1213, 2006.

CHUENSOMBAT, S.; KHEMALEELAKUL, S.; CHATTIPAKORN, S.; SRISUWAN, T. Citotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: An in vitro study. *J Endodon*, v. 39, n. 6, p. 813-819, 2013.

CHREPA, V.; PITCHER, B.; HENRY, M.; DIOGENES, A. Survival of the Apical Papilla and Its Resident Stem Cells in a Case of Advanced Pulpal Necrosis and Apical Periodontitis. *J Endodon*. v.43, n.4, p.561-567, 2017.

CLARKSON, R. M; MOULE, A. J. Sodium hypochlorite and its use as an endodontic irrigant. *Aust Dent Journal*, v. 43, p. 250-256, 1998.

COOPER, P.R.; TAKAHASHI, Y.; GRAHAM, L. W. Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal Dent.*, v. 38, p. 687-697, 2010.

CVEK, M.; CLEATON-JONES, P.; AUSTIN, J.; LOWNIE, J.; KLING, M.; FATTI, P. Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization and periodontal healing in reimplanted monkey incisors. *Endodontics Dental Traumatology*, v. 6, n. 4, p. 170-176, 1990.

CZVEK, M. Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. *Endodontics Dental Traumatology*, v. 8, n. 2, p. 45-55, 1992.

DA SILVA, L. A.; FILHO, P. N.; DA SILVA, R. A.; FLORES, D. S.; HEILBORN, C.; JOHNSON, J.; COHENCA, N. Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 109, n. 5, p. 779-786, 2010.

DING, R. Y.; CHEUNG, G. S.; CHEN, J.; YIN, X. Z.; WANG, Q. Q.; ZHANG, C. F. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *Journal Endodontics*, v. 35, n. 5, p. 745-749, 2009.

DIOGENES, A.; HENRY, M. A.; TEIXEIRA, F. B; HARGREAVES, K. M. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod. Topics*, v. 28, n. 1, p. 2-23, 2013.

DIOGENES, A; RUPAREL, N; SHILOAH, Y.; HARGREAVES, K. Regenerative endodontics – A way forward. *J Am Dent Association*, v. 147, n. 5, p. 372-80, 2016.

DIOGENES, A; HARGREAVES, K. Microbial modulation of stem cells and future directions in regenerative endodontics. *J Endod.* v. 43, n. 9s, p. 95-101, 2017.

DUARTE, P. C.; GOMES-FILHO, J. E.; ERVOLINO, E.; SUNDEFELD, M. L.; TADAHIRO WAYAMA, M. T.; LODI, C. S.; DEZAN-JÚNIOR, E.; CINTRA, L. T. Histopathological Condition of the Remaining Tissues after Endodontic Infection of Rat Immature Teeth. *J Endod*, v. 40, n. 4, p. 538-542, 2014.

EL ASHIRY, E.; FARSI, N.M.; ABUZEID, S.T.; EL ASHIRY, M.M.; BAHAMMAM, H.A. Dental pulp revascularization of necrotic permanent teeth with immature apices. *The Journal of clinical Pediatric dentistry*, v. 40, n. 5, p. 361-366, 2016.



FRANK, A. L. Therapy for the divergent pulpless tooth by continued apical formation. J Am Dent Association, v. 7, n. 1, p. 78-93, 1966.

FREEMAN, B. A; CRAPO, J. D. Biology of disease: free radicals and tissue injury. Lab Invest, v. 47, n. 5, p. 412-426, 1982.

GALLER, K.; KRASTI, G.; SIMON, S.; VAN GORP, S.; MESCHI, B.; LAMBRECHTS, P. European Society of Endodontology Position Statement: Revitalization Procedures.

GARCIA-GODOY, F.; MURRAY, P.E. Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. Dent Traumatol., v. 28, n.1, p. 33-41, 2012.

GOLDBERG, M; SMITH, A. J. Cells and extracellular matrices of dentine and pulp: biological strategies for repairs and tissue engineering. Crit Rev Oral Biol Med., v. 15, p. 4-12, 2004.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and n vivo. Proc Natl Acad Sci USA., v. 97, n. 25, p. 13626-13630, 2000.

GRONTHOS, S.; BRAHIM, J.; LI, W.; FISHER, L. W.; CHERMAN, N.; BOYDE, A.; DENBESTEN, P.; ROBEY, P. G.; SHI, S. Stem cells properties of human dental pulp stem cells. J Dent Research, v. 81, n. 8, p. 531-535, 2002.

HAN, C.; YANG, Z.; ZHOU, W.; JIN, F.; SONG, Y.; WANG, Y.; HUO, N.; CHEN, L.; QIAN, H.; HOU, R.; DUAN, Y.; JIN, Y. Periapical follicle stem cell: a promising candidate for cementum/periodontal ligament regeneration and bio-root engineering. Stem Cells Dev., v. 19, n. 9, p. 1405-1416, 2010.

