

**UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**



**“ESTUDIO SOBRE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN
Y MEDICACIÓN INTRACONDUCTO PARA LA
REVASCULARIZACIÓN PULPAR EN DIENTES INMADUROS Y
NECRÓTICOS DE PERROS BEAGLE”**

Tesis Doctoral

Soledad Rodríguez Benítez
Sevilla 2015

Soledad Rodríguez Benítez es autora y presenta el trabajo de tesis doctoral titulado “ESTUDIO SOBRE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN Y MEDICACIÓN INTRACONDUCTO PARA LA REVASCULARIZACIÓN PULPAR EN DIENTES INMADUROS Y NECRÓTICOS DE PERROS BEAGLE”, bajo la dirección del profesor D. Juan José Segura Egea para optar al Grado de Doctor por la Universidad de Sevilla.

Fdo.: Soledad Rodríguez Benítez



El doctor **D. Juan José Segura Egea**, Profesor Titular de Patología y Terapéutica Dental del Dpto. de Estomatología de la Universidad de Sevilla, Director de la Tesis Doctoral titulada “ESTUDIO SOBRE DIFERENTES PROTOCOLOS DE IRRIGACIÓN Y MEDICACIÓN INTRACONDUCTO PARA LA REVASCULARIZACIÓN PULPAR EN DIENTES INMADUROS Y NECRÓTICOS DE PERROS BEAGLE” de la que es autora **Soledad Rodríguez Benítez** desarrollado por el Departamento de Estomatología de Sevilla.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'J. Segura Egea', is written over a large, stylized blue 'U' that matches the university logo.

Fdo.: Juan J. Segura Egea

*Dedico esta tesis a mis padres **Antonio** y **Pepa** que siempre me apoyaron incondicionalmente en la parte moral y económica para poder llegar a ser una profesional de la Odontología.*

*A mis hermanos **Antonio** y **Javier**, por el cariño y el apoyo que siempre he recibido.*

*Por último, gracias a mi esposo **Carlos** y a mis hijos **Carlos** y **Alejandro**, por su paciencia y comprensión durante las muchas horas que les he robado.*

AGRADECIMIENTOS

*En primer lugar, quisiera que mis palabras de agradecimiento fuesen para los doctores **D. Juan José Segura Egea** y **D. Carlos Stambolsky Guelfand**, director y codirector de la tesis de doctorado, por haberme animado a realizar los estudios de doctorado y haberme orientado en todos los momentos que necesité sus consejos.*

*Quiero agradecer también al **Dr. D. Daniel Torres Lagares** y a **José Luis Gutierrez-Pérez** por su ayuda en el proceso de investigación de este trabajo.*

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	13
1.1	Patología pulpar y periapical inflamatoria.	14
1.1.1	Pulpitis aguda.	14
1.1.2	Necrosis pulpar.	16
1.1.3	Periodontitis apical.	17
1.1.4	Concepto de biofilm.	18
1.1.5	Microorganismos involucrados en la patología pulpar y periapical.	23
1.2	Tratamientos alternativos de la periodontitis apical en dientes inmaduros.	27
1.2.1	Apicoformación con hidróxido de calcio.	29
1.2.2	Apicoformación con MTA.	32
1.2.3	Revascularización pulpar.	35
1.2.3.1	Concepto de revascularización pulpar.	36
1.2.3.2	Bases biológicas de la revascularización.	38
1.2.3.3	Protocolos clínicos propuestos.	45
1.2.3.4	Resultados histológicos.	49
1.3	Sustancias más utilizadas para la limpieza y desinfección en el tratamiento de revascularización pulpar.	51
1.3.1	Hipoclorito de sodio	52
1.3.2	Clorhexidina	56
1.3.3	Hidróxido de calcio	60
1.3.4	Pasta triantibiótica	62
1.4	Sistemas de irrigación.	65
1.4.1	Sistemas subsónicos.	65
1.4.2	Sistemas ultrasónicos.	67
1.4.3	Sistema de presión negativa apical.	68
2	OBJETIVOS	71
3	MATERIALES Y MÉTODOS	73
3.1	Materiales y métodos de: Evaluación de la eficacia de diferentes protocolos de desinfección utilizados para la revascularización pulpar en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.	73
3.2	Materiales y métodos de: Evaluación radiográfica de distintos protocolos de irrigación y de diferentes matrices utilizadas para la revascularización en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.	80
4	RESULTADOS	87
4.1	Resultados de: Evaluación de la eficacia de diferentes protocolos de desinfección utilizados para la revascularización pulpar en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.	87

4.2	Resultados de: Evaluación radiográfica de distintos protocolos de irrigación y de diferentes matrices utilizadas para la revascularización en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.	89
5	DISCUSIÓN	99
6	CONCLUSIONES	105
6.1	Conclusiones de: Evaluación de la eficacia de diferentes protocolos de desinfección utilizados para la revascularización pulpar en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.	105
6.2	Conclusiones de: Evaluación radiográfica de distintos protocolos de irrigación y de diferentes matrices utilizadas para la revascularización en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.	105
7	BIBLIOGRAFÍA	107
8	ANEXOS	137

1 INTRODUCCIÓN

La Endodoncia estudia la anatomía, fisiología, clínica, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades de la pulpa dental y de los tejidos periapicales. Dentro de la terapéutica endodóntica, el tratamiento de conductos es una de las técnicas más utilizadas en el día a día de la clínica dental, consistiendo en la remoción del tejido pulpar infectado y/o necrótico, la instrumentación mecánica y desinfección química del sistema de conductos radiculares, y su posterior obturación y sellado.

Con los últimos avances técnicos en la terapéutica endodóntica y en los materiales dentales, las tasas de éxito de los tratamientos de conductos se han ido incrementando (West J, 2006).

No obstante, la eliminación del tejido pulpar conlleva unas consecuencias indeseables:

- Pérdida la sensibilidad pulpar, por lo que la progresión de la caries no será percibida por el paciente.
- Anulación de la capacidad de la pulpa de producir dentina reparativa.
- Se detiene el desarrollo radicular, por lo que si el diente tiene el ápice inmaduro no se completará su formación.

Por ello, se sigue investigando acerca de procedimientos para la conservación de la vitalidad pulpar. De hecho, se ha descubierto en la última década, que las células madre localizadas en la pulpa y en la papila apical (SCPAs), sobreviven a la necrosis, aun existiendo una infección perirradicular, mantienen la capacidad de diferenciarse en células odontoblásticas responsables de la deposición de dentina y del desarrollo radicular (Huang GT, 2008), y esto ha abierto nuevas expectativas terapéuticas con la técnica de revascularización y regeneración pulpar, con las que se puede conseguir la revitalización pulpar en dientes con pulpa parcial o totalmente necrótica (Trope M, 2008).

1.1 Patología pulpar y periapical inflamatoria.

El tejido conectivo pulpar se encuentra rodeado por tejidos duros inextensibles, el esmalte y la dentina que, mientras permanezcan íntegros, actúan como una barrera defensiva mecánica frente a los agentes patógenos.

1.1.1 Pulpitis aguda.

Cuando bien sea por caries o por traumatismos los microorganismos alcanzan el tejido pulpar, desencadenan una respuesta inflamatoria e inmune.

Las bacterias causantes de la caries son también la causa principal de la infección y la inflamación pulpar, siendo la lesión que sufrirá el tejido pulpar el resultado de un proceso dinámico en el que, de un lado están los microorganismos invasores y, de otro, la respuesta inmune e inflamatoria del huésped (Bergenholtz, 2000; Hahn CL, 2007).

Para que se produzca la respuesta inflamatoria pulpar no es necesario que las bacterias alcancen físicamente la pulpa. Existen evidencias experimentales que demuestran que antígenos bacterianos y/o subproductos metabólicos pueden difundir a través de los túbulos dentinarios y provocar respuestas inmunes en la pulpa dental (Warfvinge J, 1985).

No solo el avance de la caries, sino también la exposición de los túbulos dentinarios, los tallados protéticos, la realización de maniobras iatrogénicas en operatoria dental, los traumatismos y la microfiltración de ciertos materiales de restauración, son factores externos capaces de desencadenar un cuadro inflamatorio pulpar.

Frente a agresiones leves o moderadas, la inflamación de la pulpa puede reparar el daño causado (**pulpitis reversible**), manteniéndose la vitalidad pulpar. En estos casos, el dolor aparece con ciertos estímulos y nunca es espontáneo.

Por el contrario, si no se eliminan los factores agresivos y no se aplica una terapia de conservación y protección pulpar, terminará produciéndose una pulpitis irreversible y, posteriormente, la necrosis pulpar.

La **pulpitis irreversible** es, pues, la respuesta inflamatoria aguda de la pulpa frente a la persistencia, crecimiento y progresión de las bacterias, u otro agente agresivo, en la cavidad pulpar.

Cuando el proceso inflamatorio pulpar es irreversible, el paciente presenta dolor de intensidad creciente, espontáneo, episodios dolorosos cada vez más frecuentes y dolor que persiste después de eliminar el estímulo. Suele haber, antecedentes de lesiones cariosas profundas, exposición pulpar o restauraciones filtradas (Canalda C, 2001).

Sin embargo, en algunos casos la pulpitis irreversible puede cursar sin sintomatología, por lo que se distinguen dos formas clínicas de pulpitis irreversible: la sintomática y la asintomática (Grossman L, 1973).

La **pulpitis irreversible sintomática** tiene como base histopatológica un proceso inflamatorio pulpar agudo y se caracteriza clínicamente por la presencia de episodios de dolor espontáneo (no provocado), intermitentes o continuos. Los cambios repentinos de temperatura (a menudo con el frío), provocan episodios prolongados de dolor (p. ej., el dolor que tarda en ceder, después de haber retirado el estímulo) (Cohen S, 1999).

El dolor de una pulpitis irreversible sintomática es generalmente moderado a grave, punzante o apagado, localizado o referido. El incremento de la presión intrapulpar por el acúmulo de líquido extravasado del plasma estimula intensamente las terminaciones nerviosas pulpares (Canalda C, 2001).

En una primera fase, la inflamación pulpar es serosa, predominando el dolor intenso, espontáneo, continuo e irradiado, que se incrementa en decúbito (produce gran congestión de los vasos pulpares), por la noche y con el esfuerzo. Si no se realiza tratamiento endodóntico, el proceso inflamatorio sigue avanzando y comienza a producirse pus (pulpitis aguda purulenta). El dolor es entonces pulsátil y muy intenso, calmándose con la aplicación de frío e incrementándose con el calor (Grossman L, 1973).

La **pulpitis irreversible asintomática** se caracteriza histopatológicamente por ser un proceso inflamatorio crónico pulpar. Clínicamente no se presenta con dolor agudo. En estos casos, el trasudado de

líquido inflamatorio incrementa la presión intrapulpar por debajo del umbral de excitación de las terminaciones nerviosas pulpares (Grossman L, 1973).

Generalmente, va a haber una amplia comunicación entre la cavidad pulpar y la lesión cariosa, por lo que existe un drenaje espontáneo del exudado seroso sin posibilidad de que se forme un edema intrapulpar.

Existen dos formas clínicas: la pulpitis hiperplásica y la pulpitis ulcerada.

La **pulpitis hiperplásica** se da en pacientes jóvenes con una gran cavidad de caries que expone la pulpa, proliferando ésta exofíticamente y formando una masa granulomatosa rosada-rojiza (pólipo pulpar), de consistencia fibrosa, que protruye a través de la cavidad de caries.

Al tener pocas fibras nerviosas es insensible al tacto, aunque en algunas ocasiones podría haber dolor transitorio y ligero durante la masticación. El diente puede responder muy poco o no responder a los cambios térmicos, a menos que se emplee frío extremo como el del cloruro de etilo (Grossman L, 1973).

La **pulpitis ulcerada** se produce cuando la inflamación pulpar crónica evoluciona formando un absceso en el punto de exposición cariosa. No produce dolor, aunque éste puede aparecer si los alimentos impactados dificultan el drenaje.

1.1.2 Necrosis pulpar.

La necrosis pulpar es "la descomposición séptica o no, del tejido conjuntivo pulpar que cursa con la destrucción del sistema microvascular y linfático, de las células y, en última instancia, de las fibras nerviosas". (Pumarola J, 2006).

También puede definirse como "la muerte de la pulpa, con el cese de todo metabolismo y, por lo tanto, de toda capacidad reactiva" (Lasala A, 1988), o la "secuela de la inflamación aguda o crónica de la pulpa con cese inmediato de la circulación pulpar" (Smulson M, 1997).

Dada la falta de circulación colateral y la rigidez de las paredes de dentina que rodean la pulpa, cuando ésta se inflama hay un drenaje insuficiente de los trasudados inflamatorios. Esto incrementa la presión intrapulpar

provocando el colapso del árbol arterio-venoso, con la consiguiente isquemia pulpar y, finalmente, la necrosis de la pulpa (Simon J, 1996).

La necrosis pulpar suele comenzar en las regiones más periféricas, sub-dentinarias, y avanzar en sentido centrípeto hacia el centro de la pulpa. Igualmente, la necrosis suele afectar primero a la pulpa cameral y luego extenderse hacia la pulpa radicular y apical.

La necrosis pulpar, desde el punto de vista histopatológico, puede clasificarse en dos tipos: coagulativa y licuefactiva.

La necrosis pulpar por coagulación se produce cuando la isquemia tisular genera una coagulación de las proteínas intracelulares. Se caracteriza por la transformación del contenido soluble del tejido pulpar en una sustancia sólida parecida al queso, por lo que también recibe el nombre de caseificación (formada principalmente por proteínas coaguladas, grasas y agua). La necrosis por licuefacción se produce cuando las enzimas proteolíticas convierten el tejido pulpar en una masa blanda o líquida (Grossman L, 1973).

La salida de pus a través de la cavidad de acceso endodóntico indica la presencia de una necrosis por licuefacción (Grossman L, 1973; Seltzer S, 1987).

A la necrosis pulpar le sigue la putrefacción. Los productos finales de la descomposición pulpar son los mismos que generan la descomposición de las proteínas en cualquier otra parte del cuerpo, es decir: gas sulfhídrico, amoníaco, sustancias grasas y anhídrido carbónico. Los productos intermedios, tales como el índol, el escatol, la putrescina y la cadaverina, explican los olores sumamente desagradables que emanan de un conducto con pulpa putrescente (Grossman L, 1973).

1.1.3 Periodontitis apical.

Cuando los antígenos, las toxinas, los restos necróticos y las bacterias de la pulpa inflamada y/o necrótica alcanzan el tejido periapical a través del forámen apical, se produce una reacción inflamatoria que se denomina periodontitis apical (Kakehashi S, 1965; Siqueira JF Jr, 2005).

Por tanto, la periodontitis apical es la respuesta defensiva del organismo a la inflamación, necrosis y destrucción de la pulpa dental (Nair P, 1998).

Inicialmente, la inflamación periapical aguda es predominantemente serosa y, si no se instaura el tratamiento, se hace purulenta, formándose el llamado **absceso apical agudo** que puede evolucionar a **absceso subperióstico**, **absceso submucoso** y terminar produciendo una **celulitis cérvico-facial**, cuadro muy grave que antes de la era antibiótica ocasionaba en muchos casos la muerte del paciente afectado (Canalda C, 2001).

El dolor agudo a nivel del diente afectado, con percusión positiva, junto con el ensanchamiento del espacio periodontal evidente en la radiografía periapical, son las claves para el diagnóstico de la periodontitis apical aguda.

En ocasiones, la inflamación periapical no tratada evoluciona de forma crónica y asintomática, originando bien la formación de tejido de granulación (**granuloma apical**, periodontitis crónica granulomatosa) o bien desarrollando una inflamación crónica supurativa (**absceso apical crónico**, periodontitis apical crónica supurativa) con drenaje de la secreción purulenta a través de una fístula.

En ambos casos la radiografía periapical del diente afectado muestra una imagen radiolúcida periapical, indicativa de la gran osteolisis provocada por la inflamación (Canalda C, 2001).

Entre las posibles evoluciones de la inflamación crónica periapical se incluyen también la formación de quistes apicales y la **osteoesclerosis** u osteítis condensante.

1.1.4 Concepto de biofilm.

El biofilm es una comunidad microbiana sésil caracterizada por células que están irreversiblemente adheridas a una superficie inerte como a un tejido vivo permaneciendo embebidas en una matriz de polisacáridos extracelulares que ellas mismas producen.

La capacidad de formación de las biopelículas no parece estar restringida a ningún grupo específico de microorganismos y en efecto se

considera que bajo condiciones ambientales adecuadas todos los microorganismos son capaces de formar biopelículas.

La formación de la biopelícula ocurre en seis fases (**Figura 1.1**):

1. Adhesión inicial del microorganismo a la superficie
2. Colonización
3. Co-adhesión o co-agregación
4. Crecimiento
5. Maduración
6. Desprendimiento de algunos microorganismos

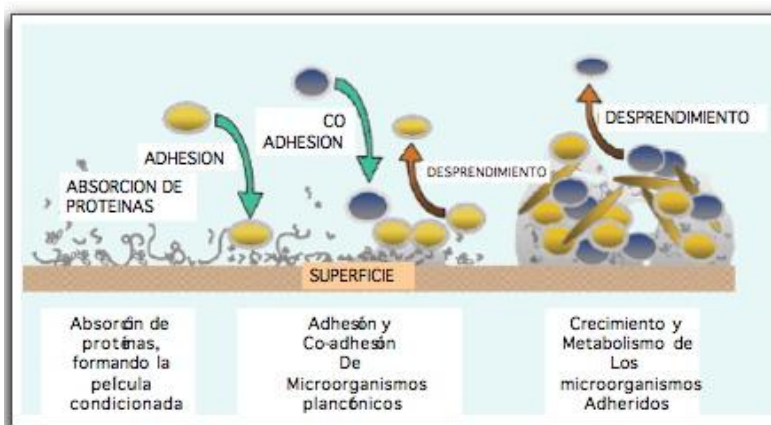


Figura 1.1. Etapas de la formación de la biopelícula. Tomado de Svensäter y Bergenholtz, 2004.

La etapa inicial del proceso de formación de la biopelícula es la adherencia del microorganismo sobre la superficie, (Scheie A, 2004) pero para que esto ocurra debe haber un prerrequisito: la presencia de microorganismos en estado libre flotante en un medio acuoso, llamados microorganismos planctónicos (Svensäter G, 2004).

Inicialmente los microorganismos se asocian de manera reversible a la superficie y posteriormente se adhieren de forma irreversible (Costerton J, 1987).

Para que microorganismos puedan colonizar y asociarse a la superficie se valen de unas estructuras celulares superficiales tales como: fimbrias, lipopolisacáridos extracelulares (LPS), polímeros extracelulares (EPS), flagelos

y otras proteínas. Mientras que los polímeros extracelulares (EPS) y los lipopolisacáridos son más importantes en la adhesión a sustratos hidrofílicos. Los flagelos son importantes en la adhesión, ya que están encargados de vencer las fuerzas de repulsión inicial entre el microorganismo y el sustrato.

Sin embargo, aunque la motilidad y la presencia de flagelos ayudan al proceso, esto no parece ser un requisito esencial, pues muchas bacterias Gram positivas inmóviles como estafilococos, estreptococos y micobacterias son capaces de formar biopelículas.

Durante la fase de adhesión se va a regular la expresión genética a través de varios sistemas de transducción por señales, cuyo término en inglés es *quórum sensing*, que van a conducir hacia una cascada de diversas reacciones, permitiendo la inducción o inhibición de la transcripción de genes (Scheie A, 2004).

El *quórum sensing*, que es activado cuando la concentración de moléculas autoinductoras alcancen el umbral, es decir, representa una vía que es activada como respuesta a la densidad microbiana, y de igual manera son sistemas que se encuentran en microorganismos Gram positivos como en Gram negativos.

Los microorganismos liberan dichas moléculas inductoras altamente específicas, que en el caso de las bacterias Gram positivas son oligopéptidos y en las Gram negativas son lactones de homoserine (Scheie A, 2004).

Posteriormente, el patógeno comienza a secretar un exopolisacárido que constituye la matriz de la biopelícula y forma unas estructuras similares a champiñones entre las cuales se observa la presencia de canales de agua (**Figura 1.2**). La composición del exopolisacárido es diferente en cada bacteria y varía desde alginato en *P. aeruginosa*, celulosa en *S. typhimurium*, un exopolisacárido rico en glucosa y galactosa en *V. cholerae*, poly-N-acetilglucosamina en *S. aureus*, etc.

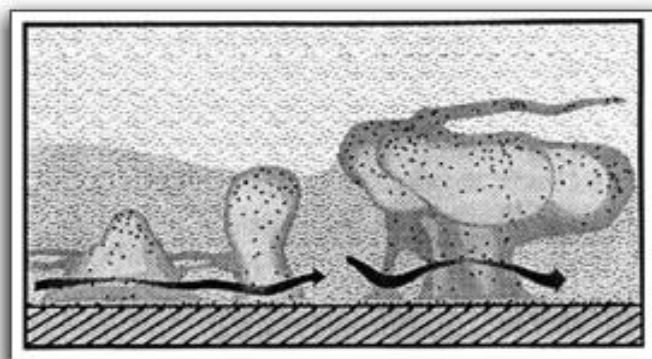


Figura 1.2. Diagrama del Modelo Tulipán o Champiñón. Tomado de Wimpenny y Colassanti, 2000.

