



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**REVASCULARIZAÇÃO PULPAR EM DENTES IMATUROS
NECRÓTICOS**

Trabalho submetido por
Marta Ferreira e Carreira da Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2018



INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

**REVASCULARIZAÇÃO PULPAR EM DENTES IMATUROS
NECRÓTICOS**

Trabalho submetido por
Marta Ferreira e Carreira da Silva
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Luísa Bandeira Lopes

Outubro de 2018

Agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar, à minha família, por todo o apoio que me deram ao longo destes 5 anos. Sem eles nada disto seria possível e são a parte mais importante da minha vida.

Queria agradecer à Prof. Doutora Luísa Bandeira Lopes, por ter aceite orientar o meu trabalho e por todos os ensinamentos que me transmitiu.

Ao Instituto Universitário Egas Moniz e a tudo o que vivenciei nesta casa. Foi um percurso inesquecível graças a todos os professores, docentes, academistas, colegas de curso. Foi a minha segunda casa durante muito tempo e nunca o esquecerei. Têm todos um lugar especial no meu coração.

À Associação de Estudantes do Instituto e à praxe da Egas Moniz, que foram complementos importantes nestes 5 anos, e sem eles não teria sido o mesmo.

A todos os meus amigos, mas queria agradecer de uma forma especial à Mariana Ramos, à Soraia Rolim, ao António, meu amigo de todas as horas, e à Adriana Palmela.

Ao meu querido Buzzi, por todo o carinho, compreensão e amor.

E por fim, à minha Letinha, que cuida de mim como mais uma estrelinha no céu.

Resumo

A revascularização pulpar é um novo método de tratamento para dentes permanentes necróticos imaturos que permite a estimulação do desenvolvimento apical e a maturação radicular dos mesmos.

A engenharia de tecidos e a utilização de células estaminais, é um importante campo em crescimento, que num futuro próximo, permitirá a regeneração de um dente vital por completo a partir de uma única célula estaminal. Por sua vez, essa mesma regeneração depende da polpa residual existente e da capacidade de diferenciação das células estaminais apicais e periodontais.

Pelo menos duas técnicas de revascularização da polpa são mencionadas na literatura, uma usando hidróxido de cálcio, e uma segunda, usando por sua vez uma pasta com antibiótico triplo ou duplo.

Perante os resultados até hoje apresentados as conclusões são animadoras, oferecendo assim uma alternativa terapêutica aos métodos convencionais. Contudo, são ainda necessários mais estudos na tentativa de padronizar o melhor protocolo, esclarecer algumas dúvidas existentes e principalmente procurar um maior conhecimento dos efeitos pós-revascularização.

Palavras-chave: revascularização pulpar, ápex imaturo, células estaminais, hidróxido de cálcio.

Abstract

Pulpal revascularization is a new treatment method for permanent necrotic teeth and allows a stimulation of the apical development and root maturation of the same.

Tissue engineering and the use of stem cells is a growing field, which in the near future will allow the regeneration of a vital tooth entirely from a single stem cell. In turn, that same regeneration depends on the residual pulp and the differentiation capacity of the apical and periodontal stem cells.

At least two pulp revascularization techniques are mentioned in the literature, one using calcium hydroxide, and a second, in turn using a triple or double antibiotic slurry.

The results presented till today are animator, thus providing an alternative. However, more recent studies are needed on the attempt to standardize the protocol, clarify some existing opportunities and mainly to seek a better knowledge of the effects of post-revascularization.

Key words: pulp revascularization, immature apex, stem cells, calcium hydroxide.

Índice

1 – Introdução.....	11
2 – Metodologia da pesquisa bibliográfica.....	14
3 – Desenvolvimento	15
3.1 – A biologia da polpa dentária.....	15
3.1.1 – Células da crista neural.....	15
3.1.2 – Odontogénese	16
3.1.3 – Formação da polpa e da dentina	17
3.1.4 –Odontoblastos	18
3.1.5 – Matriz dentinária	18
3.1.6 – Zona central da polpa	18
3.1.7 – Matriz extracelular.....	19
3.1.8 – Desenvolvimento da raiz	20
3.1.9 – Papila apical.....	21
3.1.10 – Bainha radicular epitelial de Hertwig e restos epiteliais de Malassez	21
3.2 – Células estaminais	22
3.2.1 – Células estaminais dentárias.....	24
3.3 – Revascularização da polpa dentária.....	25
3.3.1 – Como acontece a revascularização	25
3.3.2 – Interação das células estaminais e o sistema imunitário.....	26
3.3.3 – Regeneração e angiogénese	27
3.4 –Técnica de revascularização	28
3.4.1 – Etapas	28
3.4.1.1 – Instrumentação.....	30
3.4.1.2 – Irrigação. Substâncias químicas auxiliares	30
3.4.1.3 – Desinfecção	33
3.4.1.4 – Provisão de <i>scaffold</i>	37
3.4.1.5 – Selagem coronal.....	40

3.4.2 – Protocolos	42
3.5 – Técnica convencional - Apexificação.....	48
3.5.1 – Apexificação com hidróxido de cálcio	49
3.5.2 – Apexificação com MTA	50
3.6 – Vantagens e desvantagens da revascularização pulpar em comparação com a apexificação	52
3.7 – Preservação	54
3.7.1 – Evidência clínica de cicatrização periapical	54
3.7.2 – Evidências radiográficas da cicatrização periapical e desenvolvimento radicular	54
3.7.3 – Resposta positiva ao teste de vitalidade da polpa.....	55
3.7.4 – Evidências histológicas de regeneração dentinária e pulpar	56
4 – Conclusão	57
5 – Bibliografia.....	59

Índice de figuras

Figura 1 – Esquema representativo do processo de formação de células com origem numa célula estaminal23

Figura 2 – Esquema representativo da técnica de revascularização40

Lista de abreviaturas

AAE – American Association of Endodontists

BMB – Proteína óssea morfogénica

CHX – Clorexidina

CIM – Concentração mínima inibitória

DFSC – Células do folículo dentário

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPSC – Células da polpa dentária de dentes adultos

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

HC – Hidróxido de cálcio

HIF – Fator induzido por hipoxia

IGF – Fator de crescimento semelhante à insulina

JAC – Junção amelo-cimentária

MTA – Agregado de trióxido mineral

NaOCl – Hipoclorito de sódio

PDLSC – Células estaminais do ligamento periodontal

PEGF – Fator de crescimento endotelial plaquetário

PGF – Fator de crescimento derivado das plaquetas

PRF – Fibrina rica em plaquetas

PRP – Plasma rico em plaquetas

PTA – Pasta tri-antibiótica

SCAP – Células estaminais da papila apical

SHED – Células estaminais de dentes decíduos exfoliados

TGF – Fator de crescimento tecidual

VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular

1 - Introdução

A vitalidade da polpa é de extrema importância para a viabilidade dentária, pois proporciona nutrição e atua como biossensor na detecção de estímulos patogênicos. A necrose pulpar está na maioria das vezes associada a processos infecciosos ou traumáticos que podem ou não ter consequências a nível dos tecidos periapicais (Palma, 2013).

O desenvolvimento radicular do dente pode continuar por 2 a 4 anos, após a sua erupção na cavidade oral (Hargreaves & Berman, 2016). No entanto, no decorrer desse período, é comum que existam situações de cárie ou que ocorra algum tipo de traumatismo, o que pode levar à lesão da polpa e da fisiologia do complexo pulpo-dentinário, e também inclusive à interrupção do desenvolvimento da raiz por necrose do feixe neuro vascular. Quando ocorre a perda prematura de uma funcionalidade normal da polpa, a formação de dentina radicular cessa, o que leva a uma parede radicular final e frágil, suscetível a fraturas radiculares e funcionalmente comprometida (Namour & Theys, 2014).

A estratégia mais aplicada para tratamento de uma infecção irreversível da polpa, em dentes imaturos, denomina-se de apexificação e passa pela remoção do tecido contaminado, e posterior preenchimento do espaço vazio com material sintético e biocompatível. Esta tem sido a primeira escolha de tratamento por muitas décadas, mas infelizmente, não permite a maturação do dente e este acaba inevitavelmente por se tornar mais vulnerável (Namour & Theys, 2014). Para além de que existem relatos de que a presença de medicação à base de hidróxido de cálcio durante o tratamento, por longos períodos de tempo, pode enfraquecer as paredes dentinárias (Andreasen, Farik, & Munksgaard, 2002).

No sentido de contornar esta problemática, foi introduzida a apexificação com uso de MTA. Ou seja, a colocação imediata de uma barreira no ápex imaturo do dente. Apresenta várias vantagens como a redução do tempo de tratamento, a sua larga estabilidade e capacidade de selamento. Mostrou assim ser uma alternativa benéfica (Parirokh & Torabinejad, 2010).

No entanto, estes procedimentos ainda restringiam a maturação radicular, e assim continuava a existir a necessidade de encontrar uma técnica alternativa, que permitisse o

restabelecimento da vitalidade do dente e que induzisse desenvolvimento radicular, bem como o encerramento apical (Namour & Theys, 2014).

No ano de 1961, Nygaard-Ostby e Hjortdal considerados pioneiros da endodontia regenerativa, demonstraram que no terço apical do espaço interior do canal, era possível encontrar tecido vital, após um tratamento de pulpectomia prévia, onde a polpa se encontrava necrosada, por meio de indução de um coágulo sanguíneo.

A regeneração de tecido pulpar foi observada pela primeira vez em dentes imaturos avulsionados e reimplantados (Ham et al., 1972) ou transplantados, observando a ocorrência ou não de revascularização da polpa (Myers e Flanagan, 1958).

Após o ano de 2000, a revascularização passou a ser considerada uma alternativa ao tratamento de apexificação. Os pesquisadores começaram a estar atentos ao facto de que uma terapia endodôntica conservativa poderia ser bastante benéfica para o tratamento de dentes imaturos (Nosrat, Seifi, & Asgary, 2011). Ao manter a vitalidade da polpa, mantem-se a capacidade de regeneração da dentina. A formação de dentina reparadora é extremamente importante para dentes permanentes imaturos, devido ao seu desenvolvimento incompleto da parede apical e dentinária (Namour & Theys, 2014).

A terapia endodôntica regenerativa foi assim definida como o conjunto de procedimentos baseados na biologia, com o objetivo de substituir estruturas, incluindo estruturas dentinárias e radiculares, bem como células do complexo polpa-dentina (Adriaens, Edwards, De Boever, & Loesche, 1988). Recentemente, o potencial de sucesso da técnica de revascularização pulpar tem vindo a aumentar, devido ao conhecimento expansivo de células estaminais (Cooper et al., 2010).

Para esta técnica, existem vários protocolos presentes na literatura. Embora apresentem algumas diferenças, existem características em comum como: pacientes jovens, dente com ápex imaturo, necrose pulpar. O tratamento normalmente não inclui instrumentação ou uma mínima instrumentação, e inclui medicação intracanal, indução de um coágulo sanguíneo ou a utilização de plasma rico em plaquetas (PRP) e por fim, a presença de um bom selamento coronário definitivo (Namour & Theys, 2014).

A região periapical do dente imaturo possui muitas células multipotentes, que apresentam uma grande capacidade de diferenciação e proliferação, podendo assim levar à formação de novas células como cementoblastos, odontoblastos e fibroblastos (Palma,

2013). Para explicar o mecanismo de revascularização em si, existem diversas teorias que serão abordadas posteriormente noutro capítulo.

Na escolha de casos para este tratamento, é avaliado o grau de desenvolvimento da raiz. O dente pode apresentar paredes radiculares divergentes para apical, sendo o ápice mais amplo do que o lúmen do canal, ou então pode apresentar paredes ligeiramente convergentes ou paralelas entre si, e com um ápice amplo. A primeira situação apresenta-se numa fase mais inicial de formação da raiz, e a segunda numa fase mais terminal (Reyes & Páucar, 2009; Palma, 2013).

Por fim, com a realização desta revisão, pretende-se realizar uma introdução da inovadora técnica de revascularização pulpar e dos seus mecanismos biológicos envolventes. Pretende-se abordar a importância da presença de células estaminais para a regeneração dos tecidos, os protocolos existentes e as fases constituintes dos mesmos, bem como os químicos auxiliares utilizados. Pretende-se realçar as vantagens desta técnica face à técnica convencional mais comumente utilizada, a apexificação, e explicar o porquê de ser em alguns casos, uma primeira opção de tratamento para dentes imaturos necróticos.

2 – Metodologia da pesquisa bibliográfica

O presente estudo abordou o tema da revascularização pulpar em dentes imaturos necróticos, buscando guidelines atuais de tratamento, para que estas possam auxiliar no diagnóstico e prognóstico. Consiste assim, numa revisão bibliográfica com informações sistematizadas e ideias extraídas da literatura disponível e publicada.

A pesquisa efetuada tem por base, artigos, textos e livros sobre esta área de conhecimento. Esta pesquisa abrange informações presentes em bases de dados e publicações de credibilidade como a American Association of Endodontists (AAE), Elsevier, Google Scholar e PubMed nos anos acadêmicos de 1958 a 2018. As palavras-chave utilizadas para esta pesquisa foram: revascularização pulpar, ápex imaturo, células estaminais e hidróxido de cálcio.

3 – Desenvolvimento

3.1 - A biologia da polpa dentária

O dente ao ser formado passa por todo um processo denominado odontogênese. Esta inclui a iniciação, morfogênese e diferenciação dos gérmenes dentários e também o desenvolvimento do periodonto, do ligamento periodontal, do cimento e do osso alveolar.

3.1.1 - Células da crista neural

A cavidade oral, no seu estado primitivo, no embrião humano, é revestida por ectoderme. A ectoderme cobre por sua vez, um tecido mesenquimatoso onde um conjunto de células proveniente da crista neural se vai depositar. Dando origem, portanto, ao ectomesênquima, que vai proporcionar várias características aos tecidos que o contêm. As células da crista neural são essenciais para a consequente determinação topográfica e morfológica dos órgãos dentários (Magloire, Couble, Romeas, & Bleicher, 2004).

A deposição das células da crista neural depende de uma programação prévia intrínseca. É controlada pela expressão génica que resulta da ativação e/ou repressão de genes, que definem assim um determinado trajeto migratório e destino final. O padrão de diferenciação e migração destas células também depende de fatores moleculares que estão presentes nos vários tecidos do organismo (Perris & Löfberg, 1986). Quando chegam ao seu destino, podem receber sinais e estímulos extrínsecos, que por sua vez vão promover o desenvolvimento de um fenótipo definitivo e final (Garant, 2003).