HAND, R.; SMITH, M.; HARRISON, J. Analysis of the effect of dilution on the necrotic tissue dissolution property of sodium hypochlorite. Journal Endodontics, v. 4, n. 2, p. 60-64, 1978.

HARGREAVES, K.; GEISLER, T.; HENRY, M.; WANG, Y. Regeneration Potential of the Young Permanent Tooth: What Does the Future Hold? Journal of Endodontics, v. 34, n. 7S, p.51-56, 2008

HARRISSON, W. H.; HAND, R. E. The effect of dilution and organic matter on the antibacterial property of 5.25% sodium hypochlorite. Journal Endodontics, v. 7, n. 3, p. 128-132, 1981.

HARRISSON, J. W.; WAGNER, G.; HENRY, C. Comparison of the antimicrobial effectiveness of regular and fresh scent Clorox. Journal Endodontics, v. 16, n; 7, p. 328-330, 1990.

HOLDEN, D.; SCHWARTZ, S.; KIRKPATRICK, T. Clinical outcomes of artificial rootend barriers with mineral trioxide aggregate in teeth with immature apices. *Journal Endodontics*, v. 37, n. 7, p. 812-817, 2008.

HOSHINO, E.; KURIHARA-ANDO, N.; SATO, I.; UEMATSU, H.; SATO, M.; KOTA, K.; IWAKU. In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod Journal*, v. 29, p. 125–130, 1996.

HUANG, G. T.; SONOYAMA, W.; LIU, Y.; LIU, H.; WANG, S.; SHI, S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *Journal Endodontics*, v. 34, n. 6, p. 645-651, 2008.

IWAYA, S.; IKAWA, M.; KUBOTA, M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental Traumatology*, v. 17, p. 185-187, 2001.

JACOBS, J. C.; TROXEL, A.; EHRLICH, Y.; SPOLNIK, K.; BRINGAS, J. S.; GREGORY, R. L.; YASSEN, G. H. Antibacterial Effects of Antimicrobials Used in Regenerative Endodontics against Biofilm Bacteria Obtained from Mature and Immature Teeth with Necrotic Pulp. *Journal Endodontics*, v. 43, n.4, p. 575-579, 2017.

JAHROMI, M. Z.; BARATI, M.; BARATI, J. Coronal Discoloration Potential after Using Two Root Canal Dressings (Calcium-Hydroxide vs. Triantibiotic Dressing). *The J of Islamic Dent Association of Iran*, v. 24, n. 3, p. 205-209, 2012.

JEERUPHAN, T.; JANTARAT, J.; YANPISET, K.; SUWANNAPAN, L.; KHEWSAWAI, P.; HARGREAVES, K. Mahidol Study 1: Comparison of Radiographic and Survival Outcomes of Immature Teeth Treated with Either Regenerative Endodontic or Apexification Methods: A Retrospective Study. *Journal Endodontics*, v. 38, n. 10, p. 1330-6, 2012.

KAUSHIK, S. N.; KIM, B.; WALMA, A. M.; CHOI, S.; WU, H.; MAO, J. J.; JUN, H.; CHEON, K. Biomimetic microenvironments for regenerative endodontics. *Biomaterials Research*, v. 20, n. 14, p.1-12, 2016.

KAYAOGU, G.; ORSTAVIK, D. Virulence factors of *Enterococcus faecalis*: relationship to endodontic disease. *Crit Rev Oral Biol Med.*, v. 15, p. 308-320, 2004.

KEREKES, K.; HEIDE, S.; JACOBSEN, I. Follow-up examination of endodontic treatment in traumatized juvenile incisors. *Journal Endodontics*, v, 6, n. 9, p. 744-749, 1980.

KIM, J. H.; KIM, Y.; SHIN, S. J.; PARK, J. W.; JUNG, I. Y. Tooth Discoloration of Immature Permanent Incisor Associated with Triple Antibiotic Therapy: A Case Report. *Journal Endodontics*, v. 36, n. 66, p. 1086-1091, 2010.

KITIKUSON, P.; SRISUWAN, T. Attachment Ability of Human Apical Papilla Cells to Root Dentin Surfaces Treated with Either 3Mix or Calcium Hydroxide. *J Endodon.* v. 42, n.1, p. 89-94, 2016.

KONTAKIOTIS, E. G.; FILIPPATOS, C. G.; AGRAFIOTI, A. Levels of evidence for the outcome of regenerative endodontic therapy. *Journal Endodontics*, v. 40, n. 8, p. 1045-1053, 2014.

KUNDABALA, M.; ABHISHEK, P.; NEETA, S. Regenerative endodontics: a review. *Malays Dent J*, v. 31, n. 2, p. 94-100, 2010.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. *SCIENCE*, v.14, n. 260 (5110), p.920-6, 1993.