Seguidamente ocurre la co-agregación que es el reconocimiento entre células, donde los organismos en la biopelícula pueden reconocer y adherirse a bacterias genéticamente distintas a través de adhesinas. Estas adhesinas reconocen proteínas, glicoproteínas o receptores de polisacáridos en las superficies, dando como resultado una arquitectura única para cada biopelícula (Kolenbrander P, 2002).

Una etapa posterior implica la multiplicación y el metabolismo de los microorganismos que se unieron, lo cual va a resultar en una comunidad microbiana mixta estructuralmente organizada (Svensäter G, 2004).

Finalmente, algunos microorganismos de la matriz de la biopelícula se liberan de la misma para poder colonizar nuevas superficies, cerrando así el proceso de formación de la biopelícula. Este proceso de separación parece ser un proceso continuo durante todo el desarrollo de la biopelícula (Svensäter G, 2004).

Cada una de las fases de la formación está expuesta a una variedad de factores físico-químicos como: pH, temperatura, osmolaridad, radiación, luz, tensión de oxígeno (Wimpenny J, 2000).

El crecimiento lento de los microorganismos dentro de la biopelícula debido a la limitación de nutrientes. Aquellas bacterias que se encuentren en las capas más profundas de la biopelícula, tienen menos acceso a los nutrientes y por lo tanto su crecimiento será más lento.

Sin embargo, el principal problema con la biopelícula es su conocida resistencia a los antimicrobianos. Se ha señalado que, la concentración

necesaria de un agente antimicrobiano para matar a microorganismos planctónicos, debe ser aumentada de 10 a 1000 veces para tener la misma eficacia sobre los microorganismos dentro de la biopelícula (Lewis K, 2001).

La característica que mejor distingue las infecciones crónicas relacionadas con biopelículas es su resistencia a los tratamientos antibióticos debido a la barrera de difusión física y química a la penetración de los antimicrobianos que constituye la matriz de exopolisacáridos, retardando o disminuyendo la penetración dentro de la biopelícula.

La aplicación de antibióticos bactericidas sería capaz de eliminar las células planctónicas. Si la concentración del antibiótico temporalmente disminuye, o si los síntomas desaparecen debido a la erradicación de las células planctónicas, y la terapia es descontinuada, las células persistentes se reorganizan en biopelículas, la cual comienza a liberar nuevas células planctónicas. Esta dinámica explica las recaídas en las infecciones por biopelículas y la necesidad de una terapia antibiótica larga. Además, estas infecciones son difícilmente resueltas por el sistema inmune. Esta respuesta inmune puede incluso causar daño en los tejidos vecinos debido a que los anticuerpos no pueden penetrar dentro de la biopelícula para resolver la infección, sino que se forman complejos inmunes en la superficie de la misma (Lewis K, 2001).

Las biopelículas bacterianas han sido observadas sobre las paredes de los conductos infectados, sugiriendo que los mecanismos de formación de las biopelículas pueden existir dentro del espacio del conducto radicular (Nair R, 1987; Molven O, 1991).

Con la progresión de la infección pulpar, los microorganismos que estaban en el lumen del conducto, invaden la totalidad del sistema de conductos radiculares, incluyendo ramificaciones y el cemento radicular, pudiendo ocasionar la resorción ósea e infección extrarradicular. La presencia del fluido intersticial facilita la adherencia de los microorganismos y la subsecuente formación de biopelículas extrarradicales, favoreciendo la supervivencia de los microorganismos en un ambiente inhóspito y manteniendo la patología periapical (Takemura N, 2004).

Cuando la región periapical es colonizada por los microorganismos, el huésped trata de eliminar la infección a través del sistema inmune. En este punto se pueden ocasionar resorciones en el cemento como producto de la reacción inflamatoria, promoviendo la formación de un nicho microbiano, donde los microorganismos pueden ordenarse y organizarse ellos mismos en asociaciones y producir una capa de polisacáridos (Leonardo M, 2002; Love R, 2004; Ferreira F, 2004).

La alteración en el microambiente del conducto radicular como sucede en el tratamiento endodóntico, puede estimular la calcificación de las biopelículas, lo que implica que la mineralización de la matriz brinda un refugio a los microorganismos viables (George S, 2005).

1.1.5 Microorganismos involucrados en la patología pulpar y periapical.

Cuando el complejo dentino-pulpar es infectado, los tejidos reaccionan en contra de los microorganismos invasores a fin de erradicarlos. La capacidad de este complejo de realizar esta función no ha sido subestimada, ya que los tejidos están dotados con procesos inmunocompetentes. Sin embargo, en términos clínicos, si la infección no es erradicada a través de esos procesos naturales o procedimientos operatorios, los microorganismos invaden el complejo dentino-pulpar venciendo las defensas y causando la enfermedad pulpar, e infectando la cámara pulpar y el sistema de conductos radiculares (Bergenholtz G, 1990; Stashenko P, 1998; Love R, 2002).

Más de 300 especies bacterianas han sido reconocidas como componentes de la microflora bucal (Delivanis P, 1984). Sin embargo, pocas especies parecen ser capaces de invadir el espacio pulpar e infectarlo (Sundqvist G, 1992). Esto sugiere, que muchas de las especies en la cavidad bucal no poseen las propiedades necesarias para invadir los túbulos dentinarios y sobrevivir dentro de ese microambiente (Love R, 2002).

Un factor muy selectivo de la microbiota endodóntica es la baja disponibilidad de oxígeno en los conductos radiculares infectados, especialmente cuando no existe comunicación entre la cámara pulpar y la cavidad bucal, en particular en las porciones apicales donde el bajo potencial

de óxido-reducción en el tejido necrótico favorece en un principio el crecimiento de bacterias anaerobias facultativas y posteriormente anaerobias estrictas.

La mayoría de los microorganismos patógenos así como su principal sustrato, los restos necróticos pulpares, pueden ser removidos por los procedimientos endodónticos rutinarios que incluyen la limpieza y conformación del espacio pulpar. Sin embargo, ésto no se logra completamente en la práctica clínica, debido a las complejidades anatómicas del sistema de conductos y las limitaciones en el acceso de los agentes terapéuticos

Las pulpas necróticas presentan una flora polimicrobiana caracterizada por una amplia variedad de combinaciones de bacterias, un promedio de 4-7 especies por conducto, predominantemente anaerobias estrictas y aproximadamente igual proporción de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Sunqvist G, 1992; Hancock H, 2001; Peters L, 2002).

Las especies bacterianas dentro del sistema de conductos radicular infectado puede variar considerablemente. El predominio de la microbiota endodóntica se caracteriza por la presencia de cocos y bacilos (Gutierrez J, 1990). Otros estudios han demostrado igualmente la presencia de filamentos y espiroquetas. (Molven O, 1991; Baumgartner J, 2003). **(Figura 1.3)**

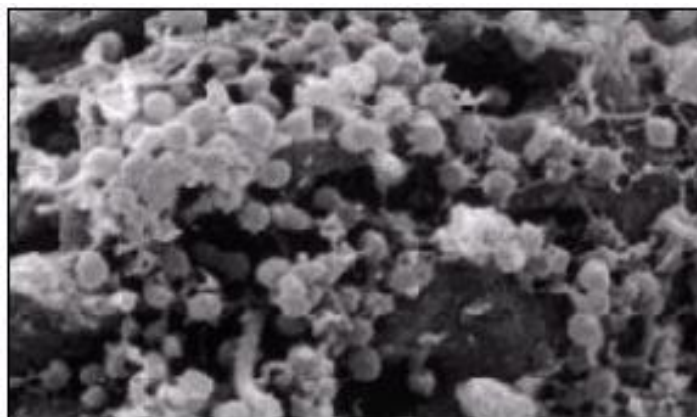


Figura 1.3. Microfotografía electrónica de barrido mostrando organizaciones bacterianas dentro de conductos radiculares infectados con lesiones perirradiculares. Colonias compuestas principalmente por cocos y bacilos. 4000X. Tomado de Siqueira Jr. 2004.

Se ha demostrado una correlación entre el tamaño de la lesión periapical y el número de especies bacterianas presentes en el sistema de conductos radiculares. Por lo tanto, dientes con grandes lesiones usualmente alojan mayor número de especies bacterianas y mayor densidad de bacterias en el

conducto radicular que aquellos dientes con lesiones pequeñas (Sundqvist G, 1992).

Otros estudios reportan la presencia de hongos en conductos radiculares infectados (Pinheiro E, 2003; Siqueira J Jr, 2003). Los hongos no son microorganismos frecuentemente encontrados en infecciones endodónticas primarias, su presencia es más común en infecciones secundarias o persistentes, posterior a la preparación del conducto radicular, probablemente como resultado de contaminación durante el procedimiento, o en casos de dientes obturados endodónticamente con lesiones perirradiculares resistentes al tratamiento de conductos (Nair P, 1990).

La genética molecular, más recientemente empleada para la identificación de patógenos bucales, ha permitido la tipificación de cada vez más especies relacionadas a la infección endodóntica, identificando bacterias que son propias de la infección primaria y otras que son localizadas en la infección persistente (Siquiera JF Jr, 2004; Siqueira JF Jr, 2005; Hong BY, 2013).

En general, las especies más frecuentes en infecciones primarias de conductos radiculares infectados pertenecen usualmente a los géneros *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Treponema*, *Peptostreptococcus*, *Eubacterium*, *Actinomyces* y *Streptococcus* (Peters L, 2002; Siqueira JF, 2002).

La microbiota de dientes con periodontitis apical crónica 2ª o persistente varía sustancialmente de la identificada en dientes no tratados (o con infección 1ª), y está caracterizada por un número muy limitado de especies microbianas (generalmente una sola especie), con predominio de microorganismos Gram positivos anaerobios facultativos. Las bacterias anaerobias facultativas son consideradas más difíciles de eliminar del conducto infectado debido a que son menos susceptibles a las medicaciones antimicrobianas que los anaerobios estrictos (Siqueira JF, 2002).

Sólo determinados microorganismos están en capacidad de sobrevivir a un microambiente con nutrientes restringidos, tal como lo ofrece un diente tratado endodónticamente, para ello se requieren factores de virulencia específicos que parecen poseer microorganismos tales como *Enterococcus*

faecalis, *Candida albicans*, *Actinomyces spp*, *Propionibacterium spp.* y *Streptococcus spp* (Molander A, 1998; Sundqvist G, 1992).

La siguiente figura presenta los principales microorganismos asociados a diferentes formas de lesiones perirradiculares (**Tabla 1.1**):

Infecciones primarias		Infecciones secundarias o persistentes***	Infecciones extrarradiculares****
Lesión perirradicular crónica*	Absceso perirradicular agudo**		
<i>Bacteroides</i>	<i>Porphyromonas</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Actinomyces</i>
<i>Treponema</i>	<i>Treponema</i>	<i>Actinomyces</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>Prevotella</i>	<i>Fusobacterium</i>	<i>Streptococcus</i>	
<i>Porphyromonas</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Candida</i>	
<i>Fusobacterium</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Propionibacterium</i>	
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	
<i>Streptococcus</i>	<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Pseudomonas</i>	
<i>Eubacterium</i>			
<i>Actinomyces</i>			
<i>Campylobacter</i>			
Referencias:			
* Sunqvist 1976, 1992, Baumgartner 1991, Gomes 1996, Haapasalo 1986, Le Goff 1997, Machado 2000, Rocas 2001, Siqueira 2000			
** Machado 2000, Rocas 2001, Siqueira 2001a,2001b,2001c, Sundqvist 1989, van Winkelhoff 1985			
*** Molander 1998, Peculien 2000, Sundqvist 1998, Waltimo 1997, Siren 1997			
**** Happonen 1986, Sjogren 1988			

Tabla 1.1. Género de patógenos endodónticos comúnmente asociados a diferentes formas de lesiones perirradiculares. Tomado de Siqueira, 2002.

Si bien es importante conocer la flora del conducto, en vista de su repercusión sobre el éxito del tratamiento, las muestras microbiológicas usualmente solo identifican microorganismos en el conducto principal, siendo improbable la toma de muestras más allá del punto final de la preparación y obturación, conductos laterales, istmos y ramificaciones apicales. Los microorganismos pueden encontrarse en estas zonas inaccesibles formando biopelículas, lo que puede conllevar a la persistencia o desarrollo de la periodontitis apical (Wu M, 2006).

E. faecalis es el microorganismo de mayor prevalencia en casos de periodontitis apical crónica persistente y es el más predominante en los biofilm intrarradiculares y extrarradiculares. Sin embargo, no ha sido determinado su mecanismo de resistencia, al igual que el de otros patógenos asociados a estas lesiones. Por otra parte, ha sido comprobada su baja susceptibilidad a ciertas soluciones antisépticas debido a una tolerancia innata a la alcalinidad de ciertos medicamentos utilizados durante la terapia endodóntica (Waltimo T, 1997).

Candida albicans es una levadura oral que puede ser ocasionalmente aislada del conducto radicular, en casos de periodontitis apical persistente,

tanto en cultivos puros o en conjunto con bacterias, y al igual que *E. faecalis* posee una variedad de factores de virulencia que le confieren su capacidad de sobrevivir incluso en la región periapical. Este patógeno tiene la capacidad de co-agregarse con una variedad de *Streptococcus* como *S. gordonii*, *S. mutans* y *S. sanguis*, los cuales pueden facilitar la formación de biopelículas complejas, promoviendo la colonización y supervivencia de ambos (Sen B, 1997; Waltimo T, 2003).

1.2 Tratamientos alternativos de la periodontitis apical en dientes inmaduros.

Una vez que el diente erupciona en la cavidad bucal, lo hace con una formación radicular incompleta por lo que se denomina diente inmaduro o con ápice abierto.

La pulpa es necesaria para la formación de dentina. La pérdida de la vitalidad pulpar en un diente permanente joven como secuela de caries o de lesión traumática antes de concluir la formación radicular trae como consecuencia una detención en el desarrollo de la raíz, un ápice incompletamente formado y una raíz con paredes dentinarias delgadas y propensas a la fractura. En estos casos, la forma del conducto y las dimensiones de un foramen apical mayor, dificultan mucho los procedimientos endodónticos convencionales, como por ejemplo, obturación tridimensional (Fucks AB, 2000).

Por ello, se deben realizar todos los esfuerzos necesarios para mantener la vitalidad pulpar de los dientes incompletamente formados para lograr su completo desarrollo radicular.

El tratamiento clásico propuesto a nuestros pacientes en estas situaciones clínicas (necrosis pulpar), se limitaba a la apexificación, cuyo objetivo era promover la formación de una barrera apical para cerrar el ápice abierto de un diente inmaduro. El problema de este tratamiento, es que no logra un desarrollo radicular normal, generalmente con una raíz corta en longitud y paredes dentinarias delgadas.

En función de la intensidad y duración de los irritantes físicos, químicos o bacterianos y de la resistencia del huésped, la patología pulpar puede variar desde una inflamación leve o pulpitis reversible, hasta una inflamación grave y progresiva o pulpitis irreversible que evolucionará hacia la necrosis.

La caries y los traumatismos dentarios constituyen las causas más frecuentes de lesiones pulpares en dientes permanentes jóvenes. La pérdida de vitalidad pulpar finaliza el crecimiento longitudinal de la raíz y ocasiona una mala relación corona-raíz.

Un diente incompletamente formado puede necesitar una terapia endodóntica por diversas razones: un traumatismo, una lesión de caries, un tratamiento ortodóntico, o una exposición pulpar mecánica.

La necesidad de ejecución de procedimientos distintos para los dientes con pulpa viva y pulpa necrótica exige un diagnóstico preciso de su estado. Hasta el momento, no existen unas pruebas diagnósticas clínicas confiables para evaluar con precisión el estado de una pulpa dental inflamada (Pitt Ford T, 1997).

Para realizar el diagnóstico más exacto, se debe obtener información a partir de una historia clínica cuidadosa, características del dolor y exámenes clínicos y radiográficos completos. El síntoma principal y la historia de dolor son factores importantes a considerar a la hora de establecer un diagnóstico (Fucks AB, 2000; Martín J, 2003).

La exploración clínica deberá ir seguida por una radiografía, la cual constituye uno de los medios que aporta la mayor cantidad de datos para el diagnóstico, pronóstico, tratamiento y los controles a distancia de los dientes permanentes jóvenes.

Al examen radiográfico, un diente incompletamente formado presenta un espacio del conducto radicular muy amplio y las paredes radiculares delgadas, lo que las hace más frágiles.

Normalmente, hay un área radiolúcida que rodea al ápice abierto de un diente inmaduro en desarrollo con una pulpa sana. En ocasiones es difícil diferenciarla de una zona radiolúcida patológica debido a una pulpa necrótica.

La comparación con el periápice del diente contralateral es de gran ayuda, en especial con los resultados de otras pruebas diagnósticas (Pitt Ford T, 1997).

El éxito del tratamiento endodóntico en los dientes con ápice inmaduro va a depender en gran medida de la realización de un buen sellado del conducto radicular, pero conseguir un sellado adecuado en estos dientes es muy complicado, ya que al no existir cierre apical y dada la fragilidad de las paredes, no se puede condensar la gutapercha adecuadamente (Mendoza A, 2002).

Dependiendo del diagnóstico pulpar, a lo largo de muchos años, se han utilizado dos terapias básicas: apexogénesis (pulpas vitales) y apexificación (pulpas necróticas).

La terapia de apexogénesis aplicada a dientes permanentes inmaduros con vitalidad pulpar involucra los siguientes procedimientos:

- Recubrimiento pulpar indirecto.
- Recubrimiento pulpar directo.
- Pulpotomía.

Si la pulpa presenta necrosis pulpar, se requieren procedimientos que promuevan el cierre apical cuando el diente no se ha formado completamente como el tratamiento de apexificación o apicoformación, bien con hidróxido de calcio o con agregado de trióxido mineral (MTA) (Shabahang S, 2013). Aunque hay que tener en cuenta que no se logrará mayor desarrollo radicular ni engrosamiento de las paredes dentinarias.

1.2.1 Apicoformación con hidróxido de calcio.

Es la técnica endodóntica indicada cuando la pulpa dental radicular de un diente permanente presente necrosis antes de que se termine de desarrollar la raíz dentaria. La técnica de apicoformación con hidróxido de calcio trata de inducir la formación de una barrera calcificada en el ápice abierto para lograr el cierre apical (Rafter M, 2005; Huang GT, 2008).

El protocolo clínico es el siguiente (Pumarola J y Canalda C, 2001):

1. **Radiografía preoperatoria**, para verificar el grado de desarrollo radicular y el estado periapical del diente.
2. La **anestesia del diente** está indicada cuando existe tejido pulpar vital en la zona media o apical del conducto, sin embargo, si se diagnóstica necrosis pulpar, la anestesia tendría por finalidad reducir la sensibilidad y las molestias provocadas por el clamp durante el aislamiento.
3. **Aislamiento** del campo operatorio con el dique de goma.
4. **Apertura y acceso cameral** proporcionados al diámetro del conducto. A veces, es preciso ampliarla un poco, sobre todo en dientes anteriores, para permitir el trabajo de los instrumentos necesarios para la limpieza de los conductos radiculares.
5. **Determinación de la longitud de trabajo**. Los localizadores apicales no son confiables para utilizarlos en estos dientes. Se prefiere determinarla con la técnica radiográfica, eligiendo como referencia el extremo más corto de la pared radicular, situándola de 1 a 2 mm menos para no lesionar el tejido periapical, el cual es la base de la reparación.
6. **Preparación del conducto** con limas de gran calibre, debemos retirar el contenido pulpar con limas de la tercera serie ISO (# 90 a #140) sin ejercer una acción intensa sobre las paredes dentinarias ya que éstas son muy delgadas y poco resistentes. La limpieza del conducto se consigue básicamente, mediante la irrigación con soluciones de hipoclorito de sodio al 2,5%. Durante la irrigación no se debe profundizar en exceso la aguja ya que el diente es más corto de lo normal y tiene el foramen mucho más amplio. Se recomienda colocar a la aguja un tope de goma para no correr riesgos de extrusión.
7. **Secado del conducto** con puntas de papel absorbente.
8. **Colocación del hidróxido de calcio intraconducto**. Para preparar la pasta se debe colocar sobre una loseta de vidrio estéril hidróxido de calcio puro y un vehículo viscoso como

glicerina o propilenglicol. También, si se quiere aumentar su radiopacidad se puede agregar sulfato de bario. La pasta se debe introducir hasta el límite de la instrumentación llenando el conducto radicular por completo.