Durante todo o desenvolvimento dentário, passam entre o epitélio e o mesênquima muitos tipos de estímulos, que por sua vez vão levar a mudanças nos órgãos dentários (Suomalainen & Thesleff, 2010).

A ectoderme é responsável pela ativação e regulação de fatores transcritores nas células do mesênquima, que irão levar à diferenciação das células. Para que haja esta comunicação entre o ectomesênquima e o epitélio oral/epitélio do órgão do esmalte, estão envolvidos vários fatores de crescimento, fatores de transcrição, moléculas de sinalização

e componentes da matriz extracelular. O epitélio oral é como um instrutor que regula o mesênquima subjacente, inibindo ou estimulando a expressão de genes, essenciais para o desenvolvimento inicial das células (Nanci, 2012; Garant, 2003).

É importante também mencionar que esta interação e comunicação não se dá apenas em fases iniciais da formação, mas também em fases posteriores, durante processos de morfogênese e histodiferenciação. Estes continuam a ser observados na reparação e regeneração dentária e nos processos de formação da raiz do dente (McCollum & Sharpe, 2001). Deste modo, pode-se assim afirmar que as células da crista neural associadas ao epitélio oral, vão formar órgãos dentários.

3.1.2 – Odontogênese

A odontogênese é constituída por várias fases, sendo essas a fase de botão, a fase de capuz, fase de campânula, fase de coroa e fase de raiz (Gomez de Ferraris, 2009).

Primeiramente ocorre uma proliferação celular uniforme, mas posteriormente, a lâmina dentária vai apresentar atividades mitóticas distintas em diferentes locais. Começam a formar-se condensações esféricas que significam o início da fase de botão e o início do órgão do esmalte. Passa para a fase de capuz através de uma proliferação de células epiteliais, mas dá-se de uma forma que se assemelha a um capuz, daí o nome característico dado a esta fase (Gomez de Ferraris, 2009).

Na parte central do desenvolvimento epitelial é possível observar a formação de uma parte côncava ocupada por células do ectomesênquima, numa concentração maior à da fase de botão. Este conjunto de células chama-se de papila dentária, e vai contribuir para a formação da concavidade do órgão do esmalte (Nanci, 2012; Garant, 2003). Nesta fase, existe a presença de várias moléculas bioativas e existe também a formação de uma cápsula, resultante da organização do mesênquima. Essa cápsula encontra-se em torno do gérmen dentário, que ainda se encontra em desenvolvimento (o folículo dentário), que por sua vez, vai ser essencial para a formação do cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (Garant, 2003).

Em suma, nesta fase de transição verifica-se a existência de uma condensação central que irá formar a papila dentária, e uma condensação na periferia que originará os tecidos periodontais. A papila dentária conseqüentemente originará a polpa, a dentina e as células odontoblásticas (Garant, 2003; Gomez de Ferraris, 2009). Estas duas organizações vão ser extremamente importantes para os mecanismos regenerativos do dente, isto porque, são nesses locais que se vão encontrar os nichos de células estaminais com grande capacidade de diferenciação (Palma, 2013).

3.1.3 - Formação da polpa e da dentina

Na fase de campânula verificam-se vários fenômenos. A maturação e evolução da papila dentária, a diferenciação das células mesenquimatosas localizadas na periferia em odontoblastos e a formação de uma matriz dentinária. Começa a aparecer também o complexo pulpo-dentinário. O início do processo é influenciado pelos pré-ameloblastos existentes, que fazem com que as células da papila dentária parem de se dividir, aumentem o seu tamanho e iniciem a síntese da primeira camada de dentina, a dentina do manto (Gomez de Ferraris, 2009). Na formação de dentina e esmalte existe uma constante interação entre epitélio e mesenquima, uma indução recíproca onde se apresentam vários elementos como fatores de transcrição, moléculas de adesão, fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular (Nanci, 2012).

A restante papila é formada na sua maioria por células indiferenciadas, ou seja, estas células têm origem mesenquimatosa e ectodérmica (da crista neural), e têm a capacidade de se diferenciar em odontoblastos ou em fibroblastos, que respetivamente são produtores de dentina e produtores de matriz extracelular. Nos dentes jovens estas células estão presentes em elevada concentração, e existe uma reduzida quantidade de fibra, o que vai proporcionar à polpa de dentes permanentes imaturos, uma grande eficiência nos acontecimentos de regeneração e proteção do complexo dentino-pulpar (Nanci, 2012).

3.1.4 – Odontoblastos

Os odontoblastos são as células responsáveis pela mineralização e formação da matriz dentária. São células diferenciadas que já não têm capacidade de divisão, originadas no ectomesênquima da papila dentária (Garant, 2003). As células odontoblásticas estabelecem numerosos contactos entre si através das junções intercelulares. Estas junções são importantes barreiras que auxiliam no controle de fluxo de moléculas e iões (Nanci, 2012).

3.1.5 - Matriz dentinária

A matriz dentinária tem cerca de 70% material inorgânico (cristais de hidroxiapatite), 20% de material orgânico e 10% de água. Os componentes orgânicos são na sua maioria proteínas, como colagénio tipo I. Na matriz dentinária também estão presentes vários fatores de crescimento importantes nos processos de diferenciação das células estaminais em odontoblastos e células da polpa, para quando necessário, ocorra reparação da dentina ou da polpa (Nanci, 2012).

3.1.6 - Zona central da polpa

A zona central da polpa é constituída sobretudo por tecido conjuntivo laxo, mas também apresenta uma camada periférica constituída por odontoblastos, e uma região sub-odontoblástica (Nanci, 2012; Gomez de Ferraris, 2009).

As células presentes na polpa são na sua maioria fibroblastos, mas também macrófagos, linfócitos e células mesenquimatosas indiferenciadas, para além de fibras nervosas, capilares sanguíneos e linfáticos. Esta população celular tem um papel indutor, manifestando-se na formação de esmalte. Tem também a capacidade sensitiva, nutritiva

e defensiva ou reparadora. A polpa através de nervos sensitivos, pode responder a diversos estímulos agressores (Cooper et al., 2010).

A dentina terciária, em resposta a estímulos do complexo dentino-pulpar pode ser dividida em dentina reacional ou reparadora. A primeira é formada por odontoblastos originais quando ocorrem estímulos mais ligeiros, como uma extensão da formação de dentina fisiológica. Esta é formada a um ritmo semelhante a uma deposição de dentina primária (Cooper et al., 2010; Garant, 2003; Nanci, 2012; Tziafas & Kodonas, 2010). A dentina reparadora, por sua vez, é formada em resposta a agressões mais severas e é dependente da capacidade da polpa, de células mesenquimatosas presentes na mesma que vão formar novas células, odontoblastos secundários. Os odontoblastos secundários podem ser formados a partir de células odontoblásticas pré-determinadas ou por células indiferenciadas presentes normalmente nos nichos de células estaminais (Nanci, 2012; Cooper et al., 2010).

Também é importante mencionar que existem fatores de crescimento presentes na matriz de dentina, que ao ser solubilizada por ácidos bacterianos, e ao ser exposta, vai conseqüentemente libertar para a polpa fatores como TGF- α , TGF- β , TGF- β I, BMB-II, IGF-I, IGF-II e VEGF, estimulando a síntese de dentina reparadora (Cooper et al., 2010; Palma, 2013). Também são libertos elementos angiogénicos no local infetado, responsáveis por influenciar a ação de células progenitoras perivasculares (Nanci, 2012; Cooper et al., 2010).

3.1.7 - Matriz extracelular

A matriz extracelular une as células entre si, tendo como responsabilidade o desenvolvimento das mesmas. Estão presentes grupos variados de moléculas, como colagénio, elastina, fibronectina e laminina. Também estão presentes componentes como os proteoglicanos e glicoproteínas não colagénicas, que constituem a substância fundamental. A substância fundamental é amorfa e translúcida como um gel (Nanci, 2012; Garant, 2003).

A polpa de um dente imaturo, por norma tem uma elevada consistência aquosa. A substância fundamental vai proteger as células presentes e os componentes vasculares. Em situações de infeção e inflamação, a matriz extracelular pode ser degradada e assim permitir a alteração de propriedades físicas do tecido pulpar. Ou seja, o estado da substância fundamental influencia diretamente a evolução dos processos infecciosos nocivos para o dente (Gomez de Ferraris, 2009; Palma, 2013).

3.1.8 - Desenvolvimento da raiz

A formação da raiz inicia-se após a formação completa da coroa do dente, enquanto o mesmo se desloca para oclusal. O desenvolvimento do periodonto de inserção acompanha o crescimento da raiz do dente. Nesta fase também são requeridos os mecanismos de comunicação entre o epitélio e o mesênquima. A presença da bainha epitelial de Hertwig vai ser essencial neste processo (resulta de uma união do epitélio interno e externo do órgão de esmalte) (Nanci, 2012).

Esta bainha vai estimular a diferenciação das células mesenquimatosas presentes na região da periferia da papila dentária, em odontoblastos, e também vai induzir e modular a raiz dentária (Nanci, 2012; Gomez de Ferraris, 2009).

A fragmentação desta bainha, vai dar origem aos restos epiteliais de Malassez, que por sua vez, vão estabelecer zonas de contacto entre as células do folículo dentário e a dentina da raiz em desenvolvimento. Esse contacto vai fazer com que as células do mesênquima se diferenciem em cementoblastos, com que as células na periferia do folículo originem osteoblastos (que vão formar o osso alveolar) e com que as células na zona central originem fibroblastos (responsáveis pela formação de feixes de fibras de colagénio do ligamento periodontal) (Nanci, 2012; Gomez de Ferraris, 2009).

Estas estruturas formam-se ao mesmo tempo, e as fibras de colagénio ficam ligadas ao tecido ósseo e ao cimento. De uma forma coordenada, durante o desenvolvimento da dentina e da polpa, vão formando uma ancoragem para o dente, no alvéolo dentário (Nanci, 2012).

Segundo Tziafas e Kodonas, podemos considerar na zona do ápice ainda imaturo, quatro zonas anatómicas distintas, sendo estas: o saco dentário, responsável pela formação do periodonto; a polpa radicular que tem à sua volta odontoblastos, pré-dentina e dentina; a papila dentária e ainda uma zona constituinte da parte mais apical do gérmen dentário, denominada por papila apical (Tziafas & Kodonas, 2010).

3.1.9 - Papila apical

Esta área apresenta uma população abundante de células estaminais mesenquimatosas chamadas células estaminais da papila apical (SCAPs), com grande potencial regenerativo do complexo pulpo-dentinário. A estimulação e migração destas células para o interior do canal radicular é essencial para os mecanismos de regeneração pulpar (Sonoyama et al., 2008).

Devido à sua localização anatómica, e ao facto de estar circundada por periodonto, ela beneficia de uma vascularização colateral, que lhe permite sobreviver a uma situação de pulpíte irreversível ou até mesmo de necrose pulpar. Tem uma maior resistência quando ocorrem processos de infeção e inflamação. A polpa propriamente dita é separada desta papila por uma densa camada de células (Tziafas & Kodonas, 2010; Palma, 2013).

Em jeito de conclusão, a papila apical tem um potencial enorme para formação e crescimento da polpa e diferenciação de células odontoblásticas.

3.1.10 - Bainha radicular epitelial de Hertwig e restos epiteliais de Malassez

Esta bainha é originada pela proliferação das células do epitélio interno e externo do órgão do esmalte, quando já não ocorre formação de esmalte. Ela tem duas funções principais, induzir e modular a formação da raiz (Sonoyama et al., 2008).

Várias células que fazem parte da bainha de Hertwig, mantêm-se no ligamento periodontal, com o nome de restos epiteliais de Malassez. A sua presença também auxilia no desenvolvimento radicular. É ainda importante referir que a bainha consegue sobreviver a lesões inflamatórias e estimular as células estaminais do ligamento periodontal, para que ocorra um processo de diferenciação e a formação de cementoblastos. Estas células vão promover o desenvolvimento e a reparação radicular (Keinan & Cohen, 2013).

3.2 - Células estaminais

A engenharia de tecidos é um campo que envolve os vários princípios da biologia, e que tem como objetivo desenvolver substitutos ou mesmo substituir, a partir da regeneração de células, tecidos e órgãos. A partir de três elementos essenciais como células estaminais, fatores de crescimento e estruturas de apoio (coágulo sanguíneo), é possível restaurar e devolver a função normal (American Association of Endodontists, 2013).

As células estaminais são células presentes no nosso organismo que apresentam a capacidade de proliferar e de se autorrenovarem. Podem ser divididas em dois grupos, segundo a sua origem e capacidade de renovação. O primeiro grupo abrange células estaminais embrionárias, que se encontram presentes nas primeiras fases de desenvolvimento de um indivíduo, com uma capacidade de diferenciação e proliferação enorme. O segundo grupo inclui células estaminais pós-natais ou somáticas, que se encontram em tecidos do organismo e que ainda apresentam capacidade de se diferenciar, mas a uma escala menor (Soares, Knop, Jesus, & Araújo, 2007; Nakashima & Akamine, 2005).

Apesar das células embrionárias apresentarem um grande potencial para a engenharia de tecidos, levantam também muitas questões éticas e alguma instabilidade genética (como o risco de fácil contaminação em cultura e também de formação de teratocarcinomas, neoplasias malignas desenvolvidas a partir de células embrionárias). Por outro lado, as células somáticas, não acarretam limitações morais, mas têm a desvantagem de se apresentarem em reduzido número nos tecidos, provocando um maior

risco no isolamento. Na sua diferenciação, desenvolvem um espectro muito pouco variado de células, devido à sua menor capacidade de proliferação e diferenciação. (Suomalainen & Thesleff, 2010).

No entanto, foi descoberto que é possível converter células somáticas em células estaminais pluripotentes, chamadas de células estaminais pluripotentes induzidas. Apresentam assim, uma alternativa futurista para regenerar tecidos de diferentes locais e funções (Yan et al., 2010).