LATHAM, J.; FONG, H.; JEWETT, A; et al. Disinfection efficacy of current regenerative endodontic protocols in simulated necrotic immature permanent teeth. *J Endod*, v. 42, p.1218–25, 2016.

LEMOS, M. A. Indução da diferenciação de células derivadas de tecido adiposo em células da linhagem osteogênica [dissertação], Porto Alegre (RS): PUCRS; 2008.

LIN, J.; ZENG, Q.; WEI, X.; ZHAO, W.; CUI, M.; GU, J.; LU, J.; YANG, M.; LING, J. Regenerative endodontics versus apexification in immature permanent teeth with apical periodontitis: A prospective randomized controlled study. *J Endodon*, v. 43, n. 11, p. 1821-27, 2017.

LOVE, R.M. *Enterococcus faecalis*—A mechanism for its role in endodontic failure. *Int Endod J.* v. 34, p. 399–405, 2001.

LOVELACE, T. W.; HENRY, M. A.; HARGREAVES, K. M.; 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 Endodon*, v. 37, n. 2, p. 133-138, 2011.

MACDONALD, K. K.; CHEUNG, C. Y.; ANSETH, K. S. Cellular delivery of TGFbeta1 promotes osteoinductive signalling for bone regeneration. *J tissue Eng Regen Med.*, v. 1, p. 314-317, 2010.

MALAVAL, L.; MODROWSKI, D.; GUPTA, AK; AUBIN, J.E. Cellular expression of bone-related proteins during in vitro osteogenesis in rat bone marrow stromal cell cultures. *J Cell Physiol.* v.158, n.3, p.555-72, 1994.

MARTIN, E. D.; DE ALMEIDA, J. F.; HENRY, M. A.; KHAING, Z. Z.; SCHMIDT, C. E.; TEIXEIRA, F. B.; DIOGENES, A. Concentration-dependent Effect of Sodium Hypochlorite on Stem Cells of Apical Papilla Survival and Differentiation. *J Endodon*, v. 40, n. 1, p. 51-55, 2014.

MARTINHO, F.; GOMES, B. Quantification of Endotoxins and Cultivable Bacteria in Root Canal Infection before and after Chemomechanical Preparation with 2.5% Sodium Hypochlorite. *J Endodon* v. 34, n. 3, p. 268-272, 2008.

MESCHI, N.; PETRA HILKENS, P.; LAMBRICHTS, I.; VAN DEN EYNDE, K.; MAVRIDOU, A.; STRIJBOS O.; DE KETELAERE, M.; VAN GORP, G.; LAMBRECHTS, P. Regenerative endodontic procedure of an infected immature permanent human tooth: an immunohistological study. *Clin Oral Invest*, n. 20, p. 807–814, 2016.

MOORREES, C. F.; FANNING, E. A.; HUNT, E. E. Age variation of formation stages for ten permanent teeth. *J Dent Res*, v. 42, p. 1490-1502, 1963.

MORADI, S.; TALATI, A.; FORGHANI, M.; JAFARIAN, A. H.; NASERI, M. ; SHOJAEIAN, S. Immunohistological Evaluation of Revascularized Immature Permanent Necrotic Teeth Treated by Platelet-Rich Plasma: An Animal Investigation. *Cell Journal*, v. 18, n. 3, p. 389-396, 2016.

MURRAY, P. E.; GARCIA-GODOY, F.; HARGREAVES, K. M. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *Journal Endodontics*, v. 33, p. 377-390, 2007.

NAIR, P. N. R. Endodontic biofilm, technology and pulpal regenerative therapy: where do we go from here? *Int Endod J*, v. 47, p. 1003–1011, 2014. apud

NAGATA, J.; GOMES, B. P. F.; ROCHA, L. T.; MURAKAMI, L.; FARIA, D. E.; CAMPOS, G. R.; SOUZA-FILHO, F.; SOARES, A. Traumatized Immature Teeth Treated with 2 Protocols of Pulp Revascularization. *Journal Endodontics*, v. 40, n. 5, p. 606-612, 2014.

NOSRAT, A.; SEIFI, A.; ASGARY, S. Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. *Journal Endodontics*, v. 37, n. 4, p. 562-567, 2011.

NOVIKOFF, A. B.; NOVIKOFF, P. M.; ROSEN, O. M.; RUBIN, C. S. Organelle relationships in cultured 3T3-L1 preadipocytes. *J Cell Biol.*, v. 87, n. 1, p. 180-186.1980.

ORDINOLA-ZAPATA, R.; BRAMANTE, C. M.; APRECIO, R. M.; HANDYSIDES R.; JARAMILLO, D. E. Biofilm removal by 6% sodium hypochlorite activated by different irrigation techniques. *Int Endod Journal*. v. 47, p. 659–666, 2014.