9. Se **obtura** la cámara con un material temporal que produzca un sellado coronal hermético.
10. Se debe realizar una radiografía de control inmediato, para verificar la obturación del conducto.

El control clínico y radiográfico es fundamental y debe realizarse el primer mes y luego cada 3 meses, en el cual se debe evaluar, la homogeneidad de la obturación en el tercio apical de la pasta de hidróxido de calcio y la condición de los tejidos periapicales.

Cuando la radiografía de control muestre áreas vacías en el conducto, sobre todo en el tercio apical, se debe volver a colocar el medicamento. Si es necesario volver a colocar el hidróxido de calcio se recomienda, después de realizar el aislamiento absoluto y la remoción de la restauración provisional, colocar una jeringa con solución fisiológica calibrando la aguja 2 mm menos de la longitud de trabajo, utilizar una lima tipo K # 35 ó # 40 para ayudar en la remoción del hidróxido de calcio.

Si por el contrario, se observan signos de fracaso (fístulas, tumefacción, persistencia o aumento de tamaño de la lesión) se debe reevaluar el tratamiento realizado, mejorar la preparación del conducto y volver a colocar hidróxido de calcio.

Cuando se evidencia el cierre apical, se procede a aislar el diente y a eliminar la pasta del interior del conducto con irrigación abundante. Luego se comprueba de forma táctil la presencia de la barrera calcificada con una lima; sin embargo, otros autores para mayor seguridad sugieren realizar este procedimiento con una punta de papel invertida y minimizar el riesgo de romper el puente neoformado. Por último, se procede a secar el conducto y se obtura de manera definitiva con gutapercha termoplastificada.

La apicoformación con hidróxido de calcio tiene algunos inconvenientes, como, el largo tiempo de tratamiento (Shabahang S, 1999), su poca

predictibilidad y el debilitamiento de las paredes dentinarias con posibilidad de fractura radicular a posteriori (Kleier DJ, 1991; Andreasen JO, 2002) **(Figura 1.4)**



Figura 1.4. Apicoformación con hidróxido de calcio. Se observa una línea de fractura horizontal. Tomado de Andreasen 2002.

El tiempo necesario para la formación del ápice es largo aproximadamente de 2 a 4 años. El uso de un material más eficaz, como el agregado de trióxido mineral, que induzca la formación de una barrera calcificada puede reducir el tiempo del tratamiento considerablemente.

1.2.2 Apicoformación con MTA.

Hacia finales de los años 90, se introdujo en la práctica endodóntica un material llamado Agregado Trióxido Mineral (MTA), como un nuevo material indicado para sellar las vías de comunicación entre el sistema de conductos radiculares y el espacio perirradicular; y también para las obturaciones a retro (Torabinejad M, 1993, Torabinejad M, 1999).

El MTA[®] es un polvo que consta de partículas finas hidrofílicas que fraguan en presencia de humedad. La hidratación del polvo genera un gel coloidal que forma una estructura dura (Bolhari B, 2014). **(Figura 1.5)**

El material MTA[®] está compuesto principalmente por partículas de silicato tricálcico, aluminato tricálcico, silicato dicálcico, aluminato férrico tetracálcico, óxido de bismuto, y sulfato de calcio dihidratado.

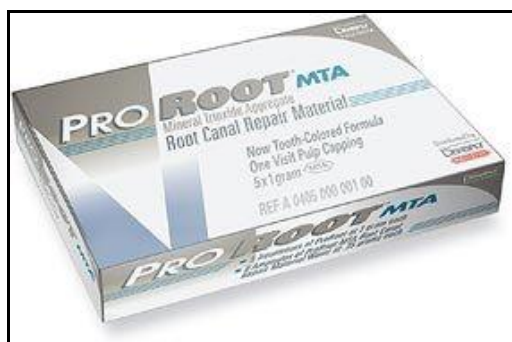


Figura 1.5. Agregado de trióxido mineral MTA®.

El tiempo de fraguado del material está entre 2 y 3 horas. El MTA® es un cemento muy alcalino, con un pH de 12,5. Este pH es muy similar al del hidróxido de calcio, por lo que, proporciona efectos antibacterianos e induce la formación de tejido duro (Asgary S, 2014).

El material tiene una fuerza compresiva baja, lo que provoca que no pueda ser usado en áreas funcionales. Otras características del MTA® son su baja solubilidad y una radiopacidad mayor que la dentina. Además el MTA® ha demostrado una buena biocompatibilidad (Chang SW, 2014), un excelente sellado a la microfiltración, una buena adaptación marginal y parece que reduce la microfiltración de bacterias.

El MTA está comercializado por Maillefer-Dentsply (Ballaigues, Suiza) bajo el nombre Pro-Root MTA® y viene presentado en sobres herméticamente sellados que contienen el polvo del MTA.

Una de las aplicaciones clínicas del MTA® es la apicoformación en dientes con los ápices abiertos (Mente J, 2013). **(Figura 1.6)**



Figura 1.6. Apicoformación con barrera apical de MTA. A) Radiografía preoperatoria B) Control a los 6 meses: se observa que la lesión está remitiendo. Soledad Rodríguez Benítez.

Aunque se reduce el tiempo de tratamiento a dos citas, las paredes dentinarias quedan debilitadas al igual que en el tratamiento con hidróxido de calcio (Torabinejad M, 1999).

Recientemente, se ha hecho referencia a un cambio de coloración en los dientes tratados con MTA blanco. Esto se debe al contacto entre el hipoclorito residual del conducto y el óxido de bismuto del MTA (Camilleri J, 2014). Por lo que es recomendable colocar la barrera de MTA debajo del límite amelo-cementario (LAC).

El procedimiento clínico recomendado por Torabinejad para la utilización del MTA en dientes permanentes con necrosis pulpar y ápices incompletamente formados, es el siguiente (Torabinejad M, 1999):

Anestesiar, aislar con dique de goma y preparar un acceso adecuado. El sistema de conductos radiculares se debe preparar utilizando instrumentos de gran calibre para retirar el tejido pulpar e irrigar con hipoclorito de sodio.

En dientes necróticos, para desinfectar el conducto radicular, se introduce el hidróxido de calcio como medicamento intraconducto por una semana. Después de irrigar el conducto radicular con NaOCI para eliminar el hidróxido de calcio, se seca con puntas de papel absorbente; se mezcla el polvo del MTA con agua estéril y se lleva la mezcla al conducto con un porta-MTA. **(Figura 1.7)**

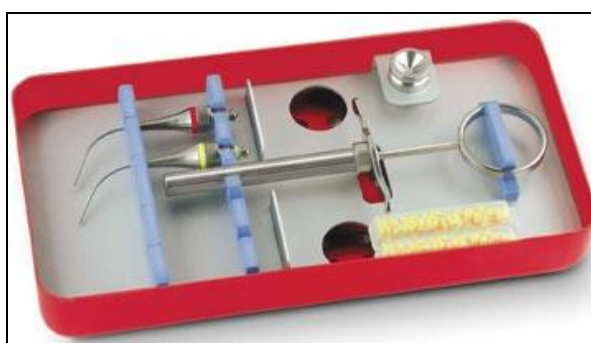


Figura 1.7. Jeringa porta-MTA Map System®.

Posteriormente, se condensa el MTA hacia el ápice de la raíz con condensadores, creando un tapón apical de MTA de 3 a 5 mm, y se comprueba su extensión radiográficamente.

Si la colocación de la barrera apical falla en el primer intento, lavar el MTA con agua estéril y repetir el procedimiento. Colocar una torunda de

algodón húmeda en el conducto y cerrar el acceso preparado de la cavidad con un material de restauración temporal, ya que este material tarda en fraguar de 2 horas y 45 minutos en medio húmedo.

En la segunda visita, obturar el resto del conducto con gutapercha o con resinas compuestas. Sellar la cavidad de acceso con una restauración definitiva y evaluar clínica y radiográficamente la cicatrización periapical a posteriori.

1.2.3 Revascularización pulpar.

Como se ha comentado antes, la técnica de apicoformación conlleva, generalmente, la detención del desarrollo radicular del diente tratado y como consecuencia, no promueve la regeneración de los tejidos y el desarrollo normal del ápice (apexogénesis).

Las consecuencias del desarrollo dental interrumpido incluyen: una proporción corona-raíz alterada, raíces con paredes dentinarias delgadas, aumento de riesgo de fractura radicular y ápices abiertos. **(Figura 1.8)**



Figura 1.8. Diente permanente inmaduro. Cortesía Dr. Alan Law, 2013

Por ello, se ha seguido investigando para tratar de obtener una técnica que tenga el potencial para regenerar los tejidos pulpares y dentinarios y que permita la formación completa de la raíz y del ápice de los dientes inmaduros necróticos. Hasta el día de hoy, ningún material de restauración ha sido capaz de igualar las propiedades físicas y mecánicas del tejido dentario. El ideal biológico sería restaurar el complejo dentino-pulpar a partir de procedimientos endodónticos que permitieran la regeneración de los tejidos involucrados.

Es posible que en estos dientes infectados y aún con lesión periapical, permanezcan vivos restos de tejido pulpar en la porción apical y en la vaina de

Hertwig a partir de los cuales pudiera producirse la regeneración del tejido pulpar (Trope M, 2008).

El uso del término de revascularización fue adoptado por Iwaya, para describir la curación de los abscesos periapicales y el desarrollo radicular en dientes inmaduros que presentan necrosis pulpar (Iwaya SL, 2001). Según Jeeruptan, con el tratamiento de revascularización, se aprecia un mayor aumento de la longitud de la raíz y el grosor en comparación con el tratamiento de apexificación con hidróxido de calcio o MTA (Jeeruphan T, 2012).

1.2.3.1 **Concepto de revascularización pulpar.**

El concepto de revascularización fue introducido por Ostby en 1961 (Ostby BN, 1961). En 1966, Rule y Winter documentaron el desarrollo radicular y la formación de una barrera apical en casos de necrosis pulpar en dientes permanentes en niños (Rule DC, 1966); y posteriormente, Ham y colaboradores, demostraron el cierre apical de dientes inmaduros sin pulpa en monos (Ham JW, 1972).

Numerosos estudios han demostrado que el desarrollo radicular puede continuar después de la desinfección del conducto radicular, tras haber provocado un profuso sangrado a nivel periapical para que se aporten factores de crecimiento y se pueda estructurar un complejo andamiaje (Jung IY, 2008; Thibodeau B, 2007), siendo también fundamental el adecuado sellado coronal (Hargreaves KM, 2008; Petrino JA, 2007).

El término revascularización hace referencia a la regeneración que hace un organismo vivo por sí mismo de sus partes perdidas o dañadas, incluyendo la dentina y las estructuras radiculares, como también células del complejo dentino-pulpar (Murray PE, 2007).

La **revascularización pulpar** sería pues, un procedimiento endodóntico consistente en la completa eliminación del tejido pulpar necrótico e infectado y la desinfección del espacio pulpar de manera que se permita la revascularización del tejido pulpar a partir de las células madre pulpares vitales remanentes de la papila apical, alcanzándose la completa revascularización de la pulpa dental y la continuación del desarrollo radicular (Cotti E, 2008).

El comienzo de la odontogénesis se produce sobre la 6ª semana del desarrollo embrionario, produciéndose una proliferación de células de la capa basal del ectodermo junto a una condensación del mesénquima subyacente. La proliferación continúa con la invasión del mesénquima por parte de las células epiteliales.

En los sucesivos estadios de desarrollo se va conformando la papila dental, derivada del mesodermo. **(Figura 1.9)**

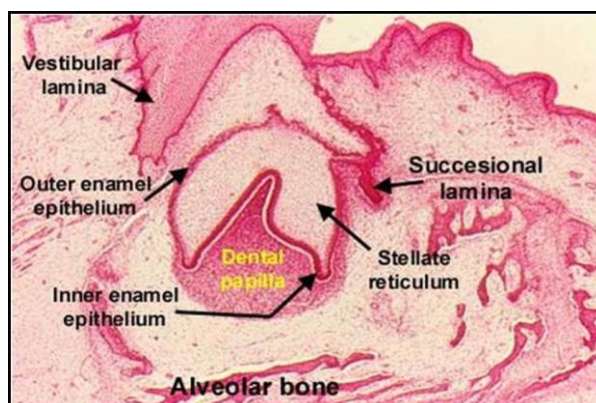


Figura1.9. Imagen histológica de la fase de casquete del órgano del esmalte. Tomado de: García AE. Patología y terapéutica dental. Editorial. Síntesis.

El desarrollo de la papila dental dará lugar a la pulpa, después de que las células del ectomesénquima queden encerradas por la dentina producida por los odontoblastos.

Aunque la porción apical de la papila dental durante el desarrollo de la raíz no había sido descrita con detalle en la literatura, recientemente se ha estudiado y se han descrito sus características histológicas y físicas, comprobándose la capacidad multipotencial de sus células para renovarse y dividirse en células hijas (Sonoyama W, 2008).

Por esta razón, en los casos de dientes inmaduros con periodontitis apical, al realizar el tratamiento endodóntico de revascularización, se terminaría el desarrollo radicular, sin ser necesario hacer antes un tratamiento de apicoformación. Otros autores han demostrado que el desarrollo radicular proporcionado por el tratamiento de revascularización no es superior al desarrollo obtenido por las técnicas de apexificación convencionales (Alobaid AS, 2014).

Aunque se han publicado numerosos casos clínicos de dientes inmaduros con periodontitis apical, en los que la revascularización pulpar y el cierre apical se han producido con éxito, los estudios científicos aún son escasos y la investigación ha de ser mayor en éste área (Huang GT, 2008).

1.2.3.2 Bases biológicas de la revascularización.

Langer y Vacanti, los pioneros en la construcción de tejidos artificiales, definieron el concepto de “ingeniería tisular” como “la utilización combinada de células, biomateriales y factores bioquímicos para reparar tejidos lesionados o enfermos” (Langer R, 1993).

La ingeniería tisular comprende la combinación de células vivas en una matriz, para reproducir una estructura tridimensional tisular que sea funcional y semejante al tejido que debe reemplazar.

Se han utilizado diferentes estrategias combinando matrices biocompatibles, factores de crecimiento, trasplantes celulares y terapias de liberación génica, cuyo objetivo final es recomponer la estructura y la función del tejido original (Schneider A, 2003).

Las técnicas de revascularización pulpar se han venido realizando fundamentalmente en pacientes jóvenes, entre 8 y 13 años, que tienen células madre con gran potencial regenerativo, y que han sufrido la necrosis pulpar de un diente con desarrollo radicular incompleto (Wigler R, 2013; Kahler B, 2014) como consecuencia de un traumatismo, permitiendo aumentar el pronóstico en estos dientes inmaduros (Thibodeau B, 2007; García-Godoy F, 2012; Law AS, 2013;), ya que continua el engrosamiento de las paredes dentinarias, permite el crecimiento radicular en longitud y se produce el cierre del ápice (Torabinejad M, 2011; Cvek M, 1990; Banch F, 2004).

Se incluyen pues, entre las indicaciones de esta técnica, los dientes traumatizados, avulsionados o con luxaciones, y que tengan el ápice abierto (Hargreaves KM, 2013). **(Figura 1.10)**

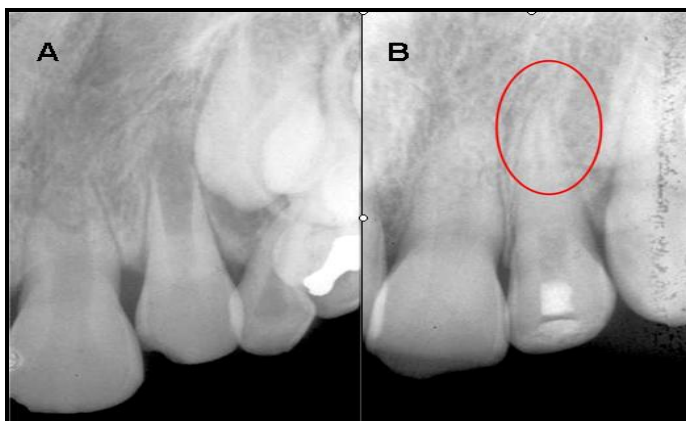


Figura 40. Revascularización de un diente avulsionado. A) Estado inicial; B) Control a los 18 meses donde se observa que la raíz ha completado su desarrollo radicular. Tomado de Nevins 1977.

Esos dientes presentan un ápice muy abierto, las raíces muy cortas y el tejido pulpar necrótico. Esto permite que el nuevo tejido pulpar que se forme tenga un amplio y rápido acceso al sistema de conductos radiculares por sus ápices abiertos y cortas raíces, en donde la distancia a recorrer es menor, permitiendo la proliferación del nuevo tejido pulpar hasta los cuernos pulpares.

En un estudio reciente se ha demostrado que el tratamiento de regeneración pulpar realizado en dientes con un tamaño de foramen menor de 1 mm también se permite el crecimiento de nuevo tejido dentro del conducto radicular (Laureys WG, 2013).

Se ha demostrado, que la porción apical del tejido pulpar de estos dientes (papila apical), así como la vaina epitelial de Hertwig, permanecen vitales, y contienen células mesenquimales indiferenciadas (células madre pulpares) que pueden proliferar y diferenciarse en neo-odontoblastos o dentinoblastos (Andreasen JO, 1988; Thibodeau B, Texeira F 2007; Maeda H, 2004).

Para conseguir la revascularización debemos tener también en cuenta el papel de los fibroblastos pulpares en la secreción de factores angiogénicos, los cuales son necesarios para completar la cicatrización pulpar, particularmente en sitios del daño en la pulpa (Tran-hung L, 2006).

A continuación se detallarán las **condiciones necesarias** para que se produzca la revascularización pulpar:

1°) Tejido pulpar vital a nivel apical.

En dientes con necrosis pulpar e incluso infección perirradicular, persisten células madre vitales en la zona apical del conducto y en la papila apical que tienen poder de diferenciación en odontoblastos (Thibodeau B, Texeira F, 2007).

La papila apical es un tejido blando de superficie lisa, adherido a los ápices en desarrollo. Contiene menos vasos y componentes celulares que el tejido pulpar pero que contiene células madre con capacidad dentinogénica. (Figura 1.11)

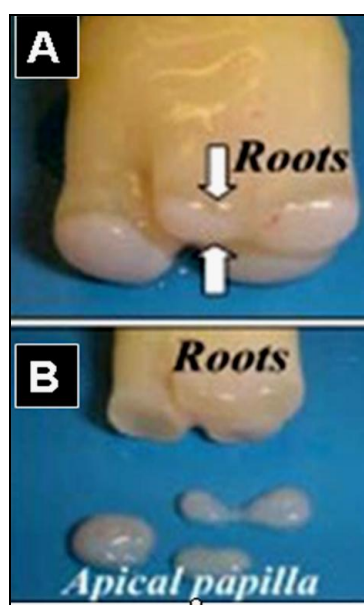


Figura 1.11. A) Tercer molar con desarrollo radicular incompleto mostrando la papila apical adherida a la raíz. B) Papila apical separada para aislar células madre (SCAP). Tomado de Murray PE 2007.

2°) Células madre:

Las células madre se definen como células clonogénicas capaces tanto de su auto-renovación como de su diferenciación en múltiples líneas celulares. Se cree que son células indiferenciadas que poseen diferentes grados de potencia y plasticidad (Gronthos S, 2002).

Las células madres se clasifican a partir de su origen en:

- Células **autólogas**, obtenidas del individuo mismo que será intervenido.

- Células **alogénicas**, obtenidas a partir de un individuo de la misma especie.
- Células **xenogénicas**, obtenidas de individuos de otra especie.

En el diente y tejidos vecinos podemos encontrar células autólogas en:

- **Células madre que permanecen vitales en la papila apical (SCAPs)** y que, por influencia de las células de la vaina epitelial de Hertwig, podrían proliferar y diferenciarse en odontoblastos.
- **Células madre de la pulpa dental (DPSCs)** que están presentes en la pulpa dental de los dientes permanentes, y que también pueden diferenciarse en odontoblastos.
- **Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)** que proliferarían a nivel de la región apical de la pulpa e invadirían el conducto radicular y las paredes dentinarias. De hecho, en algunos casos de revascularización pulpar se han observado fibras de Sharpey y cemento en el neotejido formado (Freymiller EG, 2004).
- **Células madre del hueso medular periradicular (BMSCs)** que pueden estar implicadas en la regeneración pulpar. La inducción del sangrado abundante en el conducto radicular necrótico ya desinfectado transportaría células madre óseas al lumen del conducto. **(Figura 1.12)**
-

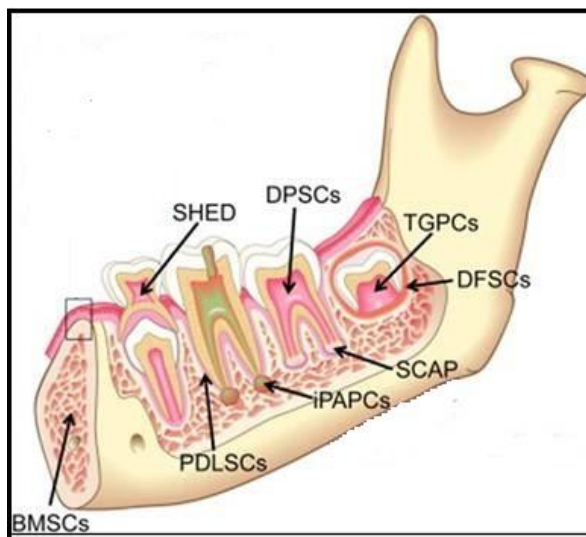


Figura1.12. Distintas fuentes potenciales de células madre.
Tomada del National Dental Pulp Laboratory.