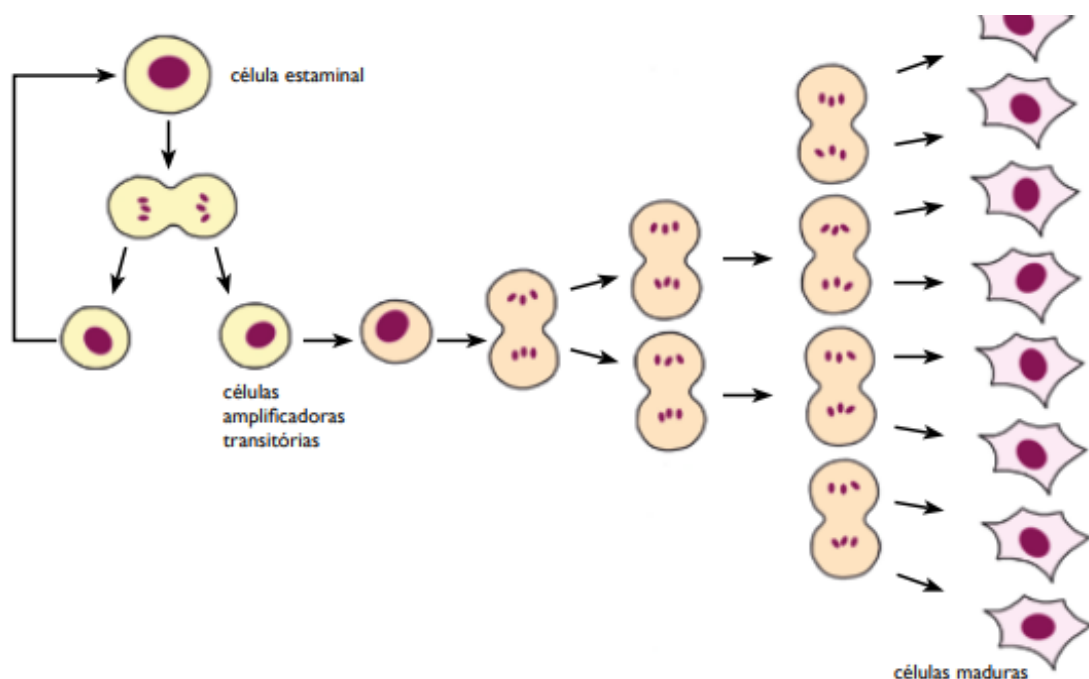


Figura 1- Esquema ilustrativo do processo de formação de células amplificadoras transitórias (com origem numa célula estaminal), levando ao aparecimento de células maduras.

Fonte: Alberts B. (2002). *Molecular Biology of the cell* (4th ed.). New York

Como é possível observar na Figura 1, cada célula estaminal, quando se divide, dá origem a duas células diferentes. Uma das células mantém o seu potencial de diferenciação, enquanto que a outra célula, passa por proliferação e diferenciação, e também por múltiplas divisões até chegar a uma célula madura. São denominadas de células amplificadoras transitórias, pois estão em transição entre uma célula mãe e uma célula final diferenciada.

Apesar das células estaminais apresentarem uma elevada capacidade para se diferenciarem, não significa que o mesmo aconteça rapidamente. O baixo índice mitótico das mesmas previne a possibilidade de mutações. Estas células em conjunto com as células progenitoras amplificadas, formam um sistema de resposta eficaz de reparação tecidos, face a estímulos externos que possam existir (Suomalainen & Thesleff, 2010).

Geralmente apresentam-se associadas umas às outras e a estruturas constituintes da matriz extracelular (formando nichos de células estaminais), constituindo assim um complexo sistema resistente e protetor face a estímulos, que previne a proliferação descontrolada. É possível mante-lo graças a uma interação constante, molecular e física, entre as células estaminais e as células em seu redor (Suomalainen & Thesleff, 2010).

3.2.1 - Células estaminais dentárias

Nos tecidos dentários existem vários nichos de células estaminais, essenciais para a formação de dentina terciária. Quando expostas a estímulos, podem desenvolver várias células diferenciadas.

Podemos caracterizar as células estaminais de origem dentária como, células da polpa dentária de dentes adultos (DPSCs), células da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados (SHEDs), células da papila apical (SCAPs), células do ligamento periodontal (PDLSCs), e células do folículo dentário (DFSCs). Todas estas células têm a capacidade de diferenciação, proliferação e autorrenovação. São consideradas células estaminais mesenquimatosas com uma enorme versatilidade, capacidade proliferativa e relativamente fácil acesso. Podem ser aplicadas em qualquer processo de engenharia de tecidos, nomeadamente a revascularização pulpar (Huang et al., 2010).

O conhecimento de mecanismos precisos, capazes de estimular uma resposta deste tipo de células, é um importante avanço para a engenharia tecidual (Palma, 2013).

Desta forma, as células estaminais embrionárias têm um tremendo potencial terapêutico, mas infelizmente, a sua aplicação clínica, ainda exige a superação de numerosas questões de ética. Portanto, o uso de células estaminais adultas, que são multipotentes ou unipotentes, podem ser atualmente uma estratégia mais viável.

3.3 - Revascularização da polpa dentária

A revascularização pulpar é atualmente vista como um método alternativo para o tratamento de dentes imaturos que sofreram necrose. É importante perceber como funciona o seu mecanismo de ação, quais as etapas a serem cumpridas nos protocolos existentes, quais as vantagens e desvantagens face ao método convencional tipicamente utilizado, a apexificação. E por fim, é importante ainda saber quais os possíveis resultados deste método e como avaliá-los.

3.3.1 - Como acontece a revascularização

A revascularização pulpar em si pode ser explicada por quatro fenômenos. O primeiro é a presença de células multipotentes, que têm um enorme potencial de diferenciação, na zona periapical. Como o ápice se encontra aberto elas proliferam para o interior do canal, podendo levar à formação de novas células como fibroblastos, cementoblastos e odontoblastos (Banchs & Trope, 2004).

O segundo envolve as células estaminais multipotentes que permanecem vitais no canal radicular. Estas estão presentes em grande quantidade nos dentes jovens. Têm a capacidade de se diferenciarem em odontoblastos, aderem às paredes internas do canal e são responsáveis pela deposição de dentina, aumentando a espessura das paredes. Ou seja, o desenvolvimento da raiz dá-se por um contínuo aumento da sua espessura e do encerramento do ápex (Shah, Logani, Bhaskar, & Aggarwal, 2008).

O terceiro fenômeno sugere que este desenvolvimento se possa dar através de células estaminais provenientes da papila apical ou da medula óssea que migram para o interior do canal, através da hemorragia provocada na zona periapical. Estas células também têm uma elevada capacidade de proliferação e de diferenciação. É importante ainda referir que o coágulo sanguíneo apresenta fatores de crescimento, fatores importantes na regeneração (Lieberman & Trowbridge, 1986).

O quarto fenômeno considera que o próprio coágulo de sangue, é uma fonte rica de fatores de crescimento e pode estimular a diferenciação, crescimento e maturação de odontoblastos, fibroblastos, cementoblastos, apresentando assim um papel muito importante na regeneração (Wang, Lin, Lin, Liu, & Shan, 2007).

Os fatores de crescimento são fatores de crescimento de proteínas, que se conectam a recetores das células e transmitem sinais para iniciar a diferenciação e a proliferação celular. Temos como exemplo a proteína morfogénica óssea (proteína capaz de transformar uma célula mesenquimatosa em cartilagem e osso), o fator de transformação de crescimento beta (participa na formação de ossos e cartilagens, no controle do sistema imune e na cicatrização de feridas, assim como no controle da inflamação intestinal), e o fator de crescimento fibroblástico (Alberts, 2008).

São sintetizados por odontoblastos e posteriormente libertos quando ocorre desmineralização da matriz dentinária (cárie). Conseguem induzir a proliferação, migração, adesão e diferenciação de células estaminais em células com capacidade de formar dentina reacional ou reparadora (Guo & Wang, 2009).

Estes fatores de crescimento presentes em plaquetas e em dentina, podem ser utilizados em técnicas de revascularização pulpar e desempenhar um papel importante no desenvolvimento regenerativo (American Association of Endodontists, 2013).

3.3.2 - Interação das células estaminais e o sistema imunitário

A resposta imunoinflamatória por parte do organismo é uma resposta natural a uma agressão do organismo. No entanto, a polpa, por ser um sistema sem circulação colateral suficiente, tem a sua capacidade para responder a infeções bacterianas comprometida. Por este motivo, quanto mais intensa for a inflamação, menor será a sua capacidade de reposta (Cooper et al., 2010; Palma, 2013).

Esta resposta vai ser constituída por diferentes células imunitárias e por uma grande variedade de fatores que regulam a sua atividade. Os odontoblastos possuem recetores que reconhecem agentes patogénicos, e assim que estes são reconhecidos, são produzidas citocinas pró-inflamatórias, que por sua vez vão estimular células imunes

(macrófagos, linfócitos e plasmócitos) que irão destruir as bactérias. Estes elementos agem em conformidade com o fator TGF- β , presente na dentina. As células estaminais têm a capacidade de receber estímulos, mas também têm capacidade de expressar citocinas e fatores de crescimento (Kim, Mehrzarin, & Kang, 2012).

Mas por outro lado, certas citocinas, parecem reduzir o potencial de diferenciação das células DPSC (Huang et al., 2010).

No entanto, mais recentemente, foi observado que não existem diferenças significativas na capacidade de diferenciação, ou na taxa de proliferação nas células estaminais de uma polpa saudável (Pereira et al., 2012).

Em suma, existe um início dos processos inflamatórios que vão desencadear os mecanismos de regeneração pulpar. No entanto, as citocinas libertadas juntamente com os fatores de crescimento, podem aumentar ou diminuir o recrutamento de células estaminais. Estas também são capazes de expressar recetores para inúmeros mediadores inflamatórios, e possuem também propriedades imunossupressoras (Cooper et al., 2010).

O equilíbrio adequado entre as células do sistema imunitário, as células estaminais e as estirpes bacterianas, poderá proporcionar um ambiente adequado propício à cicatrização tecidual (Cooper et al., 2010).

3.3.3 - Regeneração e angiogénese

O sucesso desta técnica inovadora, consiste no restabelecimento de uma vascularização, capaz de sustentar exigências metabólicas dos processos de regeneração pulpar (Alberts, 2008).

A angiogénese, a formação de novos vasos sanguíneos, inicia-se em resposta a estímulos específicos. Quando ocorre uma lesão tecidual, dá-se um crescimento de capilares nos tecidos adjacentes, constituindo um início da fase de cicatrização (Alberts, 2008).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é considerado essencial neste processo, pois ele tem a função de induzir as células endoteliais na formação de novas

estruturas capilares (Alberts, 2008; Palma, 2013). Este fator é estimulado por áreas de hipoxia, presentes na necrose pulpar e na inflamação dos tecidos (Aranha et al., 2010). Nomeadamente por uma proteína reguladora designada por HIF-I alfa (induz a transcrição do gene de VEGF) (Alberts, 2008).

Também é importante referir que o VEGF é capaz de induzir a diferenciação das SHEDs em células endoteliais (Demarco et al., 2011). E estas apresentam, por sua vez, uma enorme capacidade para se diferenciarem em estruturas vasculares.

Deste modo, podemos concluir que as células estaminais não só fornecem células indiferenciadas necessárias para a regeneração, mas também fornecem a rede vascular que suportará o tecido neoformado (Casagrande, Cordeiro, Nör, & Nör, 2011).

3.4 - Técnica de revascularização

3.4.1 – Etapas

Na Medicina Dentária existem diversos tratamentos endodônticos regenerativos, tais como, a proteção pulpar direta e indireta, a apexogénese e a revascularização pulpar. Estes procedimentos têm como objetivo, a regeneração de estruturas danificadas da raiz como as células do complexo dentino-pulpar (Murray, Garcia-Godoy, & Hargreaves, 2007).

Para que ocorra êxito no tratamento da revascularização da polpa, este depende de três elementos cruciais: a desinfeção do canal radicular, a presença do coágulo sanguíneo e o preenchimento coronário hermético (Namour & Theys, 2014; Vijayaraghavan, Mathian, Sundaram, Karunakaran, & Vinodh, 2012).

Por sua vez, a geração de um tecido funcional requer três elementos importantes: células estaminais, fatores de crescimento e um *scaffold* (Langer & Vacanti, 1993; Namour & Theys, 2014).

O diâmetro do ápice também é importante para o êxito do tratamento (Lee et al., 2015). Uma abertura apical de 1,1 mm de diâmetro ou maior é benéfica, pois quanto mais jovem for o dente, maior a sua capacidade de regeneração. A possibilidade de

revascularização aumenta em cerca de 18 a 34% em dentes com raízes imaturas (Garcia-Godoy & Murray, 2012; Lee et al., 2015).

Para além de que, diâmetros mais amplos no pré-operatório (>1mm), demonstram maior aumento de espessura radicular, comprimento e estreitamento do ápex. No entanto, estes procedimentos são bem-sucedidos em diâmetros apicais tão pequenos quanto 0,5 mm (Estefan, El Batouty, Nagy, & Diogenes, 2016).

A idade do paciente, na mesma medida, também é um fator importante a ter em conta (Cai et al., 2017). Vários relatos de tratamento endodôntico regenerativo foram limitados a pacientes que estão a atingir a adolescência, a maioria com idades entre 8 e 16 anos (Banchs & Trope, 2004; Garcia-Godoy & Murray, 2012; Lee et al., 2015). No entanto, os protocolos de revascularização pulpar podem ser utilizados em qualquer idade entre os 9 e os 18 anos (Cai et al., 2017; Estefan, El Batouty, Nagy, & Diogenes, 2016).

Um estudo realizado por Cai et al., revelou também que as crianças entre os 9 e os 13 anos de idade demonstravam uma maior taxa de sucesso no desenvolvimento da raiz do dente, do que as crianças com idades entre os 14 e os 18 anos de idade (Cai et al., 2017).

O tratamento endodôntico regenerativo não deve ser realizado em dentes decíduos, devido ao possível risco de prejudicar o padrão de erupção dos dentes permanentes (Garcia-Godoy & Murray, 2012; Lee et al., 2015).