PEREIRA, T. C.; de VASCONCELOS, L. R.; GRAEFF, M. C.; HUNGARO DUARTE, M. A.; BRAMANTE, C. M.; de ANDRADE, F. B. Intratubular disinfection with tri-

antibiotic and calcium hydroxide pastes. *Acta Odontol Scand.* v.75, n.2, p.87-93, 2017.

PETER, E. et al. Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *Journal Endodontics*, v. 33, n. 4, April 2007.

PETRINO, J. A.; BODA, K. K.; SHAMBARGER, S.; BOWLES, W. R.; MCCLANAHAN, S. B. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *Journal Endodontics*, v. 36, n. 3, p. 536-541, 2010.

PITTENGER, M. F.; MACKAY, A. M.; BECH, S. C.; JAISWAL, R. K.; DOUGLAS, R.; MOSCA, J. D.; MOORMAN, M. A. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, v. 2, n. 284, p. 143-147, 1999.

RAFTER, M. Apexification: a review. *Dental Traumatology*, v. 21, n. 1, p. 1-8, 2005.

REYNOLDS, K.; JOHNSON, J. D.; COHENCA, N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod Journal*, v. 42, p. 84-92, 2009.

ROBERTS-CLARK, D.; SMITH, A. J. Angiogenic growth factors in human dentine matrix. *Arch Oral Biol.*, v. 45, p. 1013-1016, 2000.

ROÇAS, I.N.; SIQUEIRA, J.F., JR. Identification of bacteria enduring endodontic treatment procedures by a combined reverse transcriptase-polymerase chain reaction and reverse-capture checkerboard approach. *J. Endod.* v. 36, p. 45-52, 2010.

ROGHANIZADEH, L.; FAZLYAB, M. Revascularization and apical plug in an immature molar. *Iran Endod J.* n. 13, v. 1, p. 139-142, 2018.

RUPAREL, N. B.; DE ALMEIDA, J. F.; HENRY, M. A.; DIOGENES, A. A characterization of stem cell of apical papilla cell line: effect os passage on cellular phenotype. *J Endod*, v. 39, n. , p. 357-63, 2013.

ROUGHANI A.; ERFANZADEH M.; JAFERZADEH H.; NAJAFI E. Comparison of residual triple antibiotic paste, propolis an calcium hydroxide on root canal wall in natural open apex teeth: An in vitro study. *Iran Endod J.* v.13, n.1, p.25-29, 2018.

SABRAH, A. H.; YASSEN, G. H.; GREGORY, R. L. Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. *J Endod*, v. 39, p. 1385-9, 2013.

SATO, I.; KURIHARA-ANDO, N.; KOTA, K.; IWAKU, M.; HOSHINO, E. Sterilization of infected rootcanal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin,

metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod Journal*, v. 29, n. 2, p. 118-124, 1996.

SCHMALZ, G.; WIDBILLER, M.; GALLER, K. M. Signaling Molecules and Pulp Regeneration. *J Endod*, v. 43, n. 9S, p.S7-S11, 2017.

SCHOPPER, C.; ZIYA-GHAZVINI, F.; GORIWODA, W.; MOSER, D.; WANSCHITZ, F.; SPASSOVA, E. et al. HA/TCP compounding of a porous CaP biomaterial improves bone formation and scaffold degradation—a long-term histological study. *J Appl Biomater*. v. 74, p. 458-467, 2005.

SHAH, N.; LOGANI, A.; BHASKAR, U.; AGGARWAL, V. Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endodontics*. v. 34, n. 8, p.919-925, 2008.

SHEEHAN, D.; HRAPCHAK, B. *Theory and Practice of Histotechnology*. 2<sup>a</sup> Ed, Ohil: Battelle Press, 1980.

SHEEHY, E.; ROBERTS, G. Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *British Dental Journal*, v. 183, p. 241-246, 1997.

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 Journal*, v. 42, p. 1118-1126, 2009.

SHOKRANEH, A.; FARHAD, A.; FARHADI, N.; SAATCHI, M.; HASHEMINIA, S. Antibacterial effect of triantibiotic mixture versus calcium hydroxide in combination with active agents against *Enterococcus faecalis* biofilm. *Dental Materials Journal*, v. 33, n. 6, p. 733-738, 2014.

SIMON, S.; RILLIARD, F.; BERDOL, A.; MACHTOU, P. The use of mineral trioxide aggregate in one-visit apexification treatment: a prospective study. *Int Endod Journal*, v. 46, p. 186-197, 2007.

SIQUEIRA, J.; LOPES, H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod Journal*, v.32; p. 361-369, 1999.

SIQUEIRA JR, J. F.; ROÇAS, I. N. Diversity of endodontic microbiota revisited. *J Dent Res*, v. 88, n. 11, p. 969-981, 2009.