3°) Desinfección profunda del canal radicular.

Es esencial para que la terapéutica de revascularización tenga un resultado positivo (Cotti E, 2008; Trope M, 2008), pero todavía no se ha establecido cual es el protocolo más efectivo (Diogenes AR, 2014).

Está contraindicado la instrumentación de los conductos, ya que éstos presentan las paredes dentinarias muy delgadas por lo que se recomienda sólo desinfectar con irrigantes y/o medicación temporal (Iwaya SL, 2001).

Sin embargo, en un trabajo reciente se sugiere el desbridamiento mecánico para eliminar la biopelícula bacteriana de las paredes dentinarias ya que los microorganismos que albergan dentro de ésta pueden interferir en la terapia de revascularización (Lin LM, 2014).

4°) Formación de una matriz en el interior del espacio pulpar que sirva de andamiaje para la proliferación del nuevo tejido.

Un espacio vacío en el conducto no favorece el crecimiento de nuevo tejido desde el área de la papila apical (Torneck CD, 1966; Torneck CD, 1967). Es necesario una matriz de andamiaje que actúe como guía sobre la que se promueva el crecimiento del nuevo tejido y la diferenciación celular, además de permitir la adherencia de las células (Hargreaves KM, 2008; Aggrawal V, 2012).

Para promover el crecimiento y la diferenciación celular se necesita una matriz apropiada que sea eficaz en el transporte de nutrientes y desechos. La

matriz une y localiza a las células, además de contener y aportar factores de crecimiento (Hargreaves KM, 2008; Aggarwal V, 2012).

La matriz debe ser biodegradable, con lo que puede degradarse gradualmente a la vez que va siendo reemplazada por el tejido regenerado.

Además, la matriz debe ser porosa para permitir la penetración y colocación de las células, y también debe ser biocompatible con el tejido huésped (Young CS, 2005).

Las moléculas de la matriz extracelular controlan la diferenciación de las células madre (Yamamura T, 2002), y pueden albergar células y factores de crecimiento (Young CS, 2002).

Para ello, algunos autores acondicionan la dentina con EDTA al 18% para exponer la matriz de colágeno de la dentina (Galler KM, 2011). Se ha demostrado que el colágeno es necesario para la adhesión de las nuevas células (Murray PE, 2007).

Las matrices pueden ser naturales (colágeno, fibrina, seda, y alginato) o sintéticas (varios polímeros como PLA, PGA, etc.) Los polímeros sintéticos generalmente se degradan por hidrólisis simple, mientras que los polímeros naturales son degradados principalmente de forma enzimática.

Como matriz sobre la que proliferen el nuevo tejido se ha utilizado el **coágulo sanguíneo** (Ostby BN, 1961; Thibodeau B, Texeira F, 2007), **gel de colágeno** (Nevins A, 1998; Shah N, 2008; Petrino JA, 2010; Yamauchi N, 2011) **plasma rico en plaquetas (PRP)** (Anitua E, 1999 y 2007; Ding RY, 2009; Torabinejad M, 2011 y 2012;; Jadhav G, 2012; Zhu W, 2013; Bezgin T, 2014; Yeom KH, 2015); y **fibrina rica en plaquetas** (Shivashankar VY, 2012, Mishra N, 2013; Johns DA, 2014).

5°) Señales moleculares – Factores de crecimiento:

Las **señales moleculares** que estimulan el crecimiento y la diferenciación de las DPSCs (células madre pulpares) están constituidas tanto por factores de crecimiento como por otros componentes que son capaces de estimular la proliferación y diferenciación celular (Wang Y, 2013).

Los **factores de crecimiento** son un amplio grupo de proteínas que se unen a los receptores celulares con el fin de inducir la proliferación y diferenciación celular mediante la unión a receptores en la superficie celular (Jadhav G, 2012).

Se han utilizado con éxito numerosos factores de crecimiento en la regeneración del complejo dentino-pulpar, incluyendo:

- **Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF).**
- **Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF).**
- **Factor de crecimiento tisular;** que estimulan la diferenciación y maduración de fibroblastos, odontoblastos y cementoblastos (Banchs F, 2004).
- **Factor de transformación de crecimiento (TGF):** en recubrimientos pulpares aumentaba la formación de dentina reparativa (Hu CC, 1998; Mathieu S, 2013).
- La **proteína morfogenética ósea (BMP)**, aplicadas directamente sobre la pulpa estimulan la diferenciación de células madre progenitoras en odontoblastos, así como la formación de dentina (Sloan AJ, 2000; Iohara K, 2004).
- El **factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF)** (Yokose S, 2004), el **factor de crecimiento similar a la insulina (IGF)** (Lovschall H, 2001).
- **Factor de crecimiento fibroblástico (FGF)**, también estimula a las células madre pulpares. Aunque en un trabajo reciente ha sido demostrado que el uso del FGF no era esencial para la reparación (Nagy MM, 2014).
- En estudios realizados en pulpas de terceros molares se encontraron que los fibroblastos son capaces de expresar dos importantes **factores pro-angiogénicos**, VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular) y FGF-2, los cuales juegan un papel muy importante en la neovascularización de los tejidos dañados (Tziafas D, 2000).

6°) Sellado coronario.

Se ha demostrado que, sin importar el material con que se realiza el procedimiento, si no se logra un buen sellado coronal que prevenga la invasión bacteriana futura y la microfiltración, la regeneración no será posible (Thibodeau B, 2007).

Este material debe ser biocompatible y no se recomienda materiales como amalgama, resina compuesta o ionómero de vidrio en contacto directo con el tejido pulpar. Sólo se deben usar éstos, una vez que estos tejidos sean cubiertos con un material biocompatible como MTA (Torabinejad M, 1999).

También se ha utilizado sobre el coágulo, un cemento a base de hidróxido de calcio CEM (*calcium enriched mixture*) (Nosrat A, 2011).

1.2.3.3 Protocolos clínicos propuestos.

No se recomienda, en la mayoría de los estudios instrumentar los conductos ya que se pueden debilitar aún más las paredes dentinarias.

En cuanto a la anestesia utilizada en los tratamientos de revascularización, se indica en la primera sesión el uso de anestesia con vasoconstrictor, como lidocaína al 2% con 1:100.000 de epinefrina. En la segunda sesión, se indica el uso de anestesia sin vasoconstrictor, como mepivacaína con el fin de lograr el sangrado de la zona apical y posterior formación de coágulo que contiene alta cantidad de factores de crecimiento.

En el caso de usar matriz de andamiaje con factores de crecimiento, como lo es el plasma rico en factores de crecimiento, no es necesario el sangrado apical, por lo tanto, no es relevante el tipo de anestesia utilizada.

A continuación se describen algunos protocolos de actuación para llevar a cabo la técnica de revascularización pulpar.

Iwaya (Iwaya S, 2001) propuso el siguiente protocolo inicial:

1. Aislamiento del diente.
2. Apertura cameral.
3. Irrigación con **hipoclorito de sodio al 5%** y con **peróxido de hidrógeno al 3%**.

4. Colocación en el conducto de una **pasta bi-antibiótica** (metronidazol + ciprofloxacino) y colocación de una obturación provisional.
5. Tras 6 semanas, se aplica **hidróxido de calcio**, ionómero de vidrio y resina compuesta como obturación provisional.

Mediante este protocolo clínico obtuvieron a los 5 meses signos de cierre apical. A los 15 meses observaron la formación de un puente de dentina y respuesta positiva a los test de vitalidad pulpar y a los 30 meses, el cierre apical completo con engrosamiento de las paredes del conducto.

Trope (Trope M, 2010), propone la siguiente técnica para la regeneración pulpar:

1. Aislamiento del diente.
2. Apertura cameral.
3. Irrigación abundante con **hipoclorito de sodio al 5.25%**.
4. Colocación de hidróxido de calcio como medicación intraconducto.
5. Inducción del sangrado y la formación de un coágulo de sangre intraconducto para proporcionar un andamio para el crecimiento del nuevo tejido.
6. Sellado coronal con un tapón de **MTA** y resina compuesta.

Con esta técnica consiguen la curación clínica a los 22 días, con desaparición de la radiolucidez periapical en 7 meses, y observaron el desarrollo radicular completo en 24 meses.

Da Silva (Da Silva LA, 2010), propone el siguiente protocolo, basado en su estudio en perros:

1. Aislamiento del diente con dique de goma
2. Apertura de la cavidad de acceso.
3. Instrumentación pasiva a la longitud de trabajo hasta lima K del calibre #50.

4. Desinfección con **hipoclorito sódico al 2,5%** con el uso del sistema de irrigación por presión apical negativa **Endovac®** para un grupo; con el cual se puede irrigar con hipoclorito sódico en dientes con ápices abiertos hasta la longitud de trabajo, sin peligro de extrusión de la solución irrigante al periápice; y desinfección con **hipoclorito de sodio al 2,5% con presión positiva** mas **pasta triantibiótica**, para el otro grupo.
5. Después de la preparación biomecánica se introduce una lima K del calibre #30, sobrepasando el ápice para inducir el sangrado y la formación de un coágulo sanguíneo.
6. Sellado coronal con **MTA** y amalgama de plata.

Cohença (Cohença N, 2010), en un estudio sobre protocolos de desinfección en dientes inmaduros de perros, compara los efectos de la irrigación con **hipoclorito de sodio al 2,5%** por presión apical negativa **Endovac®**, con la técnica de irrigación por presión positiva y colocación de pasta triantibiótica como medicación intraconducto.

Estos autores pudieron observar histológicamente que las paredes de los conductos desinfectados con la técnica de irrigación con hipoclorito usando el sistema Endo-Vac®, presentaban formaciones mineralizadas más consistentes, un tejido conjuntivo mas estructurado en el ápice, y un proceso de reparación más avanzado que los que utilizaban la presión positiva y la pasta tri-antibiótica, por lo que sugieren que el uso de antibióticos podría no ser necesario.

Torabinejad (Torabinejad M, 2011), ha propuesto recientemente la utilización del plasma rico en plaquetas (**PRP**) para la regeneración pulpar con el siguiente protocolo:

1. Aislamiento con dique de goma.
2. Cavidad de acceso coronal
3. Irrigación del conducto con **hipoclorito sódico al 5,25%**.
4. Colocación de **pasta tri-antibiótica** durante 22 días.

5. Extracción de 20 ml de sangre del antebrazo para la preparación del **plasma rico en plaquetas (PRP)**.
6. Eliminación de la mezcla de antibiótico previo a la inyección del PRP en el conducto radicular.
7. Colocación del PRP dentro del conducto.
8. Colocación de un tapón de **MTA** directamente sobre el **PRP**.
9. Sellado coronal con materiales de restauración definitivos.

Tras 6 meses, encuentran ausencia de la sensibilidad a la percusión o a la palpación en los dientes tratados. Encuentran una respuesta positiva similar a la de otros dientes sanos en las pruebas de sensibilidad al frío y con el test pulpar eléctrico. Radiográficamente, los dientes presentaban una resolución de la lesión periapical y un alargamiento y cierre radicular. Por tanto concluyen que el PRP parece ser el andamiaje perfecto para la regeneración de los tejidos pulpaes.

Chen (Chen MY-H, 2012), en un estudio publicado recientemente, proponen la siguiente técnica para dientes permanentes de animales infectados y con tejido pulpar necrótico, con periodontitis apical:

1. Aislamiento del diente con dique de goma.
2. Apertura cameral.
3. Irrigación con **hipoclorito de sodio al 5,25%**.
4. Suave desbridamiento mecánico.
5. Colocación de **hidróxido de calcio** como medicamento intraconducto.
6. Cuando han remitido los síntomas clínicos se induce el sangrado de los tejidos periapicales mediante limas tipo K.
7. Sellado de la parte coronal con **MTA**; y la cavidad de acceso con resina compuesta.
8. Seguimiento durante 26 meses.

Estos autores encontraron 5 tipos de respuestas:

- Engrosamiento de las paredes del conducto y continuación del desarrollo radicular.
- El foramen apical de las raíces permanecía abierto.
- Calcificación severa del espacio del conducto.
- Formación de una barrera de tejido entre el tapón de MTA y el ápice de la raíz.

1.2.3.4 Resultados histológicos.

Se sugiere que se efectúen seguimientos por lo menos hasta los primeros 16 meses posteriores a la terapia para observar resultados más precisos en cuanto al engrosamiento de las paredes dentinarias y la posible revascularización pulpar dentro del diente tratado (Nosrat A, 2013).

Los criterios que se deben evaluar en este tratamiento son (Ding RY, 2009):

- Ausencia de síntomas o signos de inflamación o infección.
- Evidencia radiográfica de desarrollo radicular en longitud y en grosor de las paredes dentinarias.
- Disminución de la lesión radiolúcida perirradicular (Kim DS, 2012).

Estudios recientes, han demostrado que tras la realización de estos procedimientos de revascularización, el crecimiento de los tejidos neoformados no es homogéneo desde el punto de vista histológico. El engrosamiento y alargamiento de las paredes radicales son debidos a la aposición de tejido cementoide, osteoide o similar al ligamento periodontal que engrosaban las paredes dentinarias (Wang X, 2010; Shimizu E, 2013; Torabinejad M, 2015; Becerra P, 2014). **(Figura 1.13)**

Un tejido conectivo laxo similar al tejido pulpar se ha localizado en las paredes del conducto radicular después de haber inducido la regeneración pulpar (Shimizu E, 2012). Por el contrario, otros autores demostraron que el tejido generado posterior a la revascularización consistía en un tejido conectivo periodontal y no de tejido pulpar (Da Silva LA, 2010; Martin G, 2013; Gomez-Filho JE, 2013).

En un trabajo reciente se ha comprobado que hay crecimiento de hueso dentro del conducto en los dientes sometidos al tratamiento de revascularización pudiendo producir la anquilosis del diente e interrumpir la erupción normal del diente (Saoud TM, 2015).

Con las diferentes técnicas de revascularización pulpar se ha logrado alcanzar una respuesta positiva al aplicar el test eléctrico tras 15 meses después de la terapia, lo cual avala la reinervación y vascularización de los tejidos formados (Ding RY, 2009; Nosrat A, 2013).

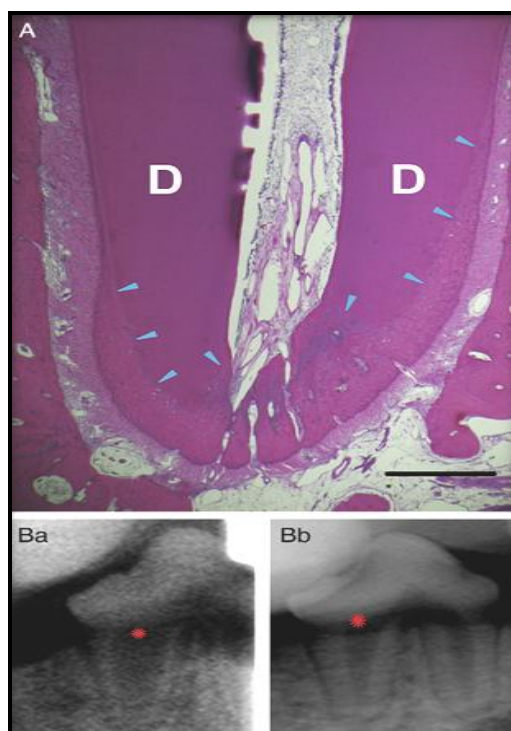


Figura1.13. Se observa la maduración normal de la raíz. Las flechas azules señalan el cemento. Las radiografías indican el crecimiento radicular antes y después del tratamiento. Tomada de Wang X 2010.

El área de raíz radiográfica (RRA) es una medida válida para evaluar los resultados radiográficos en los tratamientos regenerativos en dientes inmaduros (Flake NM, 2014).

Sin embargo, hace falta más evidencia clínica para justificar si el tratamiento de revascularización es factible en la rutina de la práctica clínica (Manguno C, 2012; Walton RE, 2013), ya que en algunos casos clínicos, el diente que era más probable que se revascularizara con éxito no lo hizo, mientras que otro diente que era menos probable que se revascularizara, sin embargo, si lo hizo (Lenzi R, 2012).

1.3 Sustancias más utilizadas para la limpieza y desinfección en el tratamiento de revascularización pulpar.

En dientes incompletamente formados la instrumentación mecánica es difícil y no recomendada por dos razones: 1) debilita aún más las paredes del conducto 2) podríamos eliminar células vitales que son claves para la revascularización (Reynolds K, 2008; Windley W, 2005).

Las complejidades anatómicas y las condiciones clínicas de los conductos infectados, además de las limitaciones de acceso de los instrumentos e irritantes, comprometen el nivel de desinfección que pueda alcanzarse, por lo cual algunos autores recomiendan la colocación de un medicamento intraconducto con actividad antimicrobiana antes de la obturación del conducto (Arnold M, 2013).

La medicación intraconducto o medicación tópica implica el uso interno de un medicamento con la intención de lograr efectos terapéuticos locales.

El objetivo principal de la medicación intraconducto es reducir el número de microorganismos en conductos radiculares infectados y su rol es secundario a la limpieza y conformación del conducto radicular. En este sentido, se plantea que cuando la instrumentación biomecánica es combinada con la colocación de un medicamento por un período de tiempo apropiado antes de la obturación, mayor número de bacterias pueden ser eliminadas. La falta de una medicación intraconducto disminuye el porcentaje de éxitos en los dientes con conductos infectados (Chong B, 1992; Siqueira J, 1996; Behnen M, 2001; Gomez B, 2003).

En los dientes con pulpa necrótica, la medicación intraconducto resulta un auxiliar valioso en la desinfección del sistema de conductos radiculares, sobre todo en lugares inaccesibles a la instrumentación (Goldberg F, 2002).

En conductos radiculares infectados, la medicación intraconducto ha sido indicada para varios propósitos (Siqueira J, 1996; Chong B, 2003; Ørstavik D, 1999):

- Eliminar cualquier bacteria remanente después de la instrumentación del conducto.

- Reducir la inflamación de los tejidos periapicales y remanentes pulpares.
- Previene la reinfección del conducto y el aporte de nutrientes a las bacterias remanentes.
- Controla abscesos y conductos con humedad persistente.
- Induce la formación de tejido duro.
- Control del dolor.
- Control del exudado o hemorragia.
- Control de la resorción inflamatoria de la raíz en los casos de traumatismo dental.

Se debe elegir un desinfectante efectivo en su acción antimicrobiana pero a la vez que permita la supervivencia de las células madre viables.

1.3.1 Hipoclorito de sodio

La irrigación es una parte esencial y fundamental en la preparación del conducto radicular, ya que permite llegar donde la instrumentación no lo consigue (Gulabivala k, 2005).

El hipoclorito de sodio ha sido definido por la Asociación Americana de Endodoncistas como un líquido claro, pálido, amarillento, extremadamente alcalino y con fuerte olor clorino, que presenta una acción disolvente sobre el tejido necrótico y restos orgánicos y además es un potente agente antimicrobiano.

Químicamente, el hipoclorito de sodio (NaOCl), es una sal formada de la unión de dos compuestos químicos, el ácido hipocloroso y el hidróxido de sodio, que presenta como características principales sus propiedades oxidantes. La fórmula química de este compuesto es la siguiente:



De todas las sustancias que se emplean en la actualidad, el hipoclorito de sodio parece ser el más idóneo, ya que cumple un mayor número de requisitos para la irrigación que cualquier otro compuesto conocido.

Al **NaOCl** se le han atribuido varias propiedades beneficiosas durante la terapia endodóntica:

1. **Desbridamiento:** expulsa detritus generados por la preparación biomecánica de los conductos.
2. **Lubricación:** humedece las paredes del conducto radicular favoreciendo la acción de los instrumentos.
3. **Destrucción de microorganismos:** puede eliminar todos los microorganismos de los conductos radiculares y bacterias organizadas en biofilms (Spratt DA, 2001). Puede destruir rápidamente bacterias vegetativas, hongos y virus, incluyendo el HIV, retrovirus, y virus de la hepatitis A y B (Ercan E, 2004; Siqueira JF, 2000). Además, el hipoclorito de sodio es capaz de inactivar la endotoxina (Silva LA ,2004), sin embargo, el efecto es menor en comparación con la del hidróxido de calcio (Tanomaru JM, 2003).
4. **El pH alcalino:** neutraliza la acidez del medio y por lo tanto crea un ambiente inadecuado para el desarrollo bacteriano (Cohen S, 1999).
5. **Disolución de tejidos:** es el disolvente más eficaz del tejido pulpar vital y necrótico (Naenni N, 2004). Una pulpa puede ser disuelta en un tiempo de 20 minutos a 2 horas. La eficacia de la disolución del hipoclorito de sodio se ve influida por la integridad estructural de los componentes del tejido conjuntivo de la pulpa. Si la pulpa está necrótica, los restos de tejidos se disuelven rápidamente, si está vital y hay poca degradación estructural y el NaOCl necesitará más tiempo para disolver los restos pulpares (Cohen S, 1999).
6. **Baja tensión superficial:** penetra en todas las concavidades del conducto radicular (Leonardo M, 1994).
7. **Toxicidad:** es directamente proporcional a su concentración; y puede causar síntomas graves como dolor, sensación de quemadura, edema, formación de hematoma, sangrado profuso

del conducto, entre otros, si se inyecta más allá del ápice (Ørstavik D, 1999).