Em relação aos resultados esperados com o tratamento de revascularização pulpar, estes podem ser divididos em quatro níveis distintos, sendo esses: a evidência clínica de cicatrização periapical, evidências radiográficas da cicatrização periapical e desenvolvimento radicular, uma resposta positiva ao teste de vitalidade pulpar e por fim, evidências histológicas de regeneração dentinária e pulpar (Banchs & Trope, 2004; Bezgin & Sönmez, 2015; Bose, Nummikoski, & Hargreaves, 2009; Iwaya, Ikawa, & Kubota, 2001; Torabinejad & Turman, 2011).

3.4.1.1 – Instrumentação

A instrumentação nem sempre é realizada porque pode prejudicar as células estaminais e os fatores de crescimento presentes no canal radicular (Nosrat, Seifi, & Asgary, 2011). As células epiteliais da bainha e os odontoblastos presentes na área apical, também essenciais para os processos de regeneração, podem não sobreviver a uma instrumentação mecânica.

Nenhum procedimento de instrumentação parece ser consistente com a preservação vital das células estaminais, e tem demonstrado efeitos negativos pelo enfraquecimento das paredes do canal radicular (Namour & Theys, 2014; Reynolds, Johnson, & Cohenca, 2009).

Segundo a literatura, os únicos dentes que recuperaram alguma vitalidade após o tratamento, não foram submetidos a instrumentação. Os dentes que foram submetidos a instrumentação, nunca mostraram quaisquer sinais de vitalidade (Cehreli, Isbitiren, Sara, & Erbas, 2011).

Portanto conclui-se assim que, a instrumentação não é indicada para casos de revascularização pulpar.

3.4.1.2 - Irrigação. Substâncias químicas auxiliares

Esta etapa é muito importante para que haja uma fase primária de correta desinfecção. É necessário que os químicos utilizados apresentem potencial bactericida e bacteriostático máximo, contudo com um efeito citotóxico mínimo, para que permitam a sobrevivência de células estaminais e dos fibroblastos (Namour & Theys, 2014).

Quando ocorre a infecção da polpa, esta geralmente pode evoluir para a região apical, criando um meio ácido no canal. Este meio ácido não é bom para a regeneração de tecidos, pois favorece a formação de biofilmes bacterianos, que se vão encontrar na entrada dos túbulos, nas paredes dos canais radiculares ou em zonas anatómicas com uma conformação que seja mais suscetível à retenção das bactérias (Namour & Theys, 2014).

Para um meio ambiente ideal para a regeneração de tecidos é essencial que haja uma desinfecção correta dos canais radiculares e uma eliminação dos biofilmes bacterianos (Namour & Theys, 2014).

Na ausência de instrumentação, uma solução de irrigação adequada para o sistema radicular é essencial. Os seguintes químicos podem ser utilizados:

1. Peróxido de hidrogénio. Não tem muita capacidade de solvente, mas tem um bom potencial hemostático. É antisséptico devido à libertação do radical de oxigénio. Infelizmente a sua ação não dura muito tempo, podendo ser neutralizada por detritos orgânicos. Requer uma irrigação com soro fisiológico para reduzir a dor e tem como problemática, poder causar enfisema gasoso no pós-operatório (Namour & Theys, 2014).

2. Clorexidina. Para medicação temporária, pode ser utilizada num gel de concentração a 2%. Atua sobre as bactérias *gram* positivas e nas *Candida*. Tem um efeito prolongado de duas a doze semanas, devido à absorção das suas moléculas pelas paredes dentinárias. Reforça deste modo, a prevenção da reinfeção do canal radicular (Namour & Theys, 2014; Rosenthal, Spångberg, & Safavi, 2004). A irrigação com clorexidina a 0,12%, além da irrigação com NaOCl, é aconselhada devido à sua capacidade antimicrobiana (Haapasalo, Shen, Wang, & Gao, 2014). No entanto, esta tem sido relatada como citotóxica para as células estaminais (Trevino et al., 2011). Portanto deve-se aplicar soro fisiológico estéril entre as irrigações para reduzir o potencial citotóxico da clorexidina no canal (Basrani, Manek, Sodhi, Fillery, & Manzur, 2007; Bezgin & Sönmez, 2015).

3. Hipoclorito de sódio. É uma referência de solução irrigadora para os tratamentos endodônticos. É um solvente de tecido necrótico e tem um bom potencial antisséptico. Quando maior for a quantidade de hipoclorito, maior é a sua citotoxicidade, como tal a concentração de 2,5% é a mais equilibrada no que toca à sua eficiência e à sua toxicidade (Namour & Theys, 2014; Rosenthal, Spångberg, & Safavi, 2004). Cunningham no seu estudo, revelou que uma temperatura elevada de 37 ° C, da solução de hipoclorito de sódio a 2,5%, poderia potenciar o seu potencial de solvente, e que a sua eficiência se tornava comparável à da solução a 5, 25% (Cunningham & Balekjian, 1980).

O hipoclorito de sódio elimina as bactérias incidentes em 40-60%. A irrigação com NaOCL, de 20 ml no canal está indicada na primeira consulta de tratamento de revascularização pulpar. No entanto, recomendam-se concentrações baixas, pois altas concentrações podem influenciar a ligação das células estaminais à superfície da dentina e podem ser tóxicas para o SCAP (células estaminais da papila apical) (Trevino et al., 2011). Ou seja, o condicionamento da dentina com NaOCL a 1,5 % revelou ter uma melhor relação com o SCAP, promovendo uma maior sobrevivência que o NaOCl em concentrações mais elevadas (G. Martin, Ricucci, Gibbs, & Lin, 2013).

4. Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). O EDTA é um composto orgânico, que age como quelante. Os quelantes são ácidos fracos que interagem com a porção mineral das paredes de dentina. Permitem a remoção da *smear layer*, bem como a libertação de fatores de crescimento (presentes na dentina desde a dentinogénese) (Namour & Theys, 2014; Srivastava & Chandra, 1999). Trevino nos seus estudos afirma que o uso de EDTA antes dos químicos de irrigação, permite uma maior taxa de sobrevivência das células estaminais da papila apical (Trevino et al., 2011).

O EDTA em concentrações de 17% é frequentemente utilizado em casos de infeção para remover a *smear layer* (Srivastava & Chandra, 1999). Apresenta também a capacidade de potenciar efeitos bactericidas e bacteriostáticos de agentes distintos. É importante ainda referir que é essencial combinar bem os irrigadores. O EDTA quando adicionado ao hipoclorito a 6%, reduz moderadamente a vitalidade das células estaminais (Trevino et al., 2011). Enquanto que quando combinado com clorexidina a 2 %, não existe sobrevivência de células estaminais (Ring, Murray, Namerow, Kuttler, & Garcia-Godoy, 2008).

Para evitar a extrusão periapical é recomendado também, o uso de uma agulha com extremidade fechada e respiros laterais ou o sistema EndoVac (American Association of Endodontists, 2013). A agulha de irrigação não deve ultrapassar o canal radicular até mais que 2 mm antes do ápex, pois quando a seringa é comprimida, a solução apenas progride 1 milímetro para além da ponta da agulha (Wigler et al., 2013).

Após irrigação do canal, é recomendada a secagem do canal radicular utilizando cones de papel estéreis. Quando se encontrar bem seco, é necessário continuar o processo de desinfecção, escolhendo a medicação intracanal adequada (Wigler et al., 2013).

A AAE recomenda a utilização de hipoclorito de sódio em baixas concentrações (20mL/canal a 1,25%, durante 5 minutos), para uma maior sobrevivência das SCAP, essenciais para o processo de regeneração. Este irrigante é o mais utilizado e apesar de apresentar uma elevada eficácia antibacteriana, também pode ser tóxico para os tecidos apicais (Haapasalo, Shen, Wang, & Gao, 2014). Por este motivo, é importante que seja utilizado nas concentrações adequadas.

Conclui-se assim que o irrigante mais adequado atualmente para a sobrevivência das células estaminais é o NaOCL.

3.4.1.3 - Desinfecção

Como já foi referido anteriormente, a desinfecção do canal radicular é essencial para obter resultados bem-sucedidos. É necessário criar um meio ambiente adequado sem bactérias (Galler, 2016).

As bactérias demonstraram penetrar mais profundamente em dentes de indivíduos jovens do que em dentes de indivíduos com uma idade mais avançada (Kakoli, Nandakumar, Romberg, Arola, & Fouad, 2009; Bezgin & Sönmez, 2015).

Posto isto, é extremamente importante haver uma desinfecção minuciosa neste tipo de dentes. Normalmente a irrigação é feita com hipoclorito de sódio e clorexidina, seguida de desinfecção com produtos antimicrobianos, como hidróxido de cálcio ou pasta antibiótica (Bezgin & Sönmez, 2015; Geisler, 2012).

Desta forma, a desinfecção pode ser realizada por:

1. Hidróxido de cálcio. Representa uma base forte com efeito antibacteriano pela libertação do ião hidroxilo. Este danifica a membrana citoplasmática das bactérias, suprime a sua atividade, desnatura proteínas e danifica o DNA. Inibe a replicação das mesmas e inativa endotoxinas. Apresenta ainda um baixo coeficiente de dissociação,

o que lhe permite ter um efeito prolongado (Chueh et al., 2009; Namour & Theys, 2014).

Sete dias aparenta ser o tempo suficiente para reduzir as bactérias *gram* negativas presentes no canal. Contudo, o pH básico pode fazer com que haja necrose do tecido apical, mas mesmo assim induz o aumento da espessura das paredes de dentina (Nosrat, Seifi, & Asgary, 2011). Caso seja utilizada a concentração de 0,01mg/ml, esta permite a desinfecção dos canais com uma taxa de sobrevivência de células estaminais apicais de 100%. Em concentrações normais, a pasta antibiótica é mais tóxica para as células estaminais do que o hidróxido de cálcio, a menos que sejam utilizadas em concentrações mais baixas (Namour & Theys, 2014; Nikita et al., 2012).

2. Pasta Antibiótica Tripla. Apesar de um antibiótico isolado ser menos citotóxico, é necessária uma combinação de antibióticos para que exista um espectro suficientemente largo para ser ativo contra todos os tipos de bactérias presentes, no canal radicular e nas regiões apicais. Nenhum antibiótico sozinho apresenta um espectro suficientemente abrangente. Os antibióticos devem ser utilizados numa concentração adequada para que exista um equilíbrio entre a desinfecção máxima e a citotoxicidade (Chuensombat, Khemaleelakul, Chattipakorn, & Srisuwan, 2013).

A PAT é uma mistura de três antibióticos, sendo estes a ciprofloxacina (espectro de *gram* positivas e *gram* negativas), o metronidazol (espectro de bactérias anaeróbias e protozoários) e a minociclina (espectro de *gram* positivas e *gram* negativas). Esta pasta é utilizada para tratamentos de terapia pulpar, e também para tratamentos de revascularização pulpar (Parhizkar, Nojehdehian, & Asgary, 2018).

Um antibiótico utilizado isoladamente é ineficaz contra bactérias presentes na polpa, dentina e lesões apicais, enquanto o trio de antibióticos permite a esterilização completa dos germes. Graças a esta combinação de antibióticos, é possível eliminar diversos grupos de bactérias *gram* positivas e negativas, proporcionando assim um meio com capacidade curativa, ou seja, permite a desinfecção dos canais radiculares para que novos tecidos se possam desenvolver na superfície radicular (Parhizkar, Nojehdehian, & Asgary, 2018).

Foram também utilizados outros antibióticos em combinação com a ciprofloxacina e o metronidazol, como a amoxicilina, o cefaclor, a fosfomicina e a

rokitamicina. Todas essas combinações de três antibióticos inibiram o crescimento bacteriano (Sato, Hoshino, Uematsu, & Noda, 1993). No entanto, nas pastas triplas que contêm obrigatoriamente minociclina, verificou-se um resultado significativamente superior na inibição bacteriana, o que levou conseqüentemente a um melhor resultado em termos de desenvolvimento radicular (Bose, Nummikoski, & Hargreaves, 2009).

Posto isto, foram descobertas pastas antibióticas com minociclina com capacidade de difusão por toda a espessura da dentina, e de desinfecção com eficiência das camadas mais profundas da dentina presente no canal radicular. (Cohenca et al., 2010). Contudo apresenta uma desvantagem, a descoloração após o tratamento. Esta pode ser reduzida, mas não eliminada completamente, segundo alguns autores, pela aplicação do sistema adesivo na dentina, antes da aplicação dos antibióticos. Inclusive, segundo outros autores, pelo selamento das paredes de dentina da cavidade de acesso, com um compósito fluído antes de introduzir a pasta no canal (Reynolds, Johnson, & Cohenca, 2009).

Encontraram no cefaclor igual eficácia antimicrobiana, comparado com a minociclina (Sato, Hoshino, Uematsu, & Noda, 1993).

As pastas antibióticas também apresentam algum nível de toxicidade para as células dentárias humanas, quando utilizadas em concentrações elevadas podem ser letais em contacto direto com SCAPs, DPSCs e fibroblastos (Chuensombat, Khemalelakul, Chattipakorn, & Srisuwan, 2013).

Para além dessa pasta, também pode ser utilizada uma medicação intracanal composta por hidróxido de cálcio e gel de clorexidina a 2% para tratamento de canais radiculares de dentes imaturos. Pode ser utilizada durante 21 dias e posteriormente na segunda sessão é induzido o coágulo sanguíneo. É assim possível obter a diminuição progressiva da largura do espaço do canal radicular, a deposição de tecidos no interior do mesmo e o desenvolvimento apical da raiz. É uma nova alternativa eficaz de tratamento (Soares et al., 2013).

O uso de pasta com antibiótico triplo mostra um maior aumento percentual na espessura das paredes do canal dentário, em comparação com o hidróxido de cálcio (Bose, Nummikoski, & Hargreaves, 2009). Esta é biocompatível para os tecidos, mas o principal problema reside na resistência bacteriana (Namour & Theys, 2014).

A minociclina é um derivado da tetraciclina semi-sintético. Pode ser substituído por cefaclor para prevenir o risco de coloração, no entanto este pode ser menos eficaz no que toca aos *Enterococcus* (Reynolds, Johnson, & Cohenca, 2009). O metronidazol é o único antibiótico que tem um pH neutro e por esse motivo não apresenta qualquer citotoxicidade para as células estaminais necessárias para o processo de regeneração. O metronidazol e a ciprofloxacina podem induzir a formação de fibroblastos (Reynolds, Johnson, & Cohenca, 2009, Namour & Theys, 2014).