SKOGLUND, A.; TRONSTAD, L.; WALLENIIUS, K. A. microangiographic study of vascular changes in replanted and autotransplanted teeth of young dogs. *Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology*, v. 45, p. 17-28, 1978.

SMITH, A. J.; MATTHEWS, J. B.; HALL, R. C. Transforming growth factor -  $\beta$ 1 (TGF -  $\beta$ 1) in dentine matrix: ligand activation and receptor expression. *Eur J Oral Sci.*, v. 106, p. 179-184, 1998.

SMITH, A. J. Vitality of the dentin-pulp complex in health and disease: growth factors as key mediators. *J Dent Educ.*, v. 67, p. 678-689, 2003.

SOARES, A. J.; LINS, F. F.; NAGATA, J. Y.; GOMES, B. P.; ZAIA, A. A.; FERRAZ, C. C. Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide an 2% chlorhexidine gel. *J Endod.*, v. 39, n. 3, p. 417-420, 2013.

SONOYAMA, W.; LIM, Y.; FANG, D. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS ONE*, v. 1, n. 79, p. 1-8, 2006.

SONOYAMA, W.; LIU, Y.; YAMAZA, T.; TUAN, R.S.; WANG, S.; SHI, S.; HUANG, J. G. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth - A pilot study. *J Endod.*, v. 34, n. 2, p. 166-171, 2008.

STUART, C. H.; SCHWARTZ, S. A.; BEESON, T. J.; OWATZ, C. B. *Enterococcus faecalis*: its role in root canal treatment failure and current concepts in retreatment. *J Endod.*, v. 32, p. 93-98, 2006.

TAGELSIR, A.; YASSEN, G. H.; GOMEZ, G. F.; GREGORY, R. Effect of Antimicrobials Used in Regenerative Endodontic Procedures on 3-week-old *Enterococcus faecalis* Biofilm. *J Endod.*, v. 42, n. 2, p. 258-262, 2016.

TARTARI, T.; BACHMANN, L.; MALIZA, A. G.; de ANDRADE, F. B.; DUARTE, M. A. H.; BRAMANTE, C. M. Composition by different sodium hypochlorite concentrations. *J Appl Oral Sci.* v. 24, n. 3, p. 291-298, 2016.

TAWFIK, H.; ABU-SEIDA, A.; HASHEM, A.; NAGY, M. Regenerative potencial following revascularization of immature permanent teeth with necrotic pulps. *Int Endod J.*, v. 46, p. 910-922, 2013.

THIBODEAU, B.; TEIXEIRA, F.; YAMAUCHI, M.; CAPLAN, D; TROPE, M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.*, v. 33, n. 6, p. 680-689, 2007.

THOMAS, M. S. Crown discoloration due to the use of triple antibiotic paste as an endodontic intra-canal medicament. *Saudi Endod J.*, v. 4, n. 1, p. 32-35, 2014.

TOLEDO, R.; BORGES BRITTO M. L.; PALLOTTA, R. C.; CLEBER KEITI NABESHIMA, C. K. Hidróxido de Cálcio e Iodofórmio no tratamento endodôntico de dentes com rizogênese incompleta. *Int J Dent*, v. 9, n.1, p. 28-37, 2010.

TORABINEJAD, M.; FARAS, H.; CORR, R.; WRIGHT, K.; SHABAHANG, S. Histologic Examinations of Teeth Treated with 2 Scaffolds: A Pilot Animal Investigation. *J Endod.*, v. 40, n. 4, p. 515-520, 2014.

TREVINO, E.; PATWARDHAN, A.; HENRY, M.; PERRY, G.; DYBDAL-HARGREAVES, N.; HARGREAVES, K.; DIOGENES, A. Effect of Irrigants on the Survival of Human Stem Cells of the Apical Papilla in a Platelet-rich Plasma Scaffold in Human Root Tips. *J Endod.*, v. 37, n. 8, p. 1109-1115, 2011.

TRONSTAD, L. Root resorption--etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol.*, v. 4, n. 6, p. 241-252, 1988.

VAN DER SLUIS, L. W.; VOGELS, M. P.; VERHAAGEN, B.; MACEDO, R.; WESSELINK, P. R. Study on the influence of refreshment/activation cycles and irrigants on mechanical cleaning efficiency during ultrasonic activation of the irrigant. *J Endod.* v.36, p. 737-740, 2010.

VERNA, P.; NOSRAT, A.; KIM, J. R.; PRICE, J. B.; WANG, P; BAIR, E.; XU, H. H.; FOUAD, A. F. Effect of residual bacteria on the outcome of pulp regeneration In vivo. *J Dent Res.* v. 96, n. 1, p. 100-106, 2017.

VIANA, M. E.; HORTZ, H.; GOMES, B. P.; CONRADS, G. 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. 484-492, 2006.