Existe mucha controversia sobre la concentración del hipoclorito de sodio para su uso en Endodoncia. La mayoría de los profesionales Americanos usan el hipoclorito de sodio al 5,25 %, sin embargo, han sido publicadas irritaciones muy severas cuando estas soluciones fueron extruidas a los tejidos periapicales (Hülsmann M, 2000).

Observaciones hechas in vitro muestran que el 1% de hipoclorito de sodio debería ser suficiente para disolver el tejido pulpar completamente durante un tratamiento, aunque sería necesario ampliar el tiempo de irrigación (Sirtes G, 2005). Sin embargo, un estudio reciente demostró que con una concentración de hipoclorito superior, la capacidad de disolver el tejido pulpar se puede llegar a multiplicar incluso por diez (Stojicic S, 2010).

Un modo de aumentar la eficacia de soluciones de hipoclorito podría ser bajar su pH, de esta forma las soluciones serían también menos tóxicas para los tejidos vitales. Sin embargo, el hipoclorito con estas características es una solución mucho más inestable, con una disminución de su vida media, siendo ésta menor a una semana (Cotter JL, 1985).

Una alternativa para mejorar la eficacia del hipoclorito de sodio en el sistema de conductos radiculares es el incremento de temperatura. Esto mejora de inmediato su capacidad de disolución de tejido (Stojicic S, 2010).

El aumento de temperatura del hipoclorito, elimina mejor los restos de tejido orgánico de la dentina de una forma más efectiva que el hipoclorito a temperatura ambiente (Kamburis JJ, 2003).

En un estudio ha sido demostrado que la capacidad de disolución de tejido pulpar humano es igual con 1% de hipoclorito a 45° que 5.25% a 20°C (Sirtes G, 2005). Un posible problema podría ser el deterioro del hipoclorito al aumentar la temperatura. Ha sido demostrado, que la solución del hipoclorito de sodio es estable durante un período de 4 horas cuando es calentado a 37°C (Frais S, 2001).

En cuanto a su capacidad de remoción de capa de desecho se han publicado artículos que confirman que el NaOCl utilizado como lavado final en

los conductos radiculares preparados no remueve la capa de desecho (Garberoglio R, 1994).

Agentes desmineralizantes como el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y ácido cítrico son recomendados como coadyuvantes en la terapia del conducto radicular (Loel BA, 1975).

El EDTA es un agente quelante inorgánico capaz de desmineralizar los tejidos duros dentarios, ya que es un quelante específico para el ion calcio; usado durante la localización de conductos estrechos, como lubricante y como complemento para remover la capa de barrillo dentinario (Basrani E, 1999). El ácido cítrico parece ser ligeramente más potente en concentraciones similares al EDTA. Tanto el EDTA como el ácido cítrico muestran una alta eficacia en la remoción del barrillo dentinario (Zehnder 2005).

Numerosos investigadores han usado varias concentraciones y diferentes productos comerciales de EDTA y NaOCl con la intención de remover la capa de desecho. Hasta el momento, está ampliamente aceptado que el método más efectivo para remover la capa de desecho es la irrigación de los conductos con 1ml de 17% de EDTA durante 1 minuto seguido por 10 ml de 2,5 a 5,25% de NaOCl (Goldberg F, 1977; Soares JA, 2010). Debe ser tenido en cuenta que una exposición prolongada a quelantes como EDTA puede debilitar la dentina de la raíz (Calt S, 2002).

Diversos estudios han relatado sobre el precipitado tóxico formado cuando se unen el hipoclorito y la clorhexidina. Basrani y colaboradores (Basrani 2004) demostraron que la mezcla de ambos podía formar PCA (paracloroanilina) y que esta aumenta directamente con la concentración del hipoclorito de sodio.

Banchs y Trope en 2004, proponen un protocolo de irrigación para el tratamiento de revascularización utilizando hipoclorito de sodio al 5,25% en combinación con clorhexidina al 0,12% para la desinfección de los conductos radiculares, utilizando entre ambos una solución salina para evitar la formación de un compuesto tóxico denominado paracloroanilina (Banchs F, 2004).

Chueh propone realizar una sola cita en la terapia de revascularización con hipoclorito de sodio a una concentración del 2,5% (Chueh LH, 2006 y

2009). De igual manera, McCabe propone la desinfección en una sola cita con hipoclorito al 5% para promover la revascularización (McCabe P, 2015).

El hipoclorito es un agente irritante y puede provocar daño de las células madre pulpares remanentes evitando que éstas logren su adhesión en las superficies del conducto radicular. Sin embargo, es un excelente antimicrobiano, por lo cual, al aplicarse en las terapias regenerativas debe ser lavado con suero con el fin de evitar prolongar su toxicidad dentro del conducto y evitar la muerte de las células madre de la zona apical del conducto. Essner demostró que si utilizamos una concentración de hipoclorito de sodio del 4% disminuye la viabilidad celular (Essner MD, 2011).

Sin embargo, Trevino demostró que la irrigación con EDTA al 17% e hipoclorito al 6% fue compatible con la supervivencia de las células madre (Trevino EG, 2011).

En dientes inmaduros permanentes se ha usado el sistema de presión negativa apical (ANP) Endovac[®], para poder llevar el hipoclorito al 5,25% hasta el final del conducto sin riesgo de extrusión del irrigante al periápice (Da Silva LA, 2010, Hockett JL, 2008; Cohenca N, 2010).

1.3.2 Clorhexidina

La clorhexidina es un potente antiséptico, que es utilizada para el control químico de la placa de la cavidad oral. Las soluciones acuosas del 0.1 al 0.2% son recomendadas para tal fin, mientras que el 2% es la concentración de las soluciones de irrigación para el conducto radicular (Zamany A, 2003). Se sostiene, que la clorhexidina es menos cáustica que el hipoclorito de sodio (Jeansonne 1994), aunque una solución de clorhexidina al 2% es irritante para la piel.

Entre las principales propiedades de la clorhexidina y para su aplicación en Endodoncia se destacan las siguientes:

1. Efecto bactericida:

En altas concentraciones la clorhexidina induce la precipitación o coagulación del citoplasma celular (Lin S, 2003; Al-Kahtani A, 2005).

La actividad antimicrobiana de la clorhexidina se debe a que es absorbida por la pared celular causando rotura y pérdida de los componentes celulares (Yesilsoy C, 1995).

El mecanismo antimicrobiano de la clorhexidina se relaciona con su estructura molecular de bisbiguanida catiónica. La molécula catiónica de la membrana celular interna cargada negativamente, causa filtración de componentes intracelulares y muerte celular.

Según algunos autores, la clorhexidina tiene una eficacia antibacterial comparable con la del hipoclorito de sodio (Xavier AC, 2013).

2. Efecto bacteriostático:

En bajas concentraciones, sustancias de bajo peso molecular, como el potasio y el fósforo pueden disgregarse ejerciendo un efecto bacteriostático. Este efecto ocurre debido a la lenta liberación de la clorhexidina. Se ha dicho que el efecto bacteriostático de la clorhexidina es de mayor importancia que el efecto bactericida.

Tanto la clorhexidina al 2% como al 0.12% poseen actividad antimicrobiana residual por 72 horas cuando se usa como medicación intraconducto (Weber C, 2003; Ferrer – Luque M, 2013).

3. Actividad antimicrobiana de amplio espectro:

Es activa contra un amplio rango de organismos Gram +, Gram -, levaduras, hongos, anaerobios facultativos, y aerobios. Los estafilococos, *Streptococcus mutans*, *salivaris* y la *Escherichia Coli* son altamente susceptibles a la clorhexidina.

4. Sustantividad:

La sustentividad es una las propiedades por la que se reconoce a la clorhexidina como una efectiva solución de irrigación del sistema de conductos radiculares. Se ha demostrado que los conductos tratados con esta solución son menos susceptibles a la reinfección. Las raíces tratadas con clorhexidina parecen adquirir actividad residual antimicrobiana durante 3 días (Ørstavik D, 1999; Lenet B, 2000; Weber C, 2003; Souza M, 2012).

Al igual que con el uso del hipoclorito de sodio, el calentamiento de una solución de clorhexidina de menor concentración podría aumentar su eficacia desinfectante local en el sistema de conductos radiculares manteniendo la mínima toxicidad sistémica (Enanov C, 2004).

La clorhexidina no puede ser empleada como irrigante principal en Endodoncia debido a que es incapaz de disolver restos de tejido vital y necrótico (Naenni N, 2004; White RR, 1997; Baca P, 2011; Alves FR, 2011).

Sin embargo, se plantea que la incapacidad de remover completamente el gel del conducto es probablemente el principal obstáculo para su aplicación como medicamento (Lambrianidis T, 2006).

La solución Q-mix[®] (Dentsply/Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA) es un nuevo irrigante desarrollado por el Dr. Markus Haapasalo y colaboradores, que contiene por EDTA al 17%, clorhexidina 2% y un detergente tensioactivo: bromuro de cetiltrimetilamonio (Haapasalo M, 2010). **(Figura 1.14)**



Figura 1.14. Solución Q-mix[®]

El bromuro de cetiltrimetilamonio, es un compuesto onodoro, no volátil, soluble en agua. Es un detergente de baja toxicidad muy potente en cuanto a su actividad desinfectante, ya que, ataca a bacterias Gram-positivas y negativas, esporas, hongos y virus. Su mecanismo de acción se debe a que penetra en la porción hidrófoba en la membrana celular de los microorganismos, se asocia con el grupo fosfato de los fosfolípidos provocando alteraciones en la permeabilidad de la membrana y desequilibrio de los metabolitos del sodio y potasio, con la consecuente desnaturalización proteica (Stojicic S, 2012).

La solución Q-mix[®] fue diseñada para realizar una sola irrigación final, después de la utilización del hipoclorito de sodio 5,25% durante la fase de

instrumentación de conductos radiculares. Para ello, el fabricante recomienda dejarlo actuar en el conducto radicular durante 90 segundos, y después secar con puntas de papel antes de obturar.

Hasta la actualidad, el protocolo de irrigación final incluye la eliminación del barrillo dentinario con un agente desmineralizante (Elnaghy AM, 2014), y para eliminar las bacterias restantes que se alojan dentro de los túbulos dentinarios (Morgental RD, 2013).

Por lo que, un producto combinado como el Q-mix[®], proporciona en una única irrigación final, eliminación del barrillo dentinario y acción antibacteriana (Haapasalo M, 2010; Dai L, 2011; Ma J, 2011; Tay FR, 2011), sin causar la erosión dentinal, que se ha observado cuando se utiliza hipoclorito y EDTA (Ozdemir HO, 2012; Das A, 2014).

A pesar del contenido en clorhexidina y EDTA en la solución Q-mix[®], no se ha observado el precipitado blanquecino que se forma entre la clorhexidina y el EDTA (Rasimick BJ, 2008).

En un trabajo reciente se ha documentado que después de la irrigación con solución Q-mix[®] inducía la muerte celular de manera más lenta que cuando se utilizaba hipoclorito, por lo que se puede considerar, que el Q-mix[®] puede ser menos agresivo para los tejidos vivos que el hipoclorito (Alkahtani A, 2014).

Se han documentado casos exitosos de revascularización tras el uso de clorhexidina al 0,12% o 2% (Banchs F, 2004). Pero, a pesar de su capacidad antibacteriana, algunos estudios muestran que es muy dañina para las células de la zona periapical. Por otra parte, su sustantibilidad puede interferir en la adhesión de las células madre a la matriz extracelular dentinaria (Trevino EG, 2011).

Algunos estudios sugieren que la clorhexidina tiene efectos tóxicos sobre células humanas y tejido de granulación. Algunos autores, recomiendan el uso cuidadoso de la clorhexidina como solución irrigante, evitando su salida al periápice, ya que puede reducir la adhesión de los macrófagos modulando los mecanismos de reparación y las reacciones inflamatorias e inmunológicas a nivel de los tejidos perirradiculares inflamados. Los macrófagos juegan un papel esencial en la respuesta inmunológica del huésped ante el proceso

infeccioso e inflamatorio (Segura JJ, 1999; Tavares WL, 2013). Sin embargo, se ha demostrado en otro estudio de revascularización que la desinfección con hipoclorito al 6% y clorhexidina al 2% no daña las células madre (Shin SY, 2009).

Además, un estudio reciente, ha demostrado que la PCA formada por la combinación de 1% de hipoclorito de sodio y 2% de clorhexidina, causa la formación de un precipitado (PCA) que funciona como un barrillo dentinario químico y que afecta a la permeabilidad de los túbulos dentinarios (Soares Ade J, 2013). En consecuencia, a la formación de este precipitado, debería utilizarse un irrigante intermedio para impedir la formación del precipitado sobre los túbulos dentinarios y comprometer el sellado del conducto.

1.3.3 Hidróxido de calcio

El hidróxido de calcio fue introducido por Herman en 1920 (Herman BW, 1920). Es un polvo blanco, granular, amorfo y fino, con la fórmula $\text{Ca}(\text{OH})_2$. Se obtiene por calcinación del carbonato cálcico y posee marcadas propiedades como un pH muy alcalino, aproximadamente de 12,4, lo cual le confiere propiedades bactericidas (Siqueira J, 1999; Sirén EK, 2014).

El hidróxido de calcio es comúnmente utilizado en el tratamiento de conducto con necrosis pulpar como medicamento intraconducto por su efectividad bactericida (Walton R, 2003; Holland R, 2003).

Ha sido utilizado para una amplia variedad de propósitos que incluyen protector de cavidades, recubrimiento pulpar directo e indirecto, pulpotomía, medicación del conducto radicular entre citas, prevención de resorción radicular, reparación de perforaciones, tratamiento de fracturas radiculares horizontales y como componente de selladores del conducto radicular. Tiene la capacidad de inducir la formación de tejido duro, tiene acción antibacteriana (Turk BT, 2009), reducir la inflamación de los tejidos perirradiculares (Chong BS, 1992), inactiva el lipopolisacárido (De Oliveira LD, 2007), disminuye el exudado y tiene capacidad de disolver tejidos orgánicos (Wadachi R, 1998).

Con respecto al tiempo que debe ser empleado, se demostró que el hidróxido de calcio es altamente efectivo en la destrucción de la flora del

conducto radicular persistente, cuando los conductos fueron medicados entre 14 y 21 días (Leonardo MR, 2006).

Una desventaja del hidróxido de calcio es que pierde el efecto hacia microorganismos específicos del conducto radicular como el *Enterococcus Faecalis*; también es difícil de remover del conducto (Kaptan F, 2012), y puede disminuir el tiempo de fraguado de los selladores a base de óxido de zinc eugenol (Almyroudi A, 2002).

Los tratamientos prolongados con hidróxido de calcio provocan un aumento en la fragilidad de las paredes dentinarias, predisponiendo al diente a fracturas, debido a sus propiedades higroscópicas y proteolíticas (Sheehy EC, 1997).

Para que el medicamento pueda ejercer su acción antiséptica es necesario que el conducto este conformado, vacío, seco y con su permeabilidad dentinaria reestablecida. Para alcanzar esto último es necesario irrigar el conducto con EDTA al 15-17%. Después de dejar que actúe el agente quelante durante 1 a 2 minutos, se irriga con hipoclorito de sodio para eliminar el EDTA y se seca el conducto con puntas de papel. La irrigación con EDTA tiene por objeto eliminar la capa de desecho formada por restos dentinarios y una sustancia amorfa que queda sobre las paredes del conducto después de la preparación biomecánica, que obstruye la entrada de los túbulos dentinarios y disminuye la permeabilidad. De esta forma, el hidróxido de calcio penetrará dentro de los tubulillos dentinarios, que también se encuentran alojados por bacterias (Goldberg F, 2002).

La colocación apropiada del hidróxido de calcio dentro del sistema del conducto radicular puede influir en su efectividad (Torres C, 2004). Para la colocación del hidróxido de calcio, se usan léntulos, instrumentos endodónticos, puntas de papel o sistemas de jeringas.

Es importante eliminar la pasta del hidróxido de calcio por completo antes de obturar el conducto, ya que si quedan restos de la misma se podría comprometer el sellado del conducto, así como dificultar la quelación entre el eugenol y el óxido de zinc si se utiliza un sellador con esta composición. Para ello debe realizarse una irrigación con solución de hipoclorito de sodio

alternada con EDTA y activada con sistemas subsónicos o ultrasónicos (Canalda C, 2001).

El hidróxido de calcio ha sido utilizado en el tratamiento de revascularización colocándolo en la parte coronal del conducto como medicación temporal entre una sesión y la siguiente (Cotti E, 2008; Chueh LH, 2009; Cehreli ZC, 2011; Chen MY, 2012; Soares Ade J, 2013).

Según Bose, la colocación de hidróxido de calcio y pasta triantibiótica en dientes inmaduros con periodontitis apical, ayuda al desarrollo radicular (Bose R, 2009).

Iwaya recomienda la desinfección con hipoclorito de sodio, peróxido de hidrógeno y medicación intraconducto con hidróxido de calcio (Iwaya S, 2011).

Aunque se han descrito como principal inconveniente calcificaciones del conducto radicular tras el uso del hidróxido de calcio como medicación temporal (Nosrat A, 2013). El contacto directo de la pasta de hidróxido de calcio con cualquier tejido pulpar vital remanente, produce una capa de tejido calcificado que evitará la migración de tejido de generación dentro del espacio pulpar, además el alto pH de éste puede dañar las células mesenquimáticas indiferenciadas existentes (Chen MY, 2012).

1.3.4 Pasta triantibiótica

El éxito en el uso de diversos antibióticos sistémicos y tópicos en otros campos de la medicina, los convirtió en candidatos probables para llevar su acción antibacteriana al conducto radicular. Pero existen tres preocupaciones principales sobre su uso en el conducto radicular:

- a) La sensibilización:** Su uso tópico aumenta el riesgo de que el paciente se vuelva alérgico al mismo. Pueden ocurrir reacciones anafilácticas que ponen en peligro la vida por la administración de antibiótico a personas sensibilizadas.
- b) El desarrollo de bacterias resistentes,** que pueden originar infecciones más difíciles de tratar (Al-Ahmad A, 2014).
- c) Espectro limitado:** Ningún antibiótico es eficaz contra todos los microorganismos endodónticos. Tomando en cuenta que la mayor

parte de las infecciones endodónticas son causadas por una combinación de especies, es poco probable que un solo antibiótico logre inhibir o eliminar con eficacia todas las bacterias (Ørstavik D, 1999). Aunque, el uso combinado de 3 antibióticos puede ser más citotóxico que si se usa un solo antibiótico (Chuensombat S, 2013).

Desde los años 50 se han propuestos numerosas combinaciones de antibióticos para ser usadas como medicación temporal en los conductos radiculares. Más recientemente, se han propuesto combinaciones de ciprofloxacina, metronidazol y minociclina para ser usado como medicación intraconducto en los tratamientos de regeneración pulpar en dientes inmaduros con periodontitis apical (Windley W, 2005; Thibodeau B, Texeira F, 2007; Gomes- Filho JE, 2012). **(Figura 1.15)**



Figura1.15. Pasta triantibiótica con metronidazol, ciprofloxacino y cefixima.

Metronidazol es un antibiótico del grupo de los nitromidazoles con un amplio espectro contra parásitos y bacterias anaerobias conocido por sus potentes efectos contra los cocos anaerobios así como también bacilos Gram positivos y Gram negativos. Penetra en la membrana celular de la bacteria, se une al ADN y rompe su estructura inhibiendo la síntesis de ácido nucleico llevando a la muerte bacteriana.

Tetraciclina, que incluyen tanto la doxiciclina como la minociclina son un grupo de antimicrobianos bacteriostáticos, tienen amplio espectro contra microorganismos Gram positivos y Gram negativos, espiroquetas y bacterias anaerobias y facultativas. Entra en la bacteria por un proceso de difusión a la membrana externa y por transporte activo a la membrana interna, inhiben la

síntesis de proteínas en la superficie de los ribosomas, provocando la muerte bacteriana.