De fato, a pasta tripla de antibiótico (metronidazol, ciprofloxacina e minociclina) combinada com uma solução salina apresenta a menor concentração inibitória mínima (CIM) contra a *Enterococcus faecalis* (CIM = 77,5 µg / mL). A pasta antibiótica tripla combinada com 2% de clorexidina apresenta resultados semelhantes aos da combinação de minociclina e solução salina (CIM = 325 mg / mL). O grupo menos eficaz é a combinação de hidróxido de cálcio e clorexidina (CIM = 195 000 µg / mL). O hidróxido de cálcio combinado com a solução salina não é absolutamente eficaz contra a *Enterococcus faecalis*. Posto isto, a pasta antibiótica tripla é superior contra bactérias frequentemente presentes na lesão apical, e a minociclina parece ser o componente mais ativo (Ogawa et al., 2013).

Para uma revascularização adequada da polpa, é importante encontrar antibióticos com pH neutro. Este é o meio indicado para a diferenciação das células estaminais, e também para não ocorrer afeção das paredes de dentina, que podem ser afetadas pela entrada de um componente ácido. Uma alternativa poderia ser o uso de uma solução de cloranfenicol estabilizada em pH neutro. O cloranfenicol é utilizado na ausência de alternativas para o tratamento local de conjuntivite, ceratite e úlceras da córnea. Infelizmente, parece pouco utilizado devido ao risco de efeitos adversos que devem também ser tidos em conta (Namour & Theys, 2014).

3.4.1.4 - Provisão de *scaffold*

A revascularização da polpa é definida como a reintrodução da vascularização no sistema de canais radiculares. Embora os vasos sanguíneos sejam constituintes indispensáveis da polpa dentária, a regeneração pulpar é considerada incompleta sem uma camada odontoblástica que revista a superfície dentinária, fibras nervosas nociceptivas, simpáticas e parassimpáticas, além de fibroblastos intersticiais e, mais importante, células estaminais para resbastecerem as células pulpares na polpa regenerada quando elas sofrem apoptose (Gathani & Raghavendra, 2016). Assim, uma distinção clara entre regeneração e revascularização pode ser feita da seguinte forma:

A revascularização da polpa pode ser definida como a indução da angiogênese no canal radicular. A regeneração da polpa, por sua vez, inclui não só a revascularização da polpa, mas também a reposição de odontoblastos funcionais e/ou fibras nervosas (Mao et al., 2012).

Os procedimentos de regeneração pulpar envolvem o uso de um suporte para que este possa fornecer uma estrutura, para o desenvolvimento e crescimento de vasos e células. Este suporte pode ser utilizado junto com uma grande variedade de fatores, que promovem o crescimento e a diferenciação celular (Murray, Garcia-Godoy, & Hargreaves, 2007). Normalmente a sua construção inicia-se na segunda consulta que ocorre após o acesso e a desinfecção, mais ou menos entre 2 e 4 semanas. Contudo, pode ser necessário um tempo de tratamento adicional, caso os sinais e sintomas de infecção persistam (Bezgin & Sönmez, 2015; Geisler, 2012).

No fundo, os *scaffolds* são biomateriais sólidos porosos tridimensionais. Fornecem uma posição espacial correta para a localização das células, promovem a interação entre células e biomateriais, permitem o transporte de nutrientes, gases e fatores reguladores que permitem a sobrevivência e diferenciação das células. Promovem também o mínimo de inflamação ou toxicidade (Kim, Mehrazarin, & Kang, 2012).

É necessário que os *scaffolds* tenham um grau de porosidade adequado para a implantação e difusão de células na sua estrutura. Devem permitir o transporte de oxigênio, nutrientes e resíduos, devem ser absorvidos pelo organismo sem precisar de intervenção cirúrgica (o tempo da sua degradação tem de coincidir com o tempo de

formação do tecido). Devem também ser biocompatíveis e ter força física e mecânica adequada (Gathani & Raghavendra, 2016).

Os possíveis *scaffolds* a utilizar na técnica de revascularização podem consistir em plasma rico em plaquetas, fibrina rica em plaquetas e por fim, o coágulo em si (Gathani & Raghavendra, 2016). Estes são os mais utilizados na literatura, e têm a vantagem de ser biológicos. Enquanto que os restantes (constituídos por polímeros e biocerâmica) são artificiais e sintéticos (Gathani & Raghavendra, 2016).

Para iniciar a formação do coágulo, é necessária a introdução de uma lima K pré-curvada, estéril, que passe em 2 mm o ápex dentário. Permite assim que todo o canal dentário fique preenchido de sangue até ao nível da junção amelo-cimentária (Haapasalo, Shen, Wang, & Gao, 2014).

Martin et al. recomendam a irrigação prévia, de forma abundante com 20 ml de ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). Este químico tem pouca atividade antimicrobiana, mas inibe a formação de biofilme (Bezgin & Sönmez, 2015; D. E. Martin et al., 2014).

Yamuchi et al. e Galler et al. também relataram que o EDTA pode estimular a regeneração da dentina e da polpa. Este estimula a ligação do tecido novo às paredes do canal, expondo assim a matriz de dentina e causando a libertação de fatores de crescimento do reservatório, presentes na mesma matriz (Martin et al., 2014).

Nos casos em que se insere a lima no interior do canal, e se sente alguma resistência, pode ser sinal de que existe tecido pulpar residual. Se assim for, pode não ser necessário penetrar no ápex do dente, pois a hemorragia pode ser provocada no ponto onde ainda existe tecido pulpar residual. O coágulo sanguíneo deve ser formado em cerca de 15 minutos (Bezgin & Sönmez, 2015; Jung, Lee, & Hargreaves, 2008).

Por vezes nem sempre é possível iniciar a hemorragia, como foi reportado em alguns casos (Cehreli, Isbitiren, Sara, & Erbas, 2011; Torabinejad & Turman, 2011).

Em casos de dentes monorradiculares, em que não é possível induzir a hemorragia, a apexificação é a técnica de eleição (Trope, 2010).

Se não se conseguir induzir hemorragia em todos os canais (dente multirradicular), o sangue pode ser fornecido a partir do canal de maior diâmetro (Cehreli, Isbitiren, Sara, & Erbas, 2011).

Devido a este problema, os investigadores procuraram outros suportes que pudessem ser construídos, independentemente da presença de hemorragia (Bezgin & Sönmez, 2015; Geisler, 2012). Suportes esses como por exemplo matrizes autólogas de fibrina, plasma rico em plaquetas (PRP) e fibrina rica em plaquetas (PRF) (Torabinejad & Turman, 2011).

Portanto, a hemorragia e a consequente formação do coágulo, são os passos iniciais para a posterior cicatrização das feridas teciduais. Este tecido é essencial para a regeneração do dente necrótico. Vários estudos reportaram sucesso radiográfico na utilização do coágulo sanguíneo (Banchs & Trope, 2004; Bose, Nummikoski, & Hargreaves, 2009; Iwaya, Ikawa, & Kubota, 2001).

O plasma rico em plaquetas é um concentrado de plasma autólogo. Tem concentrações plaquetárias altas, e consequentemente maior quantidade de fatores de crescimento (Torabinejad & Turman, 2011).

A fibrina rica em plaquetas é um concentrado de plaquetas, uma malha de fibrina autóloga não trombonizada, e serve como reservatório para a libertação contínua e demorada de fatores de crescimento presentes. Trata-se de sangue centrifugado não adulterado que por sua vez, alcança a polimerização facilmente (Bezgin & Sönmez, 2015).

A técnica de tratamento com estes elementos mostrou ser um enorme sucesso clínica e radiograficamente. Este sucesso deu-se aos fatores de crescimento presentes, que auxiliaram na proliferação das células estaminais, na cicatrização e na criação de novos tecidos (Bezgin & Sönmez, 2015; Torabinejad & Turman, 2011). Contudo, Martin et al. mostraram que não existe evidência científica na formação de tecido equivalente ao da polpa com células equivalentes a odontoblastos, mesmo quando as matrizes de fibrina são utilizadas no tratamento. Posto isto, conclui-se que dada a dificuldade e o custo da utilização e preparação destas matrizes, exceto nos casos em que a hemorragia não pode ser induzida, não é recomendada a sua utilização (Bezgin & Sönmez, 2015; Torabinejad & Turman, 2011).

Segundo a bibliografia, não é encontrada diferença significativa na adição de fatores de crescimento ao coágulo sanguíneo. Estes resultados indicam que os procedimentos de regeneração pulpar, incluindo ou não matrizes artificiais, não alcançam ainda a regeneração total e ideal da polpa (Bezgin & Sönmez, 2015).

3.4.1.5 - Selagem coronal

Em relação ainda ao *scaffold* criado, depois de criada uma ligação até à junção amelo coronária, é necessário que haja uma selagem da zona para evitar contaminação bacteriana (Banchs & Trope, 2004). Atualmente, um dos materiais de eleição para estes procedimentos regenerativos é o MTA (Bezgin & Sönmez, 2015; Parirokh & Torabinejad, 2010).

O MTA é uma biocerâmica com a capacidade de se estabelecer mesmo em contacto com hemorragia, com elevada resistência à infiltração bacteriana. Também pode ser colocada uma matriz de colagénio no orifício da entrada, para evitar a extensão do material. (Bezgin & Sönmez, 2015; Petrino, Boda, Shambarger, Bowles, & McClanahan, 2010).

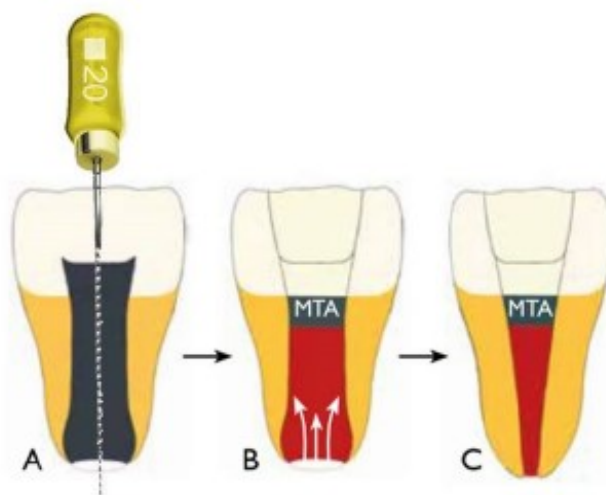


Figura 2 – Esquema representativo da técnica de revascularização.

Fonte: Hargreaves, K, & Berman, L. (2016). Cohen's Pathways of the Pulp (11th ed.). Elsevier Inc.

A, Dente imaturo com polpa necrótica; B, Indução de hemorragia no canal desinfetado e selamento com MTA; C, Representação de sucesso clínico com maturação da raiz e regeneração do tecido pulpar.

Na figura 2 está presente um esquema representativo da utilização de MTA para a selagem coronal. Para evitar problemas de descoloração foi desenvolvido um MTA de cor branca, mas não existe alteração em comparação com o MTA de cor cinza. Ambos provocam descoloração (Felman & Parashos, 2013). No entanto, já existem nos dias de hoje, outras opções de cimentos endodônticos que se podem utilizar como o BioAggregate™ e o Biodentine™, que não são conhecidos por provocar descoloração.

Para além do Biodentine™, para casos em que a estética é um aspeto crucial, o ionómero de vidro aplicado juntamente com uma matriz de colagénio, representa uma excelente alternativa aos cimentos tri-minerais. Assim, o material para a selagem coronária, pode ser escolhido em concordância com a perspetiva estética (Biodentine™, ionómero de vidro). No entanto, para dentes posteriores onde a estética não é o fator mais importante, o MTA é ainda a primeira escolha (Bezgin & Sönmez, 2015).

Num estudo *in vitro*, feito com o objetivo de comparar o efeito de descoloração dos cimentos de silicato tricálcico, utilizaram quarenta dentes bovinos na tentativa de descobrir qual o cimento que provocava menor descoloração dentária. Os dentes foram divididos em quatro grupos. No primeiro grupo foi utilizado BioAggregate™, no segundo grupo utilizaram Biodentine™, no terceiro grupo, por sua vez, o agregado de trióxido mineral, e no quarto grupo colocaram apenas sangue. A cor foi avaliada antes da colocação dos materiais, após a colocação dos materiais, na vigésima quarta hora, na primeira semana, no primeiro mês, no terceiro mês e por fim no primeiro ano. Todos os grupos demonstraram sofrer uma crescente descoloração ao longo do primeiro ano. O grupo apenas com sangue foi o que mostrou maiores alterações na mudança de cor. De seguida foi o BioAggregate™, depois o MTA e por fim o Biodentine™ (Yoldaş, Bani, Atabek, & Bodur, 2016).

Desta forma, os resultados do estudo, demonstram que o cimento Biodentine™ é a escolha mais acertada no que diz respeito à alteração da cor dentária, pois apresenta o menor potencial de descoloração entre os materiais testados (Yoldaş, Bani, Atabek, & Bodur, 2016).

3.4.2 - Protocolos

Os vários protocolos utilizados na revascularização pulpar têm mostrado, na sua maioria, desfechos clínicos bem-sucedidos, mas atualmente não existe apenas um único protocolo recomendado. Contudo apresentam algumas características em comum, tais como:

1. Ser um paciente jovem;
2. Apresentar um dente com polpa necrótica e ápice imaturo;
3. Sem instrumentação das paredes dentinárias ou mínima instrumentação;
4. Deposição de um medicamento no interior dos canais radiculares;
5. Desenvolvimento de um coágulo sanguíneo ou de uma estrutura proteica no canal;
6. Uma selagem coronária eficaz.

(American Association of Endodontists, 2013; Hargreaves, Giesler, Henry, & Wang, 2008).

A regeneração pulpar envolve um procedimento que passa por duas ou várias etapas. Para iniciar o processo de tratamento é ainda necessário ter a certeza de que o paciente não tem alergia a nenhuma da medicação dada.

Antes de se iniciar o tratamento endodôntico regenerativo, é muito importante que os pacientes ou os seus encarregados de educação, saibam que vão ser necessárias duas ou mais consultas, e que o seguimento destes casos é imperativo. A avaliação de posteriores sinais clínicos e sintomas é essencial, como edema dos tecidos moles, algia ou aumento da radiotransparência. Todos estes fatores indicam que existe uma falha no tratamento e que uma barreira apical com MTA é o caminho mais recomendado nesta situação (American Association of Endodontists, 2013).