VISHWANAT, L.; DUONG, R.; TAKIMOTO, K.; PHILLIPS, L.; ESPITIA, C. O.; DIOGENES, A.; RUPAREL, S. B.; KOLODRUBETZ, D.; RUPAREL, N. B.; Effect of Bacterial Biofilm on the Osteogenic Differentiation of Stem Cells of Apical Papilla. *J Endodon.* v. 43, n. 6, p. 916-22, 2017.

VOLPONI, A. A.; PANG, Y.; SHARPE, P. T. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.*, v. 20, n. 12, p. 715-722, Dec. 2010.

WANG, X.; THIBODEAU, B.; TROPE, M.; LIN, L.; HUANG, G. T. Histologic characterization of regenerate tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod.*, v. 36, n. 1, p. 56-63, 2010.

WANG, J.; JIANG, Y.; CHEN, W.; ZHU, C.; LIANG, J. Bacterial flora and extraradicular biofilm associated with the apical segment of teeth with post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* v. 38, p. 954–959, 2012.



WEIBO, Z.; WALBOOMERS, F.; SHI, S.; FAN, M.; JANSEN, J. A. Multilineage Differentiation Potential of Stem Cells Derived from Human Dental Pulp after Cryopreservation. *T Engineering.*, v. 12, n. 10, p. 2813-2823, 2006.

WINDLEY, W.; TEIXEIRA, F.; LEVIN, L.; SIGURDSSON, S.; TROPE, M. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod.*, v. 31. n.6 , p. 433-439, 2005.

YANG, S.; RIVERA, E.; BAUMGARDNER, K.; WALTON, R. E.; STANFORD, C. Anaerobic tissue-dissolving abilities of calcium hydroxide and sodium hypochlorite. *J Endod.*, v. 21, n. 12, p. 613-616, 1995.

YASSEN, G. H.; SABRAH, A. H. A.; ECKERT; G.J.; PLATT J. A. Effect of Different Endodontic Regeneration Protocols on Wettability, Roughness, and Chemical Composition of Surface Dentin. *J. Endodon.* v. 41, n. 6, p. 956-60, 2015.

YASUHIKO, T. Tissue regeneration based on tissue engineering technology *Congenital Anomalies*, v. 44, p. 111-124, 2004.

ZHANG, W.; YELICK, P. C. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent*, v. 2010, p. 1-9, 2010.

PROVENZANO, J.C.; SIQUEIRA, J.F., JR.; ROCAS, I.N.; DOMINGUES, R.R.; PAES LEME, A.F.; SILVA, M.R. Metaproteome analysis of endodontic infections in association with different clinical conditions. *PLoS ONE*, 8, e76108, **2013**

## **ANEXO I – TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS.**

### **TERMO DE DOAÇÃO DE DENTES HUMANOS**

Pretendemos realizar uma pesquisa que tem o objetivo de avaliar a citotoxicidade e o potencial de diferenciação das células da papila apical e da polpa dentária em contato com a pasta de hidróxido de cálcio e com a pasta triantibiótica, bem como testar o potencial antimicrobiano de ambas.

Para isto, precisamos de dentes humanos extraídos para o desenvolvimento do estudo.

Como esta pesquisa será realizada em dentes extraídos por indicação terapêutica, não existem riscos a sua saúde.

No decorrer da pesquisa e na publicação dos resultados sua identidade será mantida em sigilo absoluto através da omissão total de quaisquer informações que permitam identificá-lo(a).

O prazo máximo de armazenamento deste material biológico será de 10 anos. Caso queira, o sujeito da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, pode retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico, valendo a desistência a partir da data dessa formalização.

Os resultados da pesquisa serão divulgados na Instituição Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), podendo ser publicados posteriormente. Os dentes utilizados na pesquisa ficarão sob a guarda do pesquisador e após a conclusão da pesquisa serão descartados conforme as normas de descarte de materiais biológicos da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Ressaltamos também que a não concordância em doar os dentes para este estudo não implica em qualquer modificação no tratamento estabelecido.

Caso tiver qualquer dúvida em relação à pesquisa, ou aos seus resultados, poderá entrar em contato com os pesquisadores Daiana Giannastasio telefone (51) 981618171 e João Batista Weber (51) 992860758. Caso você tenha qualquer dúvida quanto aos seus direitos como participante de pesquisa, entre em contato com Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP-

PUCRS) em (51) 33203345, Av. Ipiranga, 6681/prédio 50 sala 703, CEP: 90619-900, Bairro Partenon, Porto Alegre – RS, e-mail: cep@pucrs.br, de segunda a sexta-feira das 8h às 12h e das 13h30 às 17h. O Comitê de Ética é um órgão independente constituído de profissionais das diferentes áreas do conhecimento e membros da comunidade. Sua responsabilidade é garantir a proteção dos direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes por meio da revisão e da aprovação do estudo, entre outras ações.