Ciprofloxacino, es una fluoroquinolona sintética de acción bactericida que actúa a través de la degradación del ADN e impide la replicación bacteriana. Es efectiva contra patógenos Gram negativos pero limitada la acción contra los Gram positivos.

Los primeros en usar la pasta triantibiótica fueron Banchs y Trope en el año 2004, obteniendo buenos resultados en comparación a la aplicación de hidróxido de calcio y formocresol (Banchs F y Trope M, 2004).

Según Windley, en un estudio llevado a cabo en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical y desinfectados con NaOCL a una concentración del 1,25% y con una pasta triantibiótica, el 70% de las muestras quedaron libres de bacterias (Windley W, 2005).

Se ha demostrado que el uso de esta pasta permite una buena desinfección para que posteriormente los tejidos regenerados ocupen el espacio remanente del sistema de conductos radiculares (Huang GT, 2008; Thibodeau B y Trope M, 2007; Thibodeau B, 2009; Nosrat A, 2012; Ghaeth H, 2015; Albuquerque MT, 2015).

El uso de antibióticos es compatible en contacto con los tejidos, ya que no producen daño a las células madre (Gomes-Filho JE, 2012). En un trabajo concluyeron que una cantidad de 0,39 gr/ml de pasta triantibiótica tiene poca toxicidad y es capaz de reducir las bacterias de los conductos infectados (Chuensombat S, 2013).

También se han utilizado otros antibióticos como el augmentine para la desinfección del conducto radicular en tratamientos de regeneración pulpar (Nosrat A, 2013); y la amoxicilina en sustitución de la minociclina (Thomson A, 2010).

Hoshino y Sato usaron una mezcla de antibióticos demostrando una mayor eficacia de la combinación de estos 3 antibióticos (25 mgr/ml de cada uno en proporciones iguales), frente a la acción individual de cada uno de ellos usados por separado (Hoshino E, 1996; Sato I, 1996).

Sin embargo, se han descrito algunos inconvenientes como, tinción de la corona debido al uso de la minociclina (Petrino JA, 2007; Kim J, 2010; Nagata JY, 2014), por esta razón se sugirió sustituir la minociclina por cefalosporina de 4ª generación (Cefaclor) (Trope M, 2010). Para evitar la tinción, también se ha propuesto sellar los túbulos dentinarios antes de colocar la pasta triantibiótica (Reynolds K, 2009).

Otro inconveniente del uso de antibióticos intraconducto son las alergias (Bhalla B, 2007); resistencias bacterianas (Slots J, 2002) desmineralización de la dentina radicular (Yassen GH, 2013); y la mayor dificultad de eliminarlo de los conductos en comparación con el hidróxido de calcio (Berkhoff JA, 2014) **(Figura 1.16)**



Figura 1.16. Tinción de la corona provocada por la minociclina. Tomado de Kim 2010.

Algunos autores han demostrado que la pasta antibiótica tiene mayor efecto antibacteriano que otras medicaciones intraconducto (Taneja S, 2012; Ordinola-Zapata R, 2013).

La pasta antibiótica es eficaz contra bacterias como el *Enterococcus faecalis* y *Porfiromonas gingivalis*, con más efectividad que con la medicación con hidróxido de calcio o la clorhexidina (Sabrah AH, 2013).

1.4 Sistemas de irrigación.

A lo largo de la historia de la Endodoncia, se ha tratado de desarrollar sistemas de activación de los irrigantes.

1.4.1 Sistemas subsónicos.

Tronstad y colaboradores (Tronstad L, 1985) fueron los primeros en publicar el uso de un instrumento sónico para endodoncia en 1985.

La activación sónica presenta una frecuencia más baja (1-6 KHz) que la activación ultrasónica (Ahmad M, 1987).

El movimiento oscilatorio de los dispositivos ultrasónicos es puramente longitudinal, es decir, la energía sónica genera una amplitud significativamente mayor en sentido antero-posterior en la punta frente a la energía ultrasónica.

La activación sónica es un método efectivo en la desinfección de los conductos radiculares (Sabins RA, 2003; Pitt WG, 2005).

El sistema Endoactivator[®] (Dentsply Tulsa Dental Specialities, Tulsa OK) es el instrumento sónico más actual (Ruddle CJ, 2008). **(Figura 1.17)**



Figura1.17. Sistema de activación subsónica Endoactivator[®].

Éste consiste en una pieza de mano inalámbrica y 3 tipos de puntas de diferentes tamaños. Estas puntas son flexibles, lisas y no cortan dentina. La vibración de la punta, en combinación con el movimiento de la misma hacia arriba y abajo en cortos movimientos verticales, produce un poderoso fenómeno hidrodinámico (Ruddle CJ, 2002).

Son necesarios 10.000 ciclos por minuto para optimizar la limpieza, eliminar el barrillo dentinario y las biopelículas bacterianas de las paredes del conducto (Caron G, 2010; Mancini M, 2013).

Sin embargo, en un estudio reciente de Uroz-Torres (Uroz-Torres D, 2010), dice que no había diferencias estadísticamente significativas en la remoción de barrillo dentinario entre el EndoActivator[®] y las jeringas de irrigación tradicionales. Una posible ventaja del EndoActivator[®] es su

seguridad. Desai (Desai P, 2009) en un estudio en el que analizaron la extrusión de diversos mecanismos de agitación del irrigante, demostraron que el EndoActivator® producía menos extrusión de irrigante que la irrigación ultrasónica y la irrigación con jeringa convencional.

Otra posible ventaja de este sistema (aunque existe controversia en la literatura), es la disminución de la carga bacteriana comparado con la irrigación de hipoclorito sin agitar (Pasqualini D, 2010).

1.4.2 Sistemas ultrasónicos.

Los dispositivos ultrasónicos fueron usados mucho tiempo para periodoncia antes de que Richman introdujese los ultrasonidos para endodoncia (Richman MJ, 1957).

La energía ultrasónica produce frecuencias mayores pero con amplitudes menores. Fue diseñada para oscilar en una frecuencia de 25-30 KHz (Walmsley AD, 1991).

Algunos artículos representativos del uso de los ultrasonidos en Endodoncia son: (Burleson A, 2007; Harrison AJ, 2010).

Sabins y colaboradores llegaron a la conclusión de que los sistemas ultrasónicos eran más efectivos en la remoción de restos dentinarios que los sistemas de irrigación sónicos (Sabins RA, 2003).

Dos tipos de irrigación ultrasónica han sido descritos en la literatura. El primer tipo combina una instrumentación e irrigación ultrasónica simultánea (**UI**), y el segundo tipo, llamado irrigación pasiva ultrasónica (**PUI**), funciona sin una instrumentación simultánea.

Estudios que emplean ultrasonidos UI presentan unos conductos significativamente más limpios que los preparados convencionalmente (Archer R, 1992; Lee MT, 2004). Sin embargo, otros estudios no han demostrado la superioridad de UI como técnica de limpieza y conformación ; estos resultados podrían ser atribuidos a la disminución del movimiento vibratorio dentro de una raíz con un espacio insuficiente (Ruddle C, 2008).

Unas preparaciones irregulares en los conductos son frecuentemente producidas por el UI (Walmsley AD, 1991). Por lo tanto, UI no es generalmente

empleada como una alternativa a la instrumentación (Abbott PV, 1991). Por el contrario, la literatura endodóncica muestra que es más ventajoso aplicar el ultrasonidos (PUI) después de la preparación completa del conducto radicular (Zehnder M, 2006).

El termino PUI fue empleado para describir un mecanismo de irrigación en el que no había ningún contacto en las paredes del conducto con un instrumento endodóntico. Con esta tecnología no cortante, el potencial para crear irregularidades en el conducto es mínimo (Jensen SA, 1999). Durante PUI, la energía es transmitida de una punta oscilante al irrigante presente en el conducto mediante ondas ultrasónicas.

Hay un consenso general con que PUI es más efectivo que la jeringa de irrigación convencional en la remoción de tejido pulpar y dentina (Lee MT, 2004). **(Figura 1.18)**



Figura1.18. Punta Irrisafe® utilizada para el sistema de activación ultrasónica.

Para algunos autores, la activación con la energía ultrasónica usando hipoclorito de sodio y EDTA, es capaz de remover más detritus y eliminar más bacterias que otros sistemas (Sabins RA, 2003; Cachovan G, 2013).

Sin embargo, es posible que ambas técnicas puedan producir grados similares de limpieza cuando la activación sónica se aplique por un período de tiempo más largo (Lee MT, 2004).

1.4.3 Sistema de presión negativa apical.

Es difícil para los irrigantes llegar a la porción apical del conducto debido al atrapamiento de aire. Éste fenómeno físico ha sido descrito como efecto "vapor lock" o burbuja de aire, que podría ser atribuido al hecho de que cuando

se irriga con presión positiva con hipoclorito, éste reacciona con el tejido orgánico de los conductos radiculares y forma rápidamente una burbuja de aire en la porción apical.

Sin embargo, si la punta de la aguja es colocada muy cerca del foramen apical, aumenta el riesgo de extrusión del irrigante a los tejidos periapicales (Hülsmann M, 2003).

En el sistema Endovac[®] (Discus Dental, Culver City, CA) una macro o micro cánula de plástico es conectada con un tubo a una jeringa de irrigación y a la aspiración de la unidad dental. **(Figura 1.19)**



Figura1.19. Sistema de irrigación por presión negativa apical Endovac[®].

La macrocánula tiene un diámetro de apical de # 55 y una conicidad de 02, y la microcánula tiene un diámetro de # 32 con extremo cerrado y agujeros laterales. Este sistema funciona por aspiración negativa, es decir, el irrigante es llevado al conducto por una jeringa a la cámara pulpar y el irrigante es aspirado en la región apical por una micro o macrocánula. De esta forma, el hipoclorito se está renovando continuamente. **(Figura 1.20)**

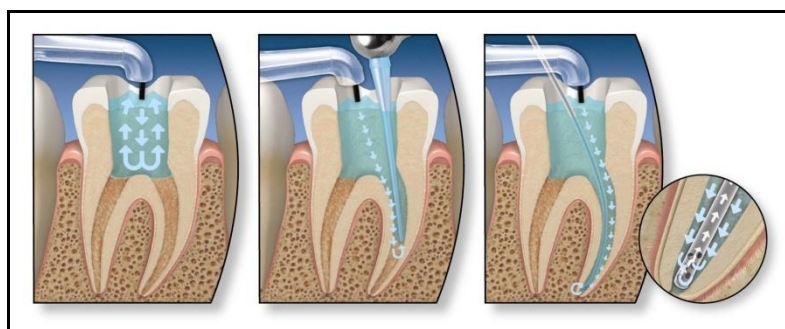


Figura1.20. Técnica de irrigación por presión negativa apical.

Un estudio reciente mostró que el volumen de irrigante aportado por el sistema Endovac[®] era considerablemente más alto que el volumen entregado por la jeringa tradicional por presión positiva en el mismo período de tiempo (Nielsen BA, 2007).

Muchos son los autores que han utilizado el sistema de presión negativa Endovac[®] para irrigar los conductos con hipoclorito de sodio (Hockett JL, 2008; Cohenca N, 2010; Siu C, 2010; Abarajithan M, 2011;; Howard RK, 2011; Muñoz HR, 2012; Cohenca N, 2015).

Según algunos autores, con el uso de hipoclorito con el sistema Endovac[®] en una cita (Cohenca N, 2010; Pawar R, 2012), la reducción bacteriana es similar a irrigar de manera convencional con presión positiva mas el uso de antibióticos en dos citas (Siu C, 2010; Abarajithan M, 2011).

Y la extrusión de detritus al periápice es menor que usando otros sistemas (Tambe VH, 2013; Da Silva LA, 2010; Desai P, 2009; Mitchell RP, 2011).

El sistema por presión negativa, además de evitar el atrapamiento de aire en el tercio apical (*vapor lock*), tiene la ventaja de su gran seguridad, ya que puedes llevar el irrigante a longitud de trabajo sin riesgo de extruir el irrigante al periápice en dientes con los ápices abiertos (Nielsen BA, 2007).

Desai, en un estudio en el que analizaron la extrusión de diversos mecanismos de agitación del irrigante, reportaron que el Endovac[®] era el mecanismo junto con el EndoActivator[®] que producía menos extrusión de irrigante comparado con la irrigación ultrasónica y la irrigación con jeringa convencional (Desai P, 2009).

2 OBJETIVOS

La finalidad de la terapia endodóntica, es la eliminación de las bacterias del interior de los conductos radiculares, las cuales son considerados agentes etiológicos principales del estado de necrosis pulpar y de las lesiones periapicales. La mayoría de las bacterias pueden ser removidas por los procedimientos endodónticos de rutina, tales como la instrumentación e irrigación del espacio pulpar; sin embargo, en algunos casos, debido a la complejidad anatómica, la instrumentación mecánica y la irrigación, son incapaces de desinfectar completamente el sistema de conductos radiculares, por lo que se requiere la colocación de una medicación intraconducto antibacteriana antes de la obturación tridimensional.

El objetivo general de este estudio es evaluar la influencia que tienen distintos protocolos de desinfección en la revascularización pulpar en dientes permanentes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

Los dos objetivos específicos son:

1. Evaluación de la eficacia de diferentes protocolos de desinfección utilizados para la revascularización pulpar en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.
2. Evaluación radiográfica de distintos protocolos de irrigación y de diferentes matrices utilizadas para la revascularización en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica..

El protocolo de los siguientes estudios fue estudiado y aprobado por el comité ético de experimentación animal de la Universidad de Sevilla (Anexos).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Materiales y métodos de: Evaluación de la eficacia de diferentes protocolos de desinfección utilizados para la revascularización pulpar en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

En este estudio se seleccionaron 40 dientes birradiculares de 5 perros de raza Beagle de aproximadamente 5 meses de edad y 11 kgr de peso para comparar la eficacia de 3 protocolos de desinfección de los conductos radiculares en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica; de los cuales, 5 dientes se usaron como control negativo (no infectados sin tratamiento posterior); 5 dientes como control positivo (infectados y sin tratamiento posterior), y 30 dientes experimentales fueron aleatoriamente asignados a 3 grupos, cada uno con 10 dientes y un protocolo de desinfección diferente.

Antes de iniciar el estudio se realizaron radiografías (Kodak RVG 6100 Digital[®] Radiography System, Carestream Health, Inc. Rochester, NY, USA) para confirmar la formación incompleta de las raíces y los ápices abiertos utilizando anillos paralelizadores (Dentsply Rinn[®], Elgin, IL, USA). (**Figura 3.1.1 y 3.1.2**)

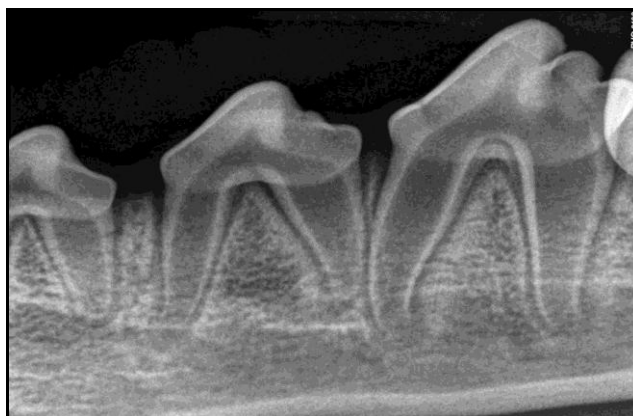


Figura 3.1.1. Radiografía de premolares inmaduros de un perro.

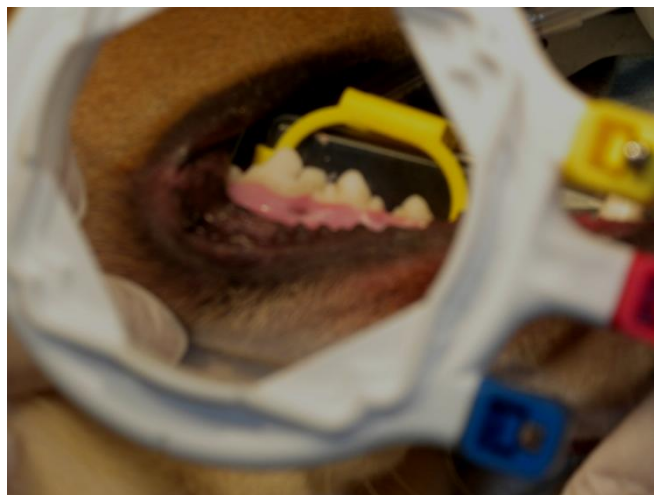


Figura 3.1.2. Anillo paralelizador Dentsply Rinn®.

Los perros fueron preanestesiados con una inyección intravenosa de pentotal (Zoletil 100, 0,1 mL/Kg body wt; Virbac España, S.A.) y mantenidos con anestesia inhalatoria con isoflurano (Isoflo, Abbot Laboratories Ltd., Berkshire, UK), durante las sesiones. Los perros fueron anestesiados localmente durante los procedimientos con lidocaína (Lidocaína hiperbárica Braun 5%, B. Braun Medical S.A., Barcelona, España) para evitar un posible sufrimiento en el animal.

Durante la primera sesión, el objetivo fue contaminar el sistema de conductos; para ello, se siguió el protocolo descrito por Leonardo realizando un acceso coronario con una fresa redonda estéril del #12 de diamante con refrigeración a alta velocidad. A continuación, se desestructuró la pulpa con limas hédstrom del #20 (Colorinox®, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) y se dejó el acceso coronario expuesto a la cavidad bucal durante 1 semana, para permitir la contaminación bacteriana (Leonardo MR, 1993).

Después de una semana, se cerraron las cavidades de acceso con Cavit® (ESPE, Norristown, PA, USA) sin ningún tratamiento intraconducto con la finalidad de que se desarrollase la periodontitis apical, que se originó entre los 15 y 25 días siguientes. **(Figura 3.1.3)**



Figura 3.1.3. Cierre de cavidad de acceso provisional para el desarrollo de la periodontitis apical.

En la tercera sesión, los perros fueron radiografiados (RVG Kodak 6100) para confirmar la formación de lesiones radiolúcidas apicales (**Figura 3.1.4**) y la presencia de fístula en algunos casos (**Figura 3.1.5**), signos de la periodontitis apical crónica.

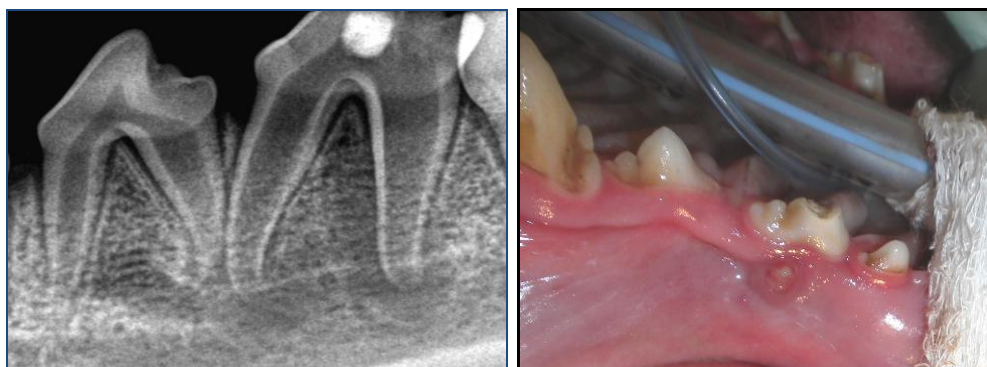


Figura 3.1.4. Lesión radiolúcida perirradicular **Figura 3.1.5.** Fístula signode una periodontitis apical.

Posteriormente, los 30 dientes experimentales fueron asignados aleatoriamente a 3 grupos de 10 dientes cada uno con un protocolo de desinfección diferente; 5 dientes fueron asignados al grupo control positivo (dientes infectados sin tratamiento) y 5 dientes al grupo control negativo (dientes sanos sin tratamiento).

Los dientes fueron aislados con dique de goma y el campo operatorio fue desinfectado con una torunda de algodón impregnado en peróxido de hidrógeno al 30% y con solución yodada. (**Figura 3.1.6**)

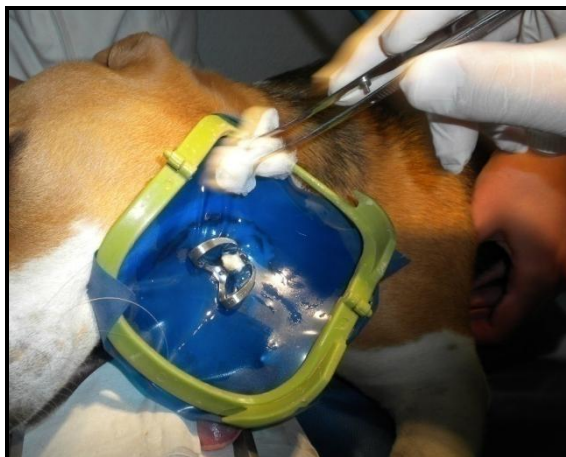


Figura 3.1.6. Aislamiento absoluto del campo operatorio.