Na primeira consulta é importante ter um acesso adequado ao canal radicular para se poder proceder à sua desinfecção. Depois da confirmação da ausência de sinais que implicassem uma nova desinfecção, é possível prosseguir com o tratamento.

Na segunda consulta, é possível estimular o sangramento que por sua vez vai ajudar a libertar fatores de crescimento da dentina, células estaminais e posteriormente criar um suporte (coágulo sanguíneo ou plasma rico em plaquetas). No fim, é necessário realizar um selamento coronal. Ao utilizar anestesia local sem vasoconstritor, esta vai facilitar a estimulação da hemorragia na zona apical. A dentisteria definitiva vai prevenir uma recidiva da infecção bacteriana (American Association of Endodontists, 2013).

Duas técnicas de revascularização da polpa são encontradas na literatura: uma primeira utilizando hidróxido de cálcio, e uma segunda utilizando uma pasta com antibiótico triplo para desinfecção dos canais. É ainda de recordar que podem ser utilizadas matrizes como o próprio coágulo sanguíneo, matrizes de ácido hialurónico e matrizes de quitosano.

Revascularização da polpa com hidróxido de cálcio. Primeira consulta:

1. Anestesia local;
2. Isolamento absoluto do dente em questão;
3. Abertura do dente, expondo o canal radicular;
4. Irrigação do canal radicular com 10 ml de hipoclorito de sódio a 2,5% (a concentração do hipoclorito pode variar e não é realizada nenhuma instrumentação mecânica no interior do canal). Nesta fase é necessário utilizar um sistema de irrigação que diminua a possibilidade de extrusão do NaOCl, como uma agulha de extremidade fechada);
5. Preparação da pasta com hidróxido de cálcio (é necessário misturar com água esterilizada numa concentração de 3:1);
6. Inserção da medicação em pasta no interior do canal e na parte coronária (no terço ou até metade);
7. Encerramento do acesso com uma restauração provisória como ionómero de vidro.

(Namour & Theys, 2014).

Após duas ou três semanas da primeira intervenção, é necessário avaliar o estado do dente, e caso este se encontre sem sintomatologia e sem a presença de fistula ou lesão periapical, é possível avançar para o segundo passo:

1. Dar anestesia local sem vasoconstritor (para não inibir a hemorragia apical);
2. Isolamento absoluto do respectivo dente;
3. Abertura do dente para ter acesso ao canal, removendo a restauração provisória;
4. Remoção da pasta de hidróxido de cálcio;
5. Irrigação com hipoclorito de sódio semelhante à da primeira consulta;
6. Lavagem do canal radicular com água esterilizada;
7. Secagem do canal radicular com cones de papel;
8. Causar hemorragia na zona apical com uma lima K-15. Por norma demora 15 minutos a obter um coágulo de sangue. Se esse canal não apresentar hemorragia, é possível transmitir sangue de um canal para o outro, sendo que este deve estar de 2 a 3 mm abaixo da junção amelo-cimentária;
9. Preparação de MTA para colocação na zona do coágulo de forma a criar uma selagem hermética nessa zona;
10. Colocar uma bola de algodão húmida no preenchimento do MTA;
11. Fechar a cavidade com uma restauração provisória.

(Namour & Theys, 2014).

O segundo passo ocorre duas ou três semanas após o primeiro, apenas se o dente estiver assintomático e se houver redução visual da lesão apical (Namour & Theys, 2014).

Na revascularização pulpar, após três meses de pós-operatório, o dente encontra-se normalmente assintomático, e cerca de nove meses após o raio-X mostra uma espessura crescente das paredes dentinárias e um encerramento apical. O desenvolvimento da raiz e o encerramento apical podem ser visíveis após três meses. Com base nestes dois

protocolos distintos de revascularização, é possível concluir que ambos têm sucesso. A procura continua para definir o protocolo mais correto e adaptado a cada situação (Namour & Theys, 2014).

Para revascularização da polpa com pasta de antibiótico triplo (PAT), dá-se o seguinte protocolo:

1. Anestesia local;
2. Isolamento absoluto do dente em questão;
3. Desinfecção do dente com iso-Betadine® a 10%, antes da abertura do canal radicular (opcional);
4. Abertura da câmara radicular (pulpotomia);
5. Irrigação do canal do canal com 20 ml de hipoclorito de sódio (1.25%-5.25%), depois com soro fisiológico e finalmente com 2% de clorexidina;
6. Não é feita instrumentação mecânica no canal;
7. Secagem do canal radicular com cones de papel;
8. Inserção da pasta de antibiótico triplo no interior do canal (a mistura é feita com os três antibióticos em proporções idênticas: metronidazol, ciprofloxacina e minociclina ligados a soro. A minociclina pode ser substituída pelo cefaclor para evitar a coloração);
9. Colocação de uma bola de algodão na entrada do canal;
10. Encerramento da cavidade com restauração provisória.

(Namour & Theys, 2014).

Depois de duas a três semanas, se o dente não apresentar qualquer sintomatologia de infecção ou a presença de fístula, pode avançar-se para a segunda fase do tratamento:

1. Anestesia local sem vasoconstritor (para não inibir a hemorragia);
2. Isolamento absoluto do dente em questão;

3. Desinfecção do dente com 10% iso-Betadine® antes da abertura do canal (opcional);
4. Abertura do dente para ter acesso ao canal radicular;
5. Remoção da pasta de antibiótico triplo utilizando irrigação com hipoclorito de sódio (1.25%-5.25%) depois com soro fisiológico, e por fim clorexidina a 2%;
6. Estimular hemorragia apical com lima K-15;
7. O sangue deve ser deixado no limite da junção amelo-cimentária;
8. Preparação do MTA para colocação no interior do coágulo, de forma a formar uma selagem hermética;
9. Colocar uma bola de algodão no preenchimento feito por MTA;
10. Restauração provisória para fechar a cavidade.

(Namour & Theys, 2014).

Também está presente na literatura, uma proposta de protocolo utilizando PRF, contando com os seguintes passos:

1. Anestesia local;
2. Isolamento absoluto do dente em questão;
3. Desinfecção do dente com 10% de iso-Betadine® antes de o abrir;
4. Proceder à abertura até expor o canal radicular;
5. Aplicação de Biodentine™ nos túbulos de dentina da câmara pulpar (é importante para selar os túbulos para posterior medicação);
6. Desinfecção do canal radicular com EDTA a 17%, seguido de hipoclorito de sódio aquecido a 37%;
7. Secagem dos canais com cones de papel;

8. Inserção da pasta de antibiótico triplo (mistura em proporção equivalente de metronidazol, ciprofloxacina, minociclina) com um lentulo na concentração de 0.39 µg/mL;

9. Colocar uma bola de algodão na entrada do canal;

10. Fechar a cavidade com restauração provisória;

(Namour & Theys, 2014).

Passado duas semanas, se o dente não apresentar sintomas de infecção nem a presença de fístula, é possível continuar com o tratamento:

1. Anestesia local sem vasoconstritor;

2. Isolamento absoluto do dente;

3. Desinfecção do dente com 10% de iso-Betadine® antes de abrir o dente;

4. Abertura do dente até ter acesso ao canal radicular;

5. Remoção do antibiótico triplo utilizando hipoclorito de sódio a 2,5% e posteriormente soro fisiológico;

6. Indução da hemorragia apical. A hemorragia deve ficar ao nível da JAC;

7. Após o canal ficar preenchido com sangue, o PRF, previamente preparado, pode ser adicionado;

8. Passado doze minutos, procede-se à aplicação de Biodentine™ no coágulo formado à volta do PRF, no sentido de fechar o canal dentário;

9. Preenchimento hermético após Biodentine™ ter ganho presa.

(Namour & Theys, 2014).

Para se estimular a formação de uma barreira a nível apical pode ser utilizado plasma rico em plaquetas PRP. Este plasma contém importantes fatores de crescimento, estimula a diferenciação celular, induz a criação de novo colagénio e promove a regeneração tecidual (Bezgin & Sönmez, 2015).

Para se formar o plasma rico em plaquetas, é necessário retirar uma amostra de sangue do doente, realizar a sua centrifugação na presença de um anticoagulante e depois remover os eritrócitos adicionando-lhes cálcio e trombina para a coagulação da mistura (Palma, 2013).

Na técnica com o coágulo sanguíneo, ou nesta última técnica com PRP, é necessário a colocação de MTA na região cervical do canal (2 a 3 mm abaixo da JAC) (Torabinejad & Turman, 2011).

3.5 - Técnica convencional – Apexificação

Como já foi referido, o tratamento convencional de dentes imaturos que perderam a vitalidade pulpar passa pela técnica de apexificação. Esta promove a formação de uma barreira apical, de modo a que os materiais de obturação possam ficar confinados ao canal radicular, sem que ocorra sobreobturação. Contudo, esta técnica não permite a continuação da formação radicular (Lin et al., 2016; Rafter, 2005).

É necessário também ter muita cautela durante a instrumentação de dentes imaturos, pois a dentina apresenta-se muito fina e pouco calcificada. Por este motivo, é mais suscetível a fraturas laterais da raiz pois a sua resistência ao atrito é baixa (Palma, 2013).

A apexificação requer um ambiente adequado no interior do canal radicular e tecido periapical, para que seja possível formar uma barreira calcificada através do ápex aberto. Apesar de o hidróxido de cálcio até hoje ter sido o material de eleição, também apresenta algumas desvantagens na sua utilização, como alguma imprevisibilidade no desenvolvimento da barreira apical e na durabilidade do tratamento, que na maior parte das vezes é longo e inclui muitas visitas pela parte do paciente (Bezgin & Sönmez, 2015; Cvek, 1992).

Em alternativa ao procedimento convencional pode também ser utilizada uma barreira apical de MTA, evitando assim a troca periódica de medicação nos canais radiculares (Palma, 2013).

3.5.1 - Apexificação com Hidróxido de cálcio

O Hidróxido de cálcio é um material muito utilizado nesta técnica, pois tem a capacidade de eliminar a infecção bacteriana e estimular um posterior encerramento do ápex. Para além disso, apresenta grande biocompatibilidade em relação aos tecidos dentários, não provocando reações adversas periapicais. Também pode ser misturado com várias substâncias diferentes, como soluções anestésicas, soro, entre outras (Lin et al., 2016).

O HC é um material alcalino que pode atuar como tampão nas reações inflamatórias ácidas. O seu potencial antimicrobiano deve-se à libertação de iões hidroxilo, reativos e oxidantes, que induzem danos a nível da membrana celular da bactéria, e ao nível do seu DNA (Rafter, 2005).

A técnica consiste na aplicação sucessiva de medicação no interior do canal, não só para continuar a desinfeção feita pelas soluções irrigantes (NaOCL, CHX, EDTA), mas também para induzir a barreira apical calcificada. Quando é colocado o hidróxido de cálcio, é feita uma restauração provisória, para evitar uma recidiva de infecção. Contudo, são necessárias reaplicações da medicação (Rafter, 2005). Segundo a bibliografia não existe nenhum benefício em substituir a pasta de HC em intervalos inferiores a três meses (Chosack, Sela, & Cleaton-Jones, 1997).

O tempo médio necessário para completar o tratamento varia entre 5 a 20 meses (Rafter, 2005).

No entanto, apesar de ser uma técnica vastamente aplicada e eficaz, também tem algumas desvantagens. É requerido muito tempo ao paciente ou aos seus progenitores. Frequentemente o tratamento alonga-se por mais de um ano (Lin et al., 2016). Existe também alguma imprevisibilidade no que toca à barreira apical formada (Rafter, 2005).

E por último, a contínua aplicação de HC mostrou ter efeitos negativos na dentina, provocando uma fragilização radicular e um aumento da suscetibilidade à fratura (Bezgin & Sönmez, 2015).

3.5.2 - Apexificação com MTA

Procurou-se uma alternativa para o procedimento tradicional baseado em hidróxido de cálcio. Foi introduzida uma barreira artificial de agregado de trióxido mineral (MTA), que por sua vez reduz significativamente o tempo de tratamento e oferece uma cicatrização favorável do tecido perirradicular. No entanto, os resultados da apexificação feita com hidróxido de cálcio não diferem muito dos resultados da apexificação realizada com a barreira de MTA (Bezgin & Sönmez, 2015).

Este material apresenta uma elevada biocompatibilidade, atividade antimicrobiana devido ao seu elevado pH (12,5) e radiopacidade superior à da dentina (Rafter, 2005).

A grande diferença neste tipo de técnica, é a obtenção de um *stop* apical artificial imediato. Não exige tanto tempo ao doente, e permite a compactação do material obturador. Apesar de ambas as técnicas serem alternativas eficazes, o procedimento com MTA demonstra ser mais rápido, sendo este fator muito benéfico, pois a principal causa de fracasso com HC, consiste no tempo prolongado, que influencia negativamente os pacientes (Lin et al., 2016). O tempo em que a restauração provisória permanece em boca também é importante, pois a falha da restauração pode levar à reinfeção do sistema radicular e resultar no prolongamento ou até mesmo na falha da apexificação (Hargreaves & Berman, 2016).

Outro benefício ainda destacável, consiste na possibilidade de colocar uma restauração ou um núcleo aderido previamente, de forma a reduzir o risco de fratura (Steinig, Regan, & Gutmann, 2003).

Este material também apresenta desvantagens. Tem um custo elevado, apresenta alguma dificuldade em ser manuseado, necessita de algum tempo até tomar presa e por fim, também altera a cor do dente. Principalmente o MTA cinzento (Parirokh & Torabinejad, 2010).

No entanto, nenhum destes tratamentos estimula o desenvolvimento das raízes, e os dentes mantêm-se vulneráveis e expostos a fraturas radiculares cervicais. Por outro lado, a revascularização tem a capacidade de desenvolver a raiz do dente, e assim

devolver ao dente parte da sua conformação e conferir um melhor prognóstico a longo prazo, pois a regeneração do complexo dentino-pulpar irá permitir que exista tecido vital capaz de desenvolver uma resposta imune, e sinalizar danos teciduais através de neurónios sensoriais (Palma, 2013).

3.6 - Vantagens e desvantagens da revascularização pulpar em comparação com a Apexificação

A taxa de sucesso do tratamento de dentes imaturos necróticos, pela técnica de apexificação com hidróxido de cálcio é de cerca de 95%, mas também existem alguns problemas associados. Complicações como o tempo requerido para a formação da barreira calcificada, que demora entre 3 a 24 meses, variando de dente para dente (American Association of Endodontists, 2013).