Ao assinar este termo de consentimento, você não abre mão de nenhum direito legal que teria de outra forma.

Não assine este termo de consentimento a menos que tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e tenha recebido respostas satisfatórias para todas as suas dúvidas.

Se você concordar em participar deste estudo, você rubricará todas as páginas e assinará e datará duas vias originais deste termo de consentimento. Você receberá uma das vias para seus registros e a outra será arquivada pelo responsável pelo estudo.

Após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade e esclarecimentos sempre que desejar.

Eu, ....., CPF nº ....., autorizo a coleta, o depósito, o armazenamento e a utilização do(s) meu(s) dente(s) ....., extraídos por indicação terapêutica, conforme consta em meu prontuário clínico, para a pesquisa **“AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO*”**.

Este documento foi elaborado em duas vias, uma ficará com o pesquisador responsável e a outra com o sujeito da pesquisa.

Declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, e concordo em doar meus dentes, conforme os dados acima.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

---

Assinatura do doador

---

Assinatura do Pesquisador Responsável

---

Testemunha

## **ANEXO II – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO – MENOR**

Nós, João Batista Weber e Daiana Giannastasio, responsáveis pela pesquisa intitulada **AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO***”, estamos fazendo um convite para que seu/sua filho(a) \_\_\_\_\_, participe como voluntária desse estudo.

Essa pesquisa pretende avaliar diferentes medicações intracanal quanto sua ação sobre as células dos indivíduos e sobre os microorganismos causadores de doenças. Será solicitada a doação de dentes de pacientes que tenham indicação ortodôntica para extração e que procurem a Clínica de Especialização em Cirurgia Bucomaxilo Facial da Faculdade de Odontologia da PUCRS, em porto Alegre, localizada na Avenida Ipiranga 6681 – Partenon, prédio 6, sala 107.

Acreditamos que seja importante porque mais estudos nessa área são ainda necessários e, para que os tratamentos endodônticos em pacientes com formação incompleta da raiz e morte pulpar sejam cada vez mais eficazes.

A participação de seu/sua filho (a) será de forma voluntária, e ele (a) só participará da pesquisa se concordar em participar e, após, assinar o Termo de assentimento.

Os benefícios que esperamos co este estudo são: auxiliar antigas e futuras pesquisas empenhadas em definir uma medicação mais compatível com as células dos pacientes e mais eficaz em combater o processo infeccioso no interior do canal.

Durante todo o período da pesquisa, você tem o direito de esclarecer qualquer Dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento, bastando entrar em contato com o professor João Batista Weber no telefone (51) 992860758 a qualquer momento.

Você tem garantido o seu direito de não aceitar que seu/sua filho (a) participe ou mesmo de retirar sua permissão, a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo ou retaliação, pela sua decisão.

As informações dessa pesquisa serão confidenciais, e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação do (a) seu/sua filho (a), a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a participação do (a) mesmo(a).

Caso você tenha qualquer dúvida quanto aos direitos do (a) seu/sua filho (a) como participante da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa

da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEP\_PUCRS) em (%!) 3353-3345, Av Ipiranga 6681, prédio 50 sala 703, CEP 90619-900, bairro Partenon, Porto Alegre – RS, e-mail: [CEP@pucrs.br](mailto:CEP@pucrs.br), de segunda a sexta-feira das 8 às 12 horas e das 13:30 às 17 horas. O comitê de Ética é um órgão independente, constituído de profissionais das diferentes áreas do conhecimento e membros da comunidade. Sua responsabilidade é garantir a proteção dos direitos, a segurança e o bem-estar dos participantes por meio da revisão e da aprovação do estudo, entre outras ações.

Ao assinar esse termo de consentimento, você não abre mão de nenhum direito legal que teria de outra forma.

Não assine esse termo de consentimento a menos que tenha tido a oportunidade de fazer perguntas e tenha recebido respostas satisfatórias para todas as suas dúvidas.

Se você concordar que seu/sua filho (a) participe do estudo, você rubricará todas as páginas, assinará e datará duas vias originais deste termo de consentimento. Você receberá uma das vias para seus registros e a outra será arquivada pelo responsável pelo estudo.

Eu, \_\_\_\_\_, após a escuta deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que a participação de minha filha é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem que ele/ela sofra penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa e da garantia de confidencialidade e de esclarecimento sempre que desejar.

Diante do exposto, expresso minha concordância de espontânea vontade que meu/minha filho (a) \_\_\_\_\_, participe da pesquisa.

---

Representante legal do participante da pesquisa

## DECLARAÇÃO DO PROFISSIONAL QUE OBTEVE O CONSENTIMENTO

Expliquei integralmente os objetivos do estudo ao representante legal e ao participante da pesquisa. Na minha opinião e na opinião do participante e do cuidador, houve acesso suficiente às informações, incluindo riscos e benefícios, para que uma decisão consciente seja tomada.