A continuación, se realizaron las aperturas camerales con una fresa redonda estéril del #12 y se tomaron las muestras S_1 (dientes contaminados). Para ello, se introdujeron 1ml de líquido de muestra Agar anaerobio Schaedler con hemina y vitamina k1 (Oxoid TV5008D, Oxoid Ltd.,U.K.) en los conductos usando una jeringa de insulina; posteriormente, se agitó el líquido de muestra con una lima K-file del #20 a 1mm de la longitud de trabajo (Colorinox[®].Dentsply Maillefer. Ballaigues, Switzerland).

Después, se impregnó una punta de papel estéril (Protaper F2[®], Dentsply Maillefer. Ballaigues, Switzerland) en el líquido de muestra y se introdujo en un tubo de ensayo para inmediatamente mandarlo al laboratorio para sus análisis (Laboratorio Garfia S.L., Córdoba. España). (**Figura 3.1.7**)

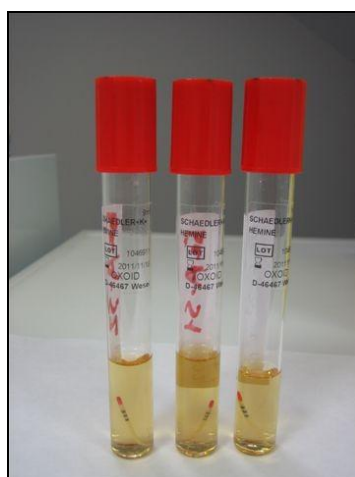


Figura 3.1.7. Tubos con muestras para analizar en el laboratorio.

Después, se lavaron los conductos con 10 ml de suero fisiológico para eliminar el líquido de muestra. A continuación, la longitud de trabajo fue

establecida a 1mm menos del ápice radiográfico y los dientes de cada grupo fueron desinfectados siguiendo los siguientes protocolos: **(Figura 3.1.8)**



Figura 3.1.8. Esquema de los diferentes protocolos de desinfección empleados.

Grupo 1: Hipoclorito 5,25% + solución Q-mix®.

Los dientes, se irrigaron con 40 ml de hipoclorito de sodio al 5,25% usando el sistema de presión negativa Endovac® (Discus Dental, Culver City, CA), dejando el hipoclorito actuar durante 60 segundos. **(Figura 3.1.9)**



Figura 3.1.9. Desinfección con el sistema de presión negativa Endovac®

Para ello fue necesario realizar una modificación en la punta de la macrocánula para adaptarla al diámetro apical de los conductos para evitar la extrusión del hipoclorito de sodio a los tejidos periapicales.

El hipoclorito de sodio se inactivó con 2 ml de tiosulfato de sodio al 5% (Sigma-Aldrich Química SA. Madrid. España) para eliminar el efecto residual de éste y después se irrigaron los conductos con 10 ml de suero fisiológico. Posteriormente, los conductos fueron desinfectados con 1 ml de solución Q-mix® (Dentply/Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA) usando una jeringa de

insulina, dejándolo actuar durante 90 segundos. Se eliminó la solución Q-mix[®] de los conductos con 10ml de suero fisiológico y se secaron con puntas de papel Protaper F2[®]. Posteriormente, se llenaron los conductos con 1ml de líquido de muestra usando una jeringa de insulina y se agitó con una lima del #20.

Se impregnó una punta de papel estéril Protaper F2[®] en el líquido de muestra y se tomó la muestra S₂ (conducto desinfectado). Todas las muestras fueron inmediatamente llevadas al laboratorio para analizarlas.

Por último, los conductos se irrigaron con suero fisiológico para eliminar el líquido de muestra y se secaron con puntas de papel. Se introdujo una bolita de algodón en el acceso cameral y se colocó una obturación provisional de IRM[®] (Caulk Co, Division Dentsply International Inc. Milford. DE, USA) y cemento de vidrio ionómero Vitrebond[®] (3M/ESPE, St. Paul. MN. USA).

Grupo 2: Hipoclorito 5,25%+ solución Q-mix[®] + gel de clorhexidina 2%.

Los dientes del grupo 2, se trataron en dos citas. En la primera cita, los conductos fueron irrigados con un volumen de 40 ml de hipoclorito de sodio al 5,25% con el sistema de presión negativa Endovac[®] (Endovac; Discus Dental, Culver City, CA). Después se irrigaron los conductos con 2 ml de tiosulfato de sodio al 5% y 10 ml de suero fisiológico. A continuación, se introdujo en los conductos 1 ml de solución Q-mix[®] con una jeringa de insulina dejándolo actuar durante 90 segundos. Se irrigaron los conductos con 10 ml de suero fisiológico y se introdujo el líquido de muestra. Esto constituyó la muestra S₂.

Después se irrigaron los conductos con 10 ml de suero fisiológico para eliminar el líquido de muestra y se secaron con puntas de papel para, posteriormente colocar gel de clorhexidina al 2% (Concepsis[®], Ultradent Products Inc. South Jordan. UT. USA) como medicación intraconducto utilizando un léntulo #4 (Dentsply Maillefer. Ballaigues. Switzerland). Se dejó una bolita de algodón en la cámara pulpar, y se colocó Cavit[®] (3M ESPE, Seefeld, Germany) y Vitrebond[®] como obturación provisional, dejando actuar la medicación intraconducto durante 15 días. **(Figura 3.1.10)**



Figura 3.1.10. Medicación intraconducto con gel de clorhexidina.

En la segunda cita, se retiró el sellado coronal y se eliminó la bolita de algodón para, a continuación, irrigar los conductos con 20 ml de suero fisiológico y eliminar la medicación intraconducto de clorhexidina. Después, se neutralizó la clorhexidina con 2,5 ml de solución Tween 80 al 3% (P4780 Sigma-Aldrich Química SA, Madrid. España) y 0,3 % de solución L- α -lecithin para eliminar el efecto residual de la clorhexidina.

A continuación, se irrigaron los conductos con suero fisiológico para eliminar la solución Tween 80 y se introdujo 1 ml de líquido de muestra en los conductos constituyendo la muestra S₃.

Por último, los conductos se irrigaron con suero fisiológico para eliminar el líquido de muestra y se secaron con puntas de papel. Se introdujo una bolita de algodón en la cámara de acceso y se colocó una obturación provisional con IRM[®] y Vitrebond[®].

Grupo 3: Hipoclorito 5,25%+ pasta triantibiótica.

Los dientes del grupo 3, fueron desinfectados en dos citas. En la primera cita, los conductos se irrigaron con 40 ml de hipoclorito de sodio al 5,25% usando el sistema de irrigación por presión negativa Endovac[®]. Posteriormente, se irrigó con 2 ml de tiosulfato de sodio al 5% y se irrigó con 10 ml de suero fisiológico. Se introdujo el líquido de muestra en los conductos. Después se impregnó una punta de papel estéril en el líquido de muestra y se introdujo en un tubo de muestra constituyendo la muestra S₂. A continuación, se irrigaron los conductos con 10 ml de suero fisiológico, para eliminar el líquido de muestra y se rellenaron con una pasta antibiótica preparada en el momento del

uso, compuesta por ciprofloxacino, metronidazol y minociclina a una concentración de 20 mgr por ml de agua destilada de cada uno. La pasta antibiótica fue introducida en los conductos con un léntulo #4. Se colocó una obturación provisional de Cavit® y Vitrebond® con una bolita de algodón en la cámara pulpar, dejando actuar la medicación intraconducto durante 15 días. A las dos semanas, se retiraron las obturaciones provisionales y con la finalidad de eliminar los restos de pasta antibiótica del conducto, se irrigaron con 20 ml de suero fisiológico.

A continuación, se rellenaron los conductos con 1ml de líquido de muestra. Se agitó el líquido de muestra con una lima del #20 K-file®, se impregnó una punta de papel estéril y se introdujo en un tubo de muestra constituyendo la muestra S₃. Por último, los conductos se irrigaron con suero fisiológico para eliminar el líquido de muestra y se secaron con puntas de papel. Se introdujo una bolita de algodón en la cámara de acceso y se selló provisionalmente con IRM® y Vitrebond®.

A los perros se les suministraron analgésicos para evitar el dolor postoperatorio (Turbogesic 0,2 mgr/Kg Butorphanol Tartrate, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge IA). Diariamente los perros fueron observados para controlar los signos y síntomas asociados a los procedimientos operatorios.

3.2 Materiales y métodos de: Evaluación radiográfica de distintos protocolos de irrigación y de diferentes matrices utilizadas para la revascularización en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

En este trabajo se seleccionaron 40 dientes inmaduros de 4 perros de raza Beagle para evaluar la influencia que tienen distintos protocolos de desinfección (irrigación en una cita con hipoclorito usando presión negativa apical *versus* medicación en dos citas con pasta triantibiótica) y diferentes matrices (coágulo sanguíneo *versus* plasma rico en plaquetas) en la revascularización pulpar de dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

Para confirmar la formación incompleta de las raíces y los ápices abiertos, se hicieron radiografías de todos los dientes.

Una vez anestesiados los perros, el objetivo de la primera sesión, fue contaminar los dientes inmaduros dejando el acceso coronario expuesto a la cavidad oral durante una semana. **(Figura 3.2.1)**



Figura 3.2.1. Acceso coronario.

En la segunda sesión, se cerraron las cavidades de acceso con Cavit[®] durante 15 días sin ningún tratamiento intraconducto, con la finalidad de que se desarrollase la periodontitis apical. En la tercera sesión, se confirmó la formación de lesiones radiolúcidas radiculares mediante radiografías.

Posteriormente, los 32 dientes experimentales fueron asignados aleatoriamente a 4 grupos de 8 dientes cada uno con un protocolo de desinfección e inducción de la revascularización diferente; 4 dientes fueron asignados al grupo control positivo (dientes infectados sin tratamiento) y 4 dientes al grupo control negativo (dientes sanos sin tratamiento), según el siguiente esquema. **(Figura 3.2.2)**

Grupo A1: Hipoclorito de sodio al 1,25% + coágulo.

Grupo A2: Hipoclorito de sodio al 1,25% + plasma rico en plaquetas (PRP).

Grupo B1: Hipoclorito de sodio al 1,25% + pasta antibiótica + coágulo.

Grupo B2: Hipoclorito de sodio al 1,25% + pasta antibiótica + PRP.



Figura 3.2.2. Esquema de los diferentes protocolos de irrigación y matrices utilizadas en la revascularización.

En condiciones de asepsia, se realizaron los accesos camerales y la longitud de trabajo fue tomada a 1mm del ápice radiográfico. (**Figura 3.2.3 y 3.2.4**)



Figura 3.2.4. Estimación de la longitud de trabajo.

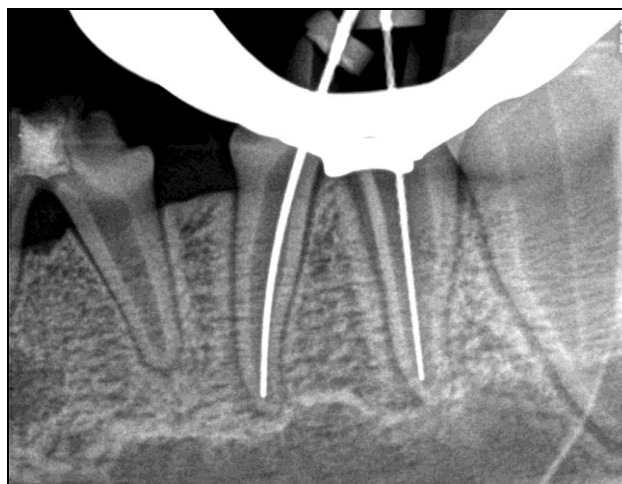


Figura 3.2.4. Estimación de la longitud de trabajo.

Después los dientes de cada grupo fueron desinfectados e inducidos para la regeneración pulpar siguiendo 4 protocolos diferentes:

Grupo A1: Hipoclorito 1,25% + coágulo.

En este grupo, los dientes se desinfectaron con 20 ml de hipoclorito de sodio al 1,25% durante 3 minutos usando el sistema de irrigación por presión negativa.

A continuación, los conductos fueron irrigados con 10 ml de solución salina estéril y secados con puntas de papel. Después, se hizo un lavado final con 1 ml de EDTA solución 17% (Ultradent Products Inc., South Jordan, Utah, USA) en cada conducto, dejándolo actuar durante 60 segundos.

Para inducir el sangrado, se traspasaron los ápices con una lima tipo K estéril de calibre #30 (Colorinox[®]. Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) y se esperó durante 10 minutos para que se formara el coágulo sanguíneo. Éste fue colocado a nivel de la unión amelocementaria usando una bolita de algodón humedecida en solución salina. **(Figura 3.2.5)**

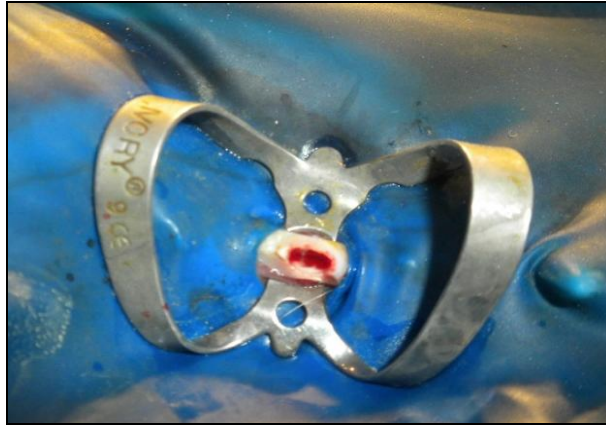


Figura 3.2.5. Estimulación del sangrado.

Sobre el coágulo se colocó una membrana de colágeno (Collacote[®] Integra LifeSciences Corporation, Plainsboro, NJ, USA) y sobre ésta se colocó un tapón de MTA Proroot[®] (Dentsply/Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA) usando una jeringa transportadora de MTA (Hartzelland Son, CA. USA) para sellar el tercio cervical del conducto radicular. Sobre el tapón de MTA[®], se colocó una bolita húmeda de algodón, IRM[®] y Vitrebond[®] para garantizar el sellado coronal.

Grupo A2: Hipoclorito 1,25%+ PRP.

En este grupo se siguió el mismo protocolo de desinfección que el grupo A₁. Se utilizó plasma rico en plaquetas en lugar del coágulo sanguíneo como matriz. El PRP fue obtenido siguiendo el protocolo descrito por Anitua (Anitua E, 1999). (Figura 3.2.6 y 3.2.7)



Figura 3.2.6. Extracción de sangre y obtención del PRP.



Figura 3.2.7. Obtención del plasma rico en plaquetas.

El PRP fue condensado dentro del conducto radicular hasta la unión amelocementaria usando un atacador plugger (Dentsply Maillefer.USA).

Sobre el PRP se colocó una membrana de colágeno y sobre ésta, un tapón de 3mm de MTA[®]. Sobre el MTA[®] se colocó una bolita de algodón húmeda y se realizó el sellado coronal con IRM[®] y Vitrebond[®].

Grupo B1: Hipoclorito 1,25% + pasta triantibiótica + coágulo.

Los dientes de este grupo fueron desinfectados en dos sesiones. En la primera, los conductos se irrigaron con 20 ml de hipoclorito de sodio al 1,25% usando el sistema Endovac[®] durante 3 minutos, como se ha descrito anteriormente.

A continuación, se irrigaron los conductos con 10 ml de suero fisiológico, se secaron con puntas de papel estériles, y se rellenaron con una pasta triantibiótica preparada en el momento del uso compuesta por ciprofloxacino, metronidazol y cefalosporina (cefixima) a una concentración de 20 mg por ml de agua destilada de cada uno.

La pasta antibiótica fue introducida en los conductos con un léntulo #40 (Maillefer, Ballaigues, Switzerland) tal como sugiere Windley (Windley W, 2005).

Se limpiaron los excesos de la pasta de la zona cameral y se colocó una bolita de algodón en la cámara pulpar y una doble obturación provisional con Cavit[®] y Vitrebond[®], dejando actuar la medicación intraconducto durante 15 días.

A las dos semanas, se retiró la restauración provisional para, a continuación, lavar los conductos con 20 ml de suero fisiológico estéril para eliminar los restos de pasta antibiótica del interior del conducto. Posteriormente se realizó una irrigación final con 1ml de EDTA al 17% durante 60 segundos.

A continuación, los conductos se secaron con puntas de papel estériles y se indujo el sangrado y la formación del coágulo tal y como fue descrito para el grupo A1, y se realizó el mismo sellado coronario.

Grupo B2: Hipoclorito 1,25% + pasta triantibiótica + PRP.

Los dientes de este grupo también fueron desinfectados en dos sesiones con pasta triantibiótica, tal y como fue descrito en el grupo B1. En este grupo, el PRP fue utilizado como matriz en lugar del coágulo sanguíneo siguiendo el mismo protocolo que en el grupo A2 y el sellado coronal se hizo con MTA[®], IRM[®] y Vitrebond[®].

Al finalizar cada tratamiento experimental se hicieron radiografías postoperatorias, y a los animales se les suministraron analgésicos para evitar sufrimiento en los animales

Todos los dientes fueron controlados radiográficamente cada 30 días hasta 6 meses. Posteriormente, los animales fueron sacrificados mediante una dosis letal de pentobarbital Socumb[®] (Butler Company, Columbus, OH, USA).

4 RESULTADOS

4.1 Resultados de: Evaluación de la eficacia de diferentes protocolos de desinfección utilizados para la revascularización pulpar en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

En el estudio se perdieron 4 dientes por problemas periodontales (2 dientes del grupo 2; y 2 dientes del grupo 3) reduciendo el tamaño de la muestra a 8 dientes en cada grupo.

Las muestras S_1 , S_2 y S_3 se diluyeron en 4 concentraciones: 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10.000 obteniendo un total de 400 cultivos.

A continuación, 1 ml de cada solución fueron cultivadas en Agar anaerobio Schaedler con hemina y vitamina k_1 (Anaerogen Compact, Oxoid AN0010, Oxoid Ltd. UK) para el crecimiento de bacterias anaerobias. **(Figura 4.1.1)**

Los cultivos fueron incubados a 37°C durante 10 días. **(Figura 4.1.2)**

Después del período de incubación, el número de colonias formadas fue contabilizado con un contador de colonias (IUL Colony Counter . IUL S.A. Barcelona. España).



Figura 4.1.1 Agar anaerobio Schaedler (con hemina y vitamina k_1)



Figura 4.1.2. Cultivo bacteriano.

Se realizó el análisis estadístico con el test no paramétrico de U-Mann-Whitney y se encontraron microorganismos presentes en el 100% de los casos en S₁ en los 3 grupos. (Tabla 4.1.1)

Muestras	Grupo 1			Grupo 2			Grupo 3		
	Media	Q1-Q3	Min-Max	Media	Q1-Q3	Min-Max	Media	Q1-Q3	Min-Max
S ₁	28880	311-5400	27-270000	22860	9117-94050	1188-3456000	25200	340-3456000	9-3456000
S ₂	0	0-0	0-0	0	0-0	0-0	0	0-5	0-99
S ₃	–	–	–	891	340-7785	0-18360	18	9-23	0-1908

Tabla 4.1.1. Recuento bacteriano. (Q1- primer cuartil; Q3- tercer cuartil) S1:diente infectado; S2:después de la desinfección; S3:después de la medicación intraconducto

Se contabilizaron de 27 a 270.000 UFC (unidad formadora de colonias) (media 2.880) en el grupo 1; de 1188 a 3456.000 UFC (media 22.860) en el grupo 2; de 9 a 3456 UFC (25.200) en el grupo 3, no encontrando diferencias significativas entre los 3 grupos ($p \geq 0,05$).

Después de la primera sesión de desinfección hubo reducción bacteriana de S₁ a S₂ en los 3 grupos encontrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Hubo ausencia de microorganismos en S2 en el 100% en los grupos 1 y 2; y del 75% en el grupo 3; UFC de 0 a 99 (media 0) no encontrando diferencias significativas entre los 3 grupos ($p \geq 0,05$).

Las muestras S3 tomadas después de la medicación intraconducto en los grupos 2 y 3 mostraron un incremento en el número de bacterias. En ambos grupos, el 87,5% de los dientes mostraron crecimiento bacteriano.

En el grupo 2, las UFC contabilizada (UFC de 0-18360; media 891) fueron significativamente más altas que en el grupo 3 (UFC de 0-1908; media 18), encontrando diferencias significativas en S3 entre los grupos 2 y 3 ($p=0,03$), de lo que se deduce que, si hay que colocar una medicación intraconducto es más efectivo utilizar la pasta triantibiótica que la clorhexidina.

Se encontraron diferencias significativas entre las muestras S2 de los grupos 1 y 2 y las muestras S3 de los grupos 2 y 3 ($p \leq 0,05$), lo que indica que, se consigue una mayor reducción bacteriana cuando realizamos el tratamiento en una cita que en dos citas. Hay un ligero crecimiento bacteriano cuando están los conductos durante 15 días con medicación intraconducto, y esto puede deberse a una filtración bacteriana apical y a un efecto de lavado de la medicación intraconducto debido a los ápices abiertos.