São também necessárias várias consultas para voltar a colocar o hidróxido de cálcio (Bezgin & Sönmez, 2015; Huang, 2009; Rafter, 2005).

No entanto, a desvantagem mais importante da utilização da apexificação é a redução da resistência radicular devido ao uso de hidróxido de cálcio (Lee et al., 2015). Aumenta assim a possibilidade de fratura radicular, que já se encontra aumentada por não existir um completo desenvolvimento radicular. O MTA foi proposto como um material alternativo para criar uma barreira apical que impede a extrusão de materiais de obturação. Em comparação com o hidróxido de cálcio, o MTA é usado no procedimento de apexificação de um ou dois passos e portanto, um número menor de consultas é necessário. Apesar dessa vantagem, a apexificação com o MTA não fortalece a raiz nem induz o desenvolvimento radicular (American Association of Endodontists, 2013; Lee et al., 2015).

A técnica de revascularização pulpar, por sua vez, tem vantagens que nenhum outro tratamento atual pode fornecer.

Apresenta ser uma técnica simples e acessível, adequada aos instrumentos e medicamentos atualmente disponíveis (Bezgin & Sönmez, 2015; Murray, Garcia-Godoy, & Hargreaves, 2007).

Em vez de substituição tecidual com substitutos artificiais, esta deve ser realizada na ausência de bactérias e na presença de uma estrutura tridimensional adequada, incluindo células estaminais no interior do canal radicular (Banchs & Trope, 2004; Iwaya, Ikawa, & Kubota, 2001). Promove desenvolvimento radicular, encerramento apical, reforço das paredes dentinárias e reduz o risco de fratura do dente (Lee et al., 2015).

Como limitação desta abordagem, temos a incerteza da fonte do tecido regenerativo. Ainda não é possível ter certezas da origem histológica do novo conteúdo no interior do canal (Bezgin & Sönmez, 2015; G. Martin, Ricucci, Gibbs, & Lin, 2013).

Um estudo retrospectivo de Jeruphuan et al. mostrou que o tratamento endodôntico regenerativo mostrava uma maior taxa de sucesso no desenvolvimento radicular, quando comparado com a apexificação com MTA e Hidróxido de cálcio. Para além do mais, a utilização da técnica de revascularização pulpar tem sido defendida, bem como a indicada para tratamento de dentes imaturos e diferentes, como o dens invaginatus, no qual é mais complicado realizar tratamento endodôntico convencional ou apexificação devido à anatomia complexa que apresenta (Jeeruphan et al., 2012).

É importante referir que o método de revascularização pressupõe a formação de um coágulo de sangue que contém células capazes de formar um novo tecido. Contudo, a concentração e composição das células presas no coágulo de fibrina é imprevisível. Esta limitação pode ser melhorada, utilizando um concentrado de plaquetas, ou plasma rico em plaquetas (Pannu, 2017).

Outra desvantagem que apresenta é a descoloração coronária, que ocorre pela influência da minociclina e do MTA branco e cinzento (Wigler et al., 2013). No entanto, é contornável com a substituição da minociclina ou utilização do HC. Podem também ser aplicados outros materiais para selamento pulpar como o ionómero de vidro modificado por resina, ou um sistema adesivo para selamento da dentina (Reynolds, Johnson, & Cohenca, 2009).

Além disso, mesmo que a revascularização não ocorra, o seu conservadorismo permite sempre que outra abordagem de tratamento, mais tradicional seja realizada, como a apexificação e posterior obturação do canal.

3.7 - Preservação

3.7.1 - Evidência clínica de cicatrização periapical

Neste parâmetro é muito importante observar a ausência de sensibilidade à palpação, à percussão e edema evidente (Banchs & Trope, 2004; Bezgin & Sönmez, 2015; Torabinejad & Turman, 2011).

3.7.2 - Evidências radiográficas da cicatrização periapical e desenvolvimento radicular

Neste parâmetro de avaliação é importante ter em conta a cicatrização óssea completa da lesão periapical, o aumento da espessura da parede radicular, o aumento do comprimento da superfície radicular e por fim, a formação de ápex radiográfico (Bezgin & Sönmez, 2015).

Infelizmente nem sempre é possível alcançar todos estes resultados, nem são essenciais para classificar um tratamento como sendo de sucesso (American Association of Endodontists, 2013). Em alguns casos ocorre um encerramento do ápex sem o aumento do comprimento da superfície radicular ou da espessura da parede radicular. Noutros casos nem é possível atingir o encerramento do ápex (Bezgin & Sönmez, 2015; Petrino, Boda, Shambarger, Bowles, & McClanahan, 2010).

É possível que exista uma relação entre o tempo em que o dente se encontra com infecção periapical e o prognóstico do tratamento, isto porque uma infecção de longa duração pode acabar por extinguir as células com capacidade de regeneração da polpa. Para fundamentar esta teoria Duarte et al, avaliaram 18 primeiros molares superiores de rato, com infecção endodôntica, em que o primeiro grupo tinha sido exposto há 30 dias, o segundo há 60 dias, e o terceiro grupo há 90 dias.

A avaliação histológica realizou-se em 5 locais diferentes, sendo estes o ápex radicular, a papila apical, o terço do canal radicular cervical, médio e apical. Foi assim possível observar, que existia tecido pulpar vital no terço apical até 60 dias, e que existia papila apical vital até 90 dias após o dente estar com infecção (Tobias Duarte et al., 2014).

Após 90 dias, foi possível observar tecido pulpar necrótico no interior do canal, e tecido vital na papila apical em cerca de 67% dos casos. É possível concluir então que o tempo de evolução da infecção do dente é um fator importante para que o tratamento de revascularização tenha sucesso (Tobias Duarte et al., 2014).

Se não existirem sinais de melhoria, de evidência de cicatrização periapical ou de desenvolvimento radicular, e se estiverem presentes sintomas de efeitos adversos, pode ser utilizada a técnica de apexificação.

3.7.3 - Resposta positiva ao teste de vitalidade da polpa

Neste parâmetro é possível que existam diferentes respostas. Se a resposta for positiva ao frio e ao teste elétrico, indica que após o tratamento foi restaurada a vascularização do dente, independentemente do tipo de tecido que foi criado no interior do canal radicular. Este é um grande sinal de sucesso (Bezgin & Sönmez, 2015; Geisler, 2012). Alguns autores relataram respostas positivas nestes casos (Torabinejad & Turman, 2011).

Se a resposta for negativa ao frio, esta pode ser devida a uma camada de maior espessura de MTA (3 a 4 mm), ou de outro cimento e materiais restauradores como resina composta. Estes materiais podem alterar as respostas sensitivas do dente (Bezgin & Sönmez, 2015).

A literatura mostra-nos que a fluxometria por laser-doppler, é tida em conta como um meio mais rápido de obter uma resposta vital, em comparação com o estímulo térmico convencional. Esta pode ser recomendada para tratamentos de revascularização (Bezgin & Sönmez, 2015; Fouad & Nosrat, 2013).

3.7.4 - Evidências histológicas de regeneração dentinária e pulpar

A literatura demonstra-nos que é possível observar cicatrização óssea e desenvolvimento radicular, crescimento do ligamento periodontal, cimento e osso no espaço do canal radicular após o tratamento de revascularização. Também foi relatado o estreitamento dos canais radiculares e do ápex, causado pela reposição de cimento sem dentina. Mas não a regeneração do complexo dentino-pulpar do dente (G. Martin, Ricucci, Gibbs, & Lin, 2013; Bezgin & Sönmez, 2015).

Avaliando histologicamente, o tecido formado nos canais radiculares, inclui tecido mineralizado semelhante ao tecido cementoide/osteóide e tecido conjuntivo fibroso não inflamado, independentemente de o tratamento ter incluindo PRP ou não (Bezgin & Sönmez, 2015).

Posto isto, ainda não foi possível observar tecido equivalente ao da polpa original, caracterizado por células odontoblásticas, equivalente à dentina (Andreasen, Farik, & Munksgaard, 2002).

São necessários mais estudos para descobrir a origem certa destes tecidos e para conhecer o seu comportamento ao longo do tempo (Bezgin & Sönmez, 2015).

4 - Conclusão

A revascularização pulpar é um novo método de tratamento para dentes imaturos necróticos. Tem como objetivo restabelecer a vitalidade do dente e fornecer as condições necessárias para proporcionar o crescimento e desenvolvimento da raiz, ainda não completa.

Foi possível concluir com este trabalho, que existem várias etapas a cumprir nos diferentes protocolos, todas essenciais para obter um bom resultado. O médico dentista deve ser dotado de competências, tanto de diagnóstico, como de intervenção, e monitorização de resultados.

É uma técnica relativamente simples, acessível com poucos custos e traz inúmeros benefícios, que nenhuma outra técnica até hoje pode trazer. Contudo, a indeterminação da origem histológica dos novos tecidos formados, e a imprevisibilidade dos resultados, mostra-nos que é necessário continuar estudos clínicos e investigação, para estabelecer protocolos padronizados e critérios de sucesso objetivos.

Apesar da falta de previsibilidade, não há dúvida de que, representa um avanço na endodontia regenerativa, constituindo um meio de tratamento alternativo às terapias normalmente aplicadas.

A capacidade de reprogramar células e diferenciá-las de modo a que possam ganhar uma nova identidade e função, destacou a natureza altamente plástica e maleável do genoma. A compreensão dos mecanismos moleculares precisos que levam a essa transformação, promete ter elevados benefícios na engenharia tecidual.

No entanto, esta deve ser ponderada e bem avaliada como opção de tratamento, e não como um caminho obrigatório a seguir. Uma seleção minuciosa e criteriosa dos casos para futuro tratamento, assume uma importância fulcral para o sucesso do tratamento.

Por último, a revascularização pulpar assume um papel muito importante em áreas da Medicina Dentária, abrindo portas para o mundo futurista da engenharia genética e regeneração tecidual.

5 – Bibliografia

- Adriaens, P. a, Edwards, C. a, De Boever, J. a, & Loesche, W. J. (1988). Ultrastructural observations on bacterial invasion in cementum and radicular dentin of periodontally diseased human teeth. *The Journal of Periodontology*. <https://doi.org/10.1902/jop.1988.59.8.493>
- Alberts, B. (2008). Molecular Biology of the Cell. *The Yale Journal of Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1024/0301-1526.32.1.54>
- Andreasen, J. O., Farik, B., & Munksgaard, E. C. (2002). Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dental Traumatology*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2002.00097.x>
- Aranha, A. M. F., Zhang, Z., Neiva, K. G., Costa, C. A. S., Hebling, J., & Nör, J. E. (2010). Hypoxia enhances the angiogenic potential of human dental pulp cells. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.05.013>
- Banchs, F., & Trope, M. (2004). Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: New treatment protocol? *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1097/00004770-200404000-00003>
- Basrani, B. R., Manek, S., Sodhi, R. N. S., Fillery, E., & Manzur, A. (2007). Interaction between Sodium Hypochlorite and Chlorhexidine Gluconate. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.04.001>
- Bezgin, T., & Sönmez, H. (2015). Review of current concepts of revascularization/revitalization. *Dental Traumatology*, 31(4), 267–273. <https://doi.org/10.1111/edt.12177>
- Bose, R., Nummikoski, P., & Hargreaves, K. (2009). A Retrospective Evaluation of Radiographic Outcomes in Immature Teeth With Necrotic Root Canal Systems Treated With Regenerative Endodontic Procedures. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.06.021>
- Cai, W.-F., Li, S., Xie, L., Yao, L.-L., Wang, C.-H., & Ren, Z.-H. (2017). [Influence of age on the effectiveness of revascularization in immature permanent teeth].

Shanghai Kou Qiang Yi Xue = Shanghai Journal of Stomatology.

- Casagrande, L., Cordeiro, M. M., Nör, S. A., & Nör, J. E. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*. <https://doi.org/10.1007/s10266-010-0154-z>
- Cehreli, Z. C., Isbitiren, B., Sara, S., & Erbas, G. (2011). Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: A case series. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.033>
- Chosack, A., Sela, J., & Cleaton-Jones, P. (1997). A histological and quantitative histomorphometric study of apexification of nonvital permanent incisors of vervet monkeys after repeated root filling with a calcium hydroxide paste. *Dental Traumatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1997.tb00042.x>
- Chueh, L. H., Ho, Y. C., Kuo, T. C., Lai, W. H., Chen, Y. H. M., & Chiang, C. P. (2009). Regenerative Endodontic Treatment for Necrotic Immature Permanent Teeth. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.019>
- Chuensombat, S., Khemaleelakul, S., Chattipakorn, S., & Srisuwan, T. (2013). Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: An in vitro study. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.041>
- Cohenca, N., Heilborn, C., Johnson, J. D., Flores, D. S. H., Ito, I. Y., & da Silva, L. A. B. (2010). Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.08.029>
- Cooper, P. R., Takahashi, Y., Graham, L. W., Simon, S., Imazato, S., & Smith, A. J. (2010). Inflammation-regeneration interplay in the dentine-pulp complex. *Journal of Dentistry*. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2010.05.016>
- Cunningham, W. T., & Balekjian, A. Y. (1980). Effect of temperature on collagen-dissolving ability of sodium hypochlorite endodontic irrigant. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(80\)90313-8](https://doi.org/10.1016/0030-4220(80)90313-8)
- Cvek, M. (1992). Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha. A retrospective clinical study. *Dental*

- Traumatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.1992.tb00228.x>
- Demarco, F. F., Conde, M. C., Cavalcanti, B. N., Casagrande, L., Sakai, V. T., & Nor, J. E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*. <https://doi.org/10.1590/S0103-64402011000100001>
- Endodontists, A. A. of. (2013). Colleagues Excellence. *Colleagues for Excellence*, 1–8.
- Estefan, B. S., El Batouty, K. M., Nagy, M. M., & Diogenes, A. (2016). Influence of Age and Apical Diameter on the Success of Endodontic Regeneration Procedures. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.06.020>
- Felman, D., & Parashos, P. (2013). Coronal tooth discoloration and white mineral trioxide aggregate. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.053>
- Fouad, A. F., & Nosrat, A. (2013). Pulp regeneration in previously infected root canal space. *Endodontic Topics*. <https://doi.org/10.1111/etp.12039>
- Galler, K. M. (2016). Clinical procedures for revitalization: current knowledge and considerations. *International Endodontic Journal*. <https://doi.org/10.1111/iej.12606>
- Galler, K. M., D'Souza, R. N., Federlin, M., Cavender, A. C., Hartgerink, J. D., Hecker, S., & Schmalz, G. (2011). Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.08.027>
- Garant, P. R. (2003). Oral Cells and Tissues. *Quintessence Publishing Company*. <https://doi.org/10.1111/febs.12425>
- Garcia-Godoy, F., & Murray, P. E. (2012). Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dental Traumatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2011.01044.x>
- Gathani, K., & Raghavendra, S. (2016). Scaffolds in regenerative endodontics: A review. *Dental Research Journal*. <https://doi.org/10.4103/1735-3327.192266>
- Geisler, T. M. (2012). Clinical Considerations for Regenerative Endodontic Procedures. *Dental Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.010>
- Gomez de Ferraris, M. (2009). Histologia, Embriologia E Ingenieria Tisular Bucodental. *Histología, Embriología e Ingeniería Tisular Bucodental*.
- Guo, X., & Wang, X.-F. (2009). Signaling cross-talk between TGF-beta/BMP and other

- pathways. *Cell Research*. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.302>
- Haapasalo, M., Shen, Y., Wang, Z., & Gao, Y. (2014). Irrigation in endodontics. *British Dental Journal*. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2014.204>
- Ham, J. W., Patterson, S. S., & Mitchell, D. F. (1972). Induced apical closure of immature pulpless teeth in monkeys. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(72\)90474-4](https://doi.org/10.1016/0030-4220(72)90474-4)
- Hargreaves, K., & Berman, L. (2016). *Cohen's Pathways of the Pulp* (11th ed.). Elsevier Inc, pp 2-37; 532-566; 630-640.
- Hargreaves, K. M., Giesler, T., Henry, M., & Wang, Y. (2008). Regeneration Potential of the Young Permanent Tooth: What Does the Future Hold? *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.02.032>
- Huang, G. T.-J., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S., & Shi, S. (2010). Stem/Progenitor Cell-Mediated *De Novo* Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an *In Vivo* Model. *Tissue Engineering Part A*. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0518>
- Huang, G. T. J. (2009). Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: Current progress. *Regenerative Medicine*. <https://doi.org/10.2217/rme.09.45>
- Iwaya, S. I., Ikawa, M., & Kubota, M. (2001). Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dental Traumatology*. <https://doi.org/10.1034/j.1600-9657.2001.017004185.x>
- Jeeruphan, T., Jantararat, J., Yanpiset, K., Suwannapan, L., Khewsawai, P., & Hargreaves, K. M. (2012). Mahidol study 1: Comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: A retrospective study. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.028>
- Jung, I. Y., Lee, S. J., & Hargreaves, K. M. (2008). Biologically Based Treatment of Immature Permanent Teeth with Pulpal Necrosis: A Case Series. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.03.023>
- Kakoli, P., Nandakumar, R., Romberg, E., Arola, D., & Fouad, A. F. (2009). The Effect of Age on Bacterial Penetration of Radicular Dentin. *Journal of Endodontics*.

- <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.10.004>
- Keinan, D., & Cohen, R. E. (2013). The significance of epithelial rests of malassez in the periodontal ligament. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.01.004>
- Kim, R. H., Mehrazarin, S., & Kang, M. K. (2012). Therapeutic Potential of Mesenchymal Stem Cells for Oral and Systemic Diseases. *Dental Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.006>
- Langer, R., & Vacanti, J. P. (1993). Tissue engineering. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.8493529>
- Lee, B.-N., Moon, J.-W., Chang, H.-S., Hwang, I.-N., Oh, W.-M., & Hwang, Y.-C. (2015). A review of the regenerative endodontic treatment procedure. *Restorative Dentistry & Endodontics*. <https://doi.org/10.5395/rde.2015.40.3.179>
- Lieberman, J., & Trowbridge, H. (1986). Apical closure of nonvital permanent incisor teeth where no treatment was performed: Case report. *Journal of Endodontics*. [https://doi.org/10.1016/S0099-2399\(86\)80025-5](https://doi.org/10.1016/S0099-2399(86)80025-5)
- Lin, J.-C., Lu, J.-X., Zeng, Q., Zhao, W., Li, W.-Q., & Ling, J.-Q. (2016). Comparison of mineral trioxide aggregate and calcium hydroxide for apexification of immature permanent teeth: A systematic review and meta-analysis. *Journal of the Formosan Medical Association*. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2016.01.010>
- Magloire, H., Couble, M. L., Romeas, A., & Bleicher, F. (2004). Odontoblast primary cilia: Facts and hypotheses. *Cell Biology International*. <https://doi.org/10.1016/j.cellbi.2003.11.006>
- Mao, J. J., Kim, S. G., Zhou, J., Ye, L., Cho, S., Suzuki, T., ... Zhou, X. (2012). Regenerative Endodontics. Barriers and Strategies for Clinical Translation. *Dental Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2012.05.005>
- Martin, D. E., De Almeida, J. F. A., Henry, M. A., Khaing, Z. Z., Schmidt, C. E., Teixeira, F. B., & Diogenes, A. (2014). Concentration-dependent effect of sodium hypochlorite on stem cells of apical papilla survival and differentiation. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.07.026>
- Martin, G., Ricucci, D., Gibbs, J. L., & Lin, L. M. (2013). Histological findings of

- revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.09.015>
- McCollum, M. A., & Sharpe, P. T. (2001). Developmental genetics and early hominid craniodental evolution. *BioEssays*. <https://doi.org/10.1002/bies.1068>
- Murray, P. E., Garcia-Godoy, F., & Hargreaves, K. M. (2007). Regenerative Endodontics: A Review of Current Status and a Call for Action. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2006.09.013>
- Myers, H. I., & Flanagan, V. D. (1958). A comparison of results obtained from transplantation and replantation experiments using syrian hamster teeth. *The Anatomical Record*. <https://doi.org/10.1002/ar.1091300303>
- Nakashima, M., & Akamine, A. (2005). The application of tissue engineering to regeneration of pulp and dentin in endodontics. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1097/01.don.0000164138.49923.e5>
- Namour, M., & Theys, S. (2014). Pulp revascularization of immature permanent teeth: A review of the literature and a proposal of a new clinical protocol. *Scientific World Journal*, 2014(i). <https://doi.org/10.1155/2014/737503>
- Nanci, A. (2012). Dentin-pulp complex. In *Ten Cate's oral histology: development, structure, and function*. <https://doi.org/10.1038/sj.bdj.2012.772>
- Nikita, B. R., Fabricio, B. T., Caio, C. R. F., Anibal, D., Ruparel, N. B., Teixeira, F. B., ... Diogenes, A. (2012). Direct effect of intracanal medicaments on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.06.018>
- Nosrat, A., Seifi, A., & Asgary, S. (2011). Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: A review and report of two cases with a new biomaterial. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.01.011>
- NYGAARD-ÖSTBY, B., & HJORTDAL, O. (1971). Tissue formation in the root canal following pulp removal. *European Journal of Oral Sciences*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0722.1971.tb02019.x>
- Ogawa, T., Sato, M., Yonekawa, S., Nakagawa, C., Uno, K., Kasahara, K., ... Mikasa,

- K. (2013). Infective Endocarditis Caused by *Enterococcus faecalis* treated with Continuous Infusion of Ampicillin without Adjunctive Aminoglycosides. *Internal Medicine*. <https://doi.org/10.2169/internalmedicine.52.8425>
- Palma, P. J. R. da. (2013). Apexificação e Revascularização pulpar em dentes permanentes imaturos: estudo experimental in vivo. Retrieved from <http://estudogeral.sib.uc.pt/jspui/handle/10316/23562>
- Pannu, R. (2017). Pulp revascularisation - An evolving concept : A review, 3(4), 118–121.
- Parirokh, M., & Torabinejad, M. (2010). Mineral Trioxide Aggregate: A Comprehensive Literature Review-Part III: Clinical Applications, Drawbacks, and Mechanism of Action. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.09.009>
- Pereira, L. O., Rubini, M. R., Silva, J. R., Oliveira, D. M., Silva, I. C. R., Poças-Fonseca, M. J., & Azevedo, R. B. (2012). Comparison of stem cell properties of cells isolated from normal and inflamed dental pulps. *International Endodontic Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2012.02068.x>
- Perris, R., & Löfberg, J. (1986). Promotion of chromatophore differentiation in isolated premigratory neural crest cells by extracellular material explanted on microcarriers. *Developmental Biology*. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(86\)90168-5](https://doi.org/10.1016/0012-1606(86)90168-5)
- Petrino, J. A., Boda, K. K., Shambarger, S., Bowles, W. R., & McClanahan, S. B. (2010). Challenges in Regenerative Endodontics: A Case Series. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2009.10.006>
- Rafter, M. (2005). Apexification: A review. *Dental Traumatology*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-9657.2004.00284.x>
- Reyes, V., & Páucar, M. (2009). Tratamiento pulpar en la apexificación del diente inmaduro mediante agregado de trióxido mineral. *Odontología Sanmarquina*. <https://doi.org/10.15381/os.v12i1.2912>
- Reynolds, K., Johnson, J. D., & Cohenca, N. (2009). Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspids using a modified novel technique to eliminate potential coronal discolouration: A case report. *International Endodontic Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2591.2008.01467.x>

- Ring, K. C., Murray, P. E., Namerow, K. N., Kuttler, S., & Garcia-Godoy, F. (2008). The Comparison of the Effect of Endodontic Irrigation on Cell Adherence to Root Canal Dentin. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.09.001>
- Rosenthal, S., Spångberg, L., & Safavi, K. (2004). Chlorhexidine substantivity in root canal dentin. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2003.07.005>
- Sato, T., Hoshino, E., Uematsu, H., & Noda, T. (1993). In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs of bacteria from carious and endodontic lesions of human deciduous teeth. *Oral Microbiology and Immunology*. <https://doi.org/10.1111/j.1399-302X.1993.tb00661.x>
- Shah, N., Logani, A., Bhaskar, U., & Aggarwal, V. (2008). Efficacy of Revascularization to Induce Apexification/Apexogenesis in Infected, Nonvital, Immature Teeth: A Pilot Clinical Study. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2008.05.001>
- Soares, A. D. J., Lins, F. F., Nagata, J. Y., Gomes, B. P. F. D. A., Zaia, A. A., Ferraz, C. C. R., ... Souza-Filho, F. J. De. (2013). Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.10.005>
- Soares, A. P., Knop, L. A. H., Jesus, A. A. De, & Araújo, T. M. De. (2007). Células-tronco em odontologia. *Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial*. <https://doi.org/10.1590/S1415-54192007000100006>
- Sonoyama, W., Liu, Y., Yamaza, T., Tuan, R. S., Wang, S., Shi, S., & Huang, G. T. J. (2008). Characterization of the Apical Papilla and Its Residing Stem Cells from Human Immature Permanent Teeth: A Pilot Study. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2007.11.021>
- Srivastava, N., & Chandra, S. (1999). Effect of endodontic smear layer and various solvents on the calcium ion diffusion through radicular dentin--an in vitro study. *Journal of the Indian Society of Pedodontics and Preventive Dentistry*.
- Steinig, T. H., Regan, J. D., & Gutmann, J. I. (2003). The use and predictable placement Of mineral trioxide aggregate®I n one-visit apexification cases. *Australian Endodontic Journal*. <https://doi.org/10.1111/j.1747-4477.2003.tb00496.x>

- Suomalainen, M., & Thesleff, I. (2010). Patterns of Wnt pathway activity in the mouse incisor indicate absence of Wnt/beta-catenin signaling in the epithelial stem cells. *Developmental Dynamics : An Official Publication of the American Association of Anatomists*. <https://doi.org/10.1002/dvdy.22106>
- Tobias Duarte, P. C., Gomes-Filho, J. E., Ervolino, E., Marçal Mazza Sundefeld, M. L., Tadahirowayama, M., Lodi, C. S., ... Angelo Cintra, L. T. (2014). Histopathological condition of the remaining tissues after endodontic infection of rat immature teeth. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2013.09.015>
- Torabinejad, M., & Turman, M. (2011). Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: A case report. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.004>
- Trevino, E. G., Patwardhan, A. N., Henry, M. A., Perry, G., Dybdal-Hargreaves, N., Hargreaves, K. M., & Diogenes, A. (2011). Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2011.05.013>
- Trope, M. (2010). Treatment of the Immature Tooth with a Non-Vital Pulp and Apical Periodontitis. *Dental Clinics of North America*. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2009.12.006>
- Tziafas, D., & Kodonas, K. (2010). Differentiation Potential of Dental Papilla, Dental Pulp, and Apical Papilla Progenitor Cells. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.02.006>
- Vijayaraghavan, R., Mathian, V., Sundaram, A., Karunakaran, R., & Vinodh, S. (2012). Triple antibiotic paste in root canal therapy. *Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences*. <https://doi.org/10.4103/0975-7406.100214>
- Wang, Q., Lin, X., Lin, Z., Liu, G., & Shan, X. (2007). [Expression of vascular endothelial growth factor in dental pulp of immature and mature permanent teeth in human]. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue = Shanghai Journal of Stomatology*.
- Wigler, R., Kaufman, A. Y., Lin, S., Steinbock, N., Hazan-Molina, H., & Torneck, C. D. (2013). Revascularization: A treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2012.11.014>

- Yamauchi, N., Yamauchi, S., Nagaoka, H., Duggan, D., Zhong, S., Lee, S. M., ... Yamauchi, M. (2011). Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2010.11.010>
- Yan, X., Qin, H., Qu, C., Tuan, R. S., Shi, S., & Huang, G. T.-J. (2010). iPS Cells Reprogrammed From Human Mesenchymal-Like Stem/Progenitor Cells of Dental Tissue Origin. *Stem Cells and Development*. <https://doi.org/10.1089/scd.2009.0314>
- Yoldaş, S. E., Bani, M., Atabek, D., & Bodur, H. (2016). Comparison of the Potential Discoloration Effect of Bioaggregate, Biodentine, and White Mineral Trioxide Aggregate on Bovine Teeth: In Vitro Research. *Journal of Endodontics*. <https://doi.org/10.1016/j.joen.2016.08.020>