Porto Alegre, \_\_\_\_\_

---

João Batista Blessmann Weber  
Pesquisador Responsável

### **ANEXO III - TERMO DE ASSENTIMENTO**

Você está sendo convidado para participar da pesquisa **AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO***". Seus pais permitiram que você participe.

Queremos saber se você aceita participar da pesquisa que tem como objetivo avaliar os possíveis danos que algumas medicações podem causar as células dos dentes.

As crianças que irão participar dessa pesquisa têm de 16 a 17 anos de idade.

O desconforto em participar da pesquisa será mínimo, pois só utilizaremos seu dente após ele ter sido extraído conforme indicado pelo seu dentista.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir. Mesmo não concordando em participar da pesquisa você será atendido nesta clínica.

A pesquisa será feita n(o)a Instituto de Pesquisas biomédicas da PUCRS, onde as células do seu dente entrarão em contato com algumas medicações para avaliar se existe danos as mesmas. Caso tenha alguma dúvida, você pode nos procurar pelo telefone 81618171 - Daiana Giannastasio ou 992860758 João Batista Weber

Mas há coisas boas que podem acontecer como auxiliar no tratamento de dentes de pacientes jovens, para auxiliar na formação da raiz de dentes com morte da polpa.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar as crianças que participaram da pesquisa. Quando terminarmos a pesquisa faremos uma apresentação dos resultados da pesquisa para as colegas e professores e um artigo será publicado.



Se você tiver alguma dúvida, você pode me perguntar ou para qualquer outro pesquisador. Eu escrevi os telefones na parte de cima desse texto.

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar da pesquisa **“AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO*”**, que tem o objetivo de avaliar os possíveis danos que algumas medicações podem causar as células dos dentes. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir que ninguém vai ficar furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e concordo em participar da pesquisa.

Porto Alegre, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Assinatura do(a) menor

---

Pesquisador(a) Responsável

---

Pesquisador(a) Associado(a)

## ANEXO IV – CARTA DA CLÍNICA DE ESTÁGIO EM CIRURGIA E TRAUMATOLOGIA BUCOMAXILOFACIAL II (CBMF)

PORTO ALEGRE 17 DE DEZEMBRO DE 2017.

### AUTORIZAÇÃO PARA USO DE DEPENDÊNCIAS DE CLÍNICA

À Comissão de Ciência e Ética da Faculdade de Odontologia-PUCRS

Autorizo, pelo presente, que as dependências da Clínica de Estágio em Cirurgia e Traumatologia Bucomaxilofacial II, por mim coordenadas sejam utilizadas pelo(s) pesquisador(es) Daiana Giannastasio e João Batista Weber, com a finalidade de conduzir experimentos necessários à tese intitulada "AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO*".

Atenciosamente,



---

Prof. Dr. Raphael Loro

## ANEXO V – CARTA INSTITUTO DE PESQUISAS BIOMÉDICAS DA PUCRS

Porto Alegre, 17 de Dezembro de 2017.

### AUTORIZAÇÃO DO USO DE DEPENDÊNCIAS DE LABORATÓRIO

À Comissão de Ciência e Ética da Faculdade de Odontologia-PUCRS

Autorizo, pelo presente, que as dependências do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por mim coordenadas sejam utilizadas pelo(s) pesquisador(es) Daiana Giannastasio e João Batista Weber, com a finalidade de conduzir experimentos necessários à tese intitulada "AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO*"

Atenciosamente,

  
\_\_\_\_\_  
Profª Drª Denise Cantarelli Machado

## ANEXO VI - CARTA LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA DA PUCRS

Porto Alegre, 17 de Dezembro de 2017.

### AUTORIZAÇÃO DO USO DE DEPENDÊNCIAS DE LABORATÓRIO

À Comissão de Ciência e Ética da Faculdade de Odontologia-PUCRS

Autorizo, pelo presente, que as dependências do Laboratório de Imunologia e Microbiologia da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por mim coordenadas sejam utilizadas pelo(s) pesquisador(es) Daiana Giannastasio e João Batista Weber, com a finalidade de conduzir experimentos necessários à tese intitulada "AVALIAÇÃO DE MEDICAÇÕES INTRACANAL UTILIZADAS NA TERAPIA DE REVASCULARIZAÇÃO: ESTUDO *IN VITRO*".

Atenciosamente,

  
Profª Drª Sílvia Dias de Oliveira



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul  
Pró-Reitoria Acadêmica  
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar  
Porto Alegre - RS - Brasil  
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564  
E-mail: [proacad@pucrs.br](mailto:proacad@pucrs.br)  
Site: [www.pucrs.br/proacad](http://www.pucrs.br/proacad)