4.2 Resultados de: Evaluación radiográfica de distintos protocolos de irrigación y de diferentes matrices utilizadas para la revascularización en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

Cada examinador evaluó cada raíz sobre los tres parámetros siguientes:

- (1) presencia o ausencia de mejoría de la imagen radiolúcida periapical,
- (2) presencia o ausencia de engrosamiento de las paredes radicales, y
- (3) presencia o ausencia de cierre apical.

Un animal perdió dos dientes durante el transcurso del estudio, mientras que otro animal perdió un solo diente. La pérdida de estos dientes no causó ningún cambio en el comportamiento o hábitos de alimentación en los animales. Por otra parte, la pérdida de estos dientes no fue debida a ningún tratamiento experimental, específico, sino que fue debida al procedimiento de infección inicial que produjo una pérdida ósea que afectó a los dientes adyacentes. En la **figura 4.2.1** se muestra radiografía de un control negativo y en la **figura 4.2.2** se muestra radiografía de un control positivo.

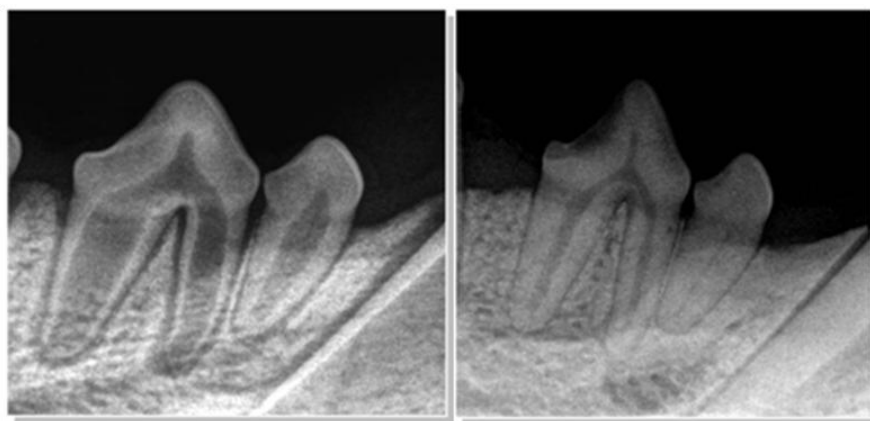


Figura 4.2.1. Control negativo (diente sano con desarrollo normal). Izquierda: preoperatoria. Derecha: postoperatoria.

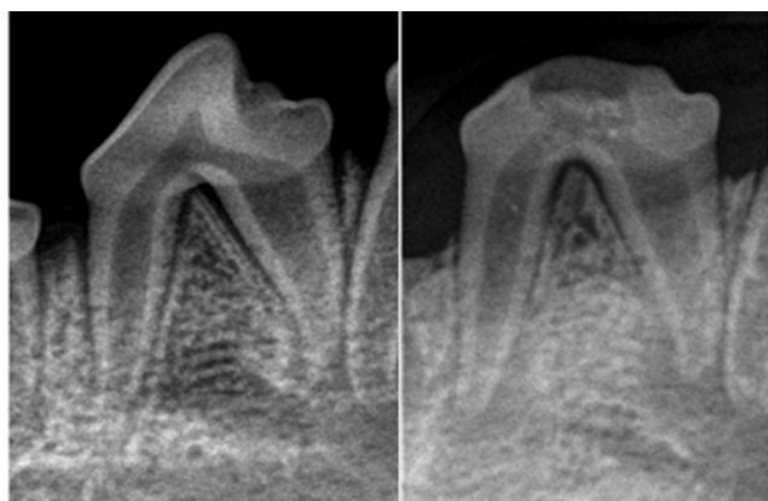


Figura 4.2.1. Control positivo (diente infectado sin tratar). Izquierda: preoperatoria. Derecha: postoperatoria.

Después de 6 meses, finalizado el tratamiento de revascularización, se observó radiográficamente la mejoría de las imágenes radiolúcidas periapicales, engrosamiento de las paredes del conducto radicular y cierre apical en la mayor parte de las raíces pertenecientes a los cuatro grupos experimentales.

a) Mejoría de las imágenes apicales.

La prueba de Chi-cuadrado de los cuatro grupos experimentales sobre la presencia o ausencia de mejoría de las imágenes radiolúcidas periapicales, mostró una diferencia significativa entre los grupos ($p= 0,014$). **(Tabla 4.2.1)**

Pruebas de chi-cuadrado

	Valor	Gl	Sig. Asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,667 ^a	3	,014
Razón de verosimilitudes	11,278	3	,010
Asociación lineal por lineal	10,290	1	,001
N de casos válidos	64		

Tabla 4.2.1. Pruebas de χ^2 sobre mejoría de imágenes radiolúcidas periapicales.

En general, el 62,5% de las raíces de los cuatro grupos experimentales presentaba evidencia radiográfica de mejoría de las imágenes radiolúcidas previas. (Tabla 4.2.2)

Tabla de contingencia grupo * Mejora imagen periapical

		Mejora imagen periapical		Total	
		AUSENCIA	PRESENCIA		
Grupo	A1	Recuento	10	6	16
		% dentro de grupo	62,5%	37,5%	100,0%
		% dentro de Mejora imagen periapical	41,7%	15,0%	25,0%
		% del total	15,6%	9,4%	25,0%
		Residuos corregidos	2,4	-2,4	
	A2	Recuento	8	8	16
		% dentro de grupo	50,0%	50,0%	100,0%
		% dentro de Mejora imagen periapical	33,3%	20,0%	25,0%
		% del total	12,5%	12,5%	25,0%
		Residuos corregidos	1,2	-1,2	
	B1	Recuento	4	12	16
		% dentro de grupo	25,0%	75,0%	100,0%
		% dentro de Mejora imagen periapical	16,7%	30,0%	25,0%
		% del total	6,2%	18,8%	25,0%
		Residuos corregidos	-1,2	1,2	
	B2	Recuento	2	14	16
	% dentro de grupo	12,5%	87,5%	100,0%	
	% dentro de Mejora imagen periapical	8,3%	35,0%	25,0%	
	% del total	3,1%	21,9%	25,0%	
	Residuos corregidos	-2,4	2,4		

Total	Recuento	24	40	64
	% dentro de grupo	37,5%	62,5%	100,0%
	% dentro de Mejora imagen periapical	100,0%	100,0%	100,0%
	% del total	37,5%	62,5%	100,0%

Tabla 4.2.2. Resultados de mejoría de imágenes radiolúcidas periapicales.

El grupo A1 (infectados-desinfectados con hipoclorito+ coágulo) mostró un 9,4%; el grupo A2 (infectados-desinfectados con hipoclorito+PRP) un 12,5%; el grupo B1 (infectados-desinfectados con hipoclorito y pasta triantibiótica+ coágulo) un 18,8%; y el grupo B1 (infectados-desinfectados con hipoclorito y pasta triantibiótica + PRP) un 21,9% del total de las raíces con mejoría de las imágenes radiolúcidas periapicales juzgada radiográficamente.

En los grupos B1 y B2 (que incluyen ambos la desinfección con pasta triantibiótica), más del 75% de las raíces tratadas mostró evidencia radiográfica de mejoría de las imágenes radiolúcidas periapicales.

El grupo B2 fue el que mostró los mejores resultados, ya que el 87,5% de las raíces tratadas presentaba mejoría de las imágenes radiolúcidas periapicales. (Figura 4.2.3)

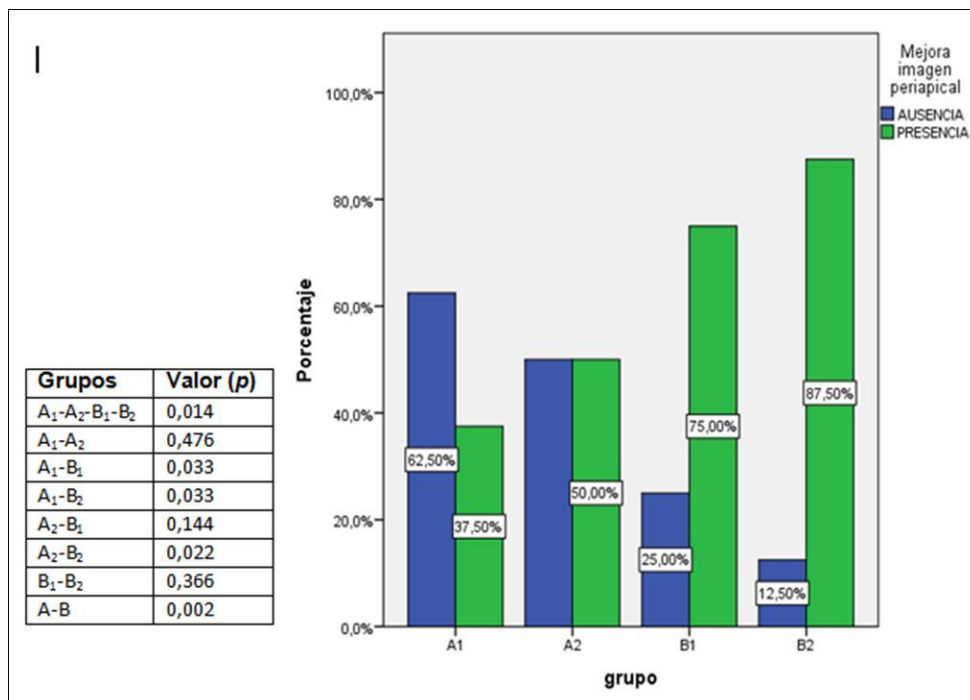


Figura 4.2.3. Porcentaje de presencia y ausencia de mejoría de imágenes radiolúcidas periapicales (valor de la p calculado con Chi-cuadrado y test Anova).

b) Engrosamiento de las paredes.

La prueba de Chi-cuadrado de los cuatro grupos experimentales sobre la presencia o ausencia de engrosamiento de las paredes radicales, mostró una diferencia significativa entre los grupos ($p= 0,013$). (**Tabla 4.2.3**)

	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	10,792 ^a	3	,013
Razón de verosimilitudes	11,895	3	,008
Asociación lineal por lineal	8,351	1	,004
N de casos válidos	64		

Tabla 4.2.3. Pruebas de χ^2 sobre engrosamiento de las paredes radicales.

Cuando todos los grupos experimentales fueron comparados individualmente entre sí mediante los residuos estandarizados para el engrosamiento de las paredes radicales, hubo una diferencia marginal entre el grupo B1 (pasta triantibiótica + coágulo) y el grupo B2 (pasta triantibiótica + PRP) mostrando más engrosamiento de las paredes de dentina en el grupo B2.

En general, hubo un 53,1% de las raíces de los cuatro grupos experimentales con evidencia radiográfica de engrosamiento de las paredes de la dentina radicular. (**Tabla 4.2.4**)

		Engrosamiento radicular		Total	
		AUSENCIA	PRESENCIA		
grupo	A1	Recuento	10	6	16
		% dentro de grupo	62,5%	37,5%	100,0%
		% dentro de Engrosamiento radicular	33,3%	17,6%	25,0%
		% del total	15,6%	9,4%	25,0%
	Residuos corregidos		1,4	-1,4	
	A2	Recuento	10	6	16
		% dentro de grupo	62,5%	37,5%	100,0%
		% dentro de Engrosamiento radicular	33,3%	17,6%	25,0%
		% del total	15,6%	9,4%	25,0%
	Residuos corregidos		1,4	-1,4	
	B1	Recuento	8	8	16
		% dentro de grupo	50,0%	50,0%	100,0%

	% dentro de Engrosamiento radicular	26,7%	23,5%	25,0%
	% del total	12,5%	12,5%	25,0%
	Residuos corregidos	,3	-,3	
	Recuento	2	14	16
	% dentro de grupo	12,5%	87,5%	100,0%
B2	% dentro de Engrosamiento radicular	6,7%	41,2%	25,0%
	% del total	3,1%	21,9%	25,0%
	Residuos corregidos	-3,2	3,2	
	Recuento	30	34	64
	% dentro de grupo	46,9%	53,1%	100,0%
Total	% dentro de Engrosamiento radicular	100,0%	100,0%	100,0%
	% del total	46,9%	53,1%	100,0%

Tabla 4.2.4. Resultados de engrosamiento de las paredes radiculares.

El grupo A1 (infectados-desinfectados con hipoclorito+ coágulo) mostró un 9,4%; el grupo A2 (infectados-desinfectados con hipoclorito+ PRP) un 9,4%; el grupo B1 (infectados-desinfectados con hipoclorito y pasta triantibiótica+ coágulo) un 12,5%; y el grupo B2 (infectados-desinfectados con hipoclorito y pasta triantibiótica+ PRP) un 21,9% del total de las raíces con un engrosamiento de las paredes de dentina radicular juzgado radiográficamente.

El grupo B2 fue el que mostró los mejores resultados, ya que el 87,5% de las raíces tratadas presentaba mayor engrosamiento de las paredes radiculares. **(Figura 4.2.4)**

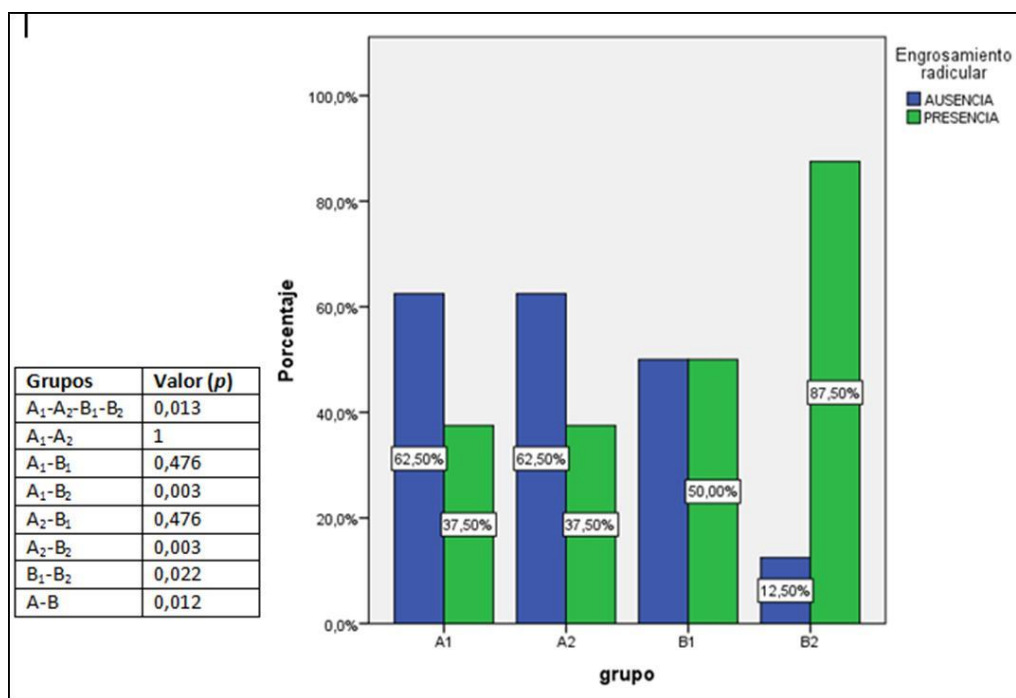


Figura 4.2.4. Porcentaje de presencia y ausencia de engrosamiento de las paredes radiculares (valor de la p calculado con Chi-cuadrado y test Anova).

c) Cierre apical radiográfico.

La prueba de Chi-cuadrado de los cuatro grupos experimentales sobre la presencia o ausencia de cierre apical radiográfico, mostró una diferencia significativa entre los grupos ($p= 0,011$). (Tabla 4.2.5)

Pruebas de chi-cuadrado			
	Valor	Gl	Sig. asintótica (bilateral)
Chi-cuadrado de Pearson	11,175 ^a	3	,011
Razón de verosimilitudes	11,555	3	,009
Asociación lineal por lineal	9,800	1	,002
N de casos válidos	64		

Tabla 4.2.5. Pruebas de χ^2 sobre cierre apical radiográfico.

Cuando todos los grupos experimentales fueron comparados entre sí para el cierre apical radiográfico, hubo una diferencia marginal entre el grupo B1 (hipoclorito y pasta triantibiótica + coágulo) y el grupo B2 (hipoclorito y pasta triantibiótica + PRP).; mostrando más cierre apical en el grupo B2.

En general, el 43,8% de las raíces de los cuatro grupos experimentales mostraron evidencia radiográfica de cierre apical. (Tabla 4.2.6)

Tabla de contingencia grupo * Cierre apical				
		Cierre apical		Total
		AUSENCIA	PRESENCIA	
grupo	Recuento	12	4	16
	% dentro de grupo	75,0%	25,0%	100,0%
	A1 % dentro de Cierre apical	33,3%	14,3%	25,0%
	% del total	18,8%	6,2%	25,0%
	Residuos corregidos	1,7	-1,7	
	Recuento	12	4	16
	% dentro de grupo	75,0%	25,0%	100,0%
	A2 % dentro de Cierre apical	33,3%	14,3%	25,0%
	% del total	18,8%	6,2%	25,0%
	Residuos corregidos	1,7	-1,7	
	Recuento	8	8	16
	% dentro de grupo	50,0%	50,0%	100,0%
	B1 % dentro de Cierre apical	22,2%	28,6%	25,0%
	% del total	12,5%	12,5%	25,0%
	Residuos corregidos	-,6	,6	
	Recuento	4	12	16
% dentro de grupo	25,0%	75,0%	100,0%	
B2 % dentro de Cierre apical	11,1%	42,9%	25,0%	
% del total	6,2%	18,8%	25,0%	
Residuos corregidos	-2,9	2,9		
Recuento	36	28	64	
% dentro de grupo	56,2%	43,8%	100,0%	
Total % dentro de Cierre apical	100,0%	100,0%	100,0%	
% del total	56,2%	43,8%	100,0%	

Tabla 4.2.6. Resultados sobre cierre apical radiográfico.

El grupo A1 (infectados-desinfectados con hipoclorito+ coágulo) mostró un 6,2%; el grupo A2 (infectados-desinfectados con hipoclorito+ PRP) un 6,2%; el grupo B1 (infectados-desinfectados con hipoclorito y pasta triantibiótica+ coágulo) un 12,5%; y el grupo B2 (infectados-desinfectados con hipoclorito y pasta triantibiótica+PRP) un 18,8% del total de las raíces con cierre apical radiográfico.

El grupo B2 fue el que mostró los mejores resultados, ya que el 75% de las raíces tratadas presentaba cierre apical radiográfico. **(Figura 4.2.5)**

En la **figura 4.2.6** se muestra radiografías del grupo A1; en la **figura 4.2.7** radiografías del grupo A2; en la **figura 4.2.8** radiografías del grupo B1 y en la **figura 4.2.9** radiografías del grupo B2.

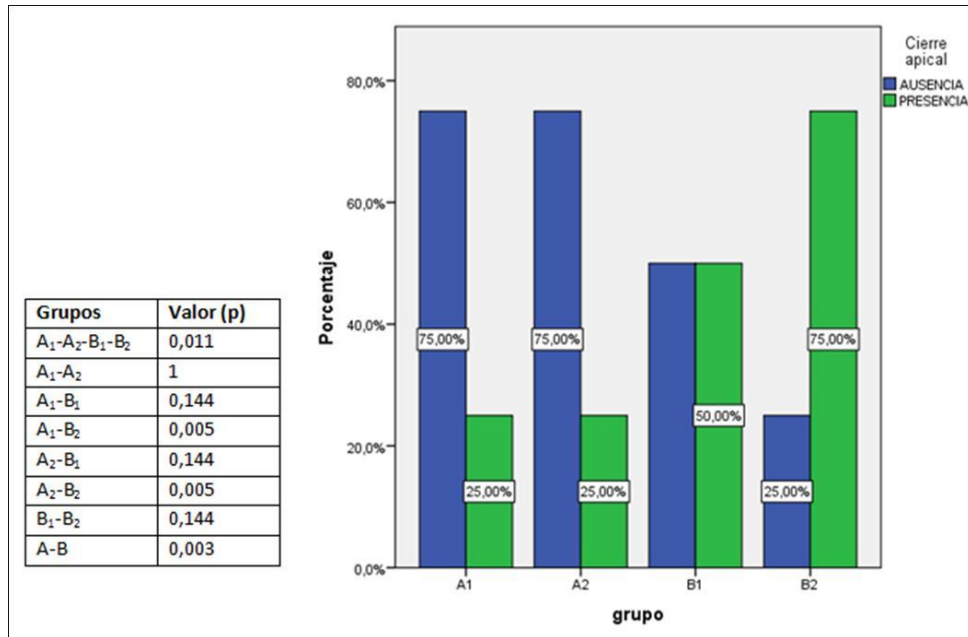


Figura 4.2.5. Porcentaje de presencia y ausencia de cierre apical radiográfico (valor de la p calculada con Chi-cuadrado y test de Anova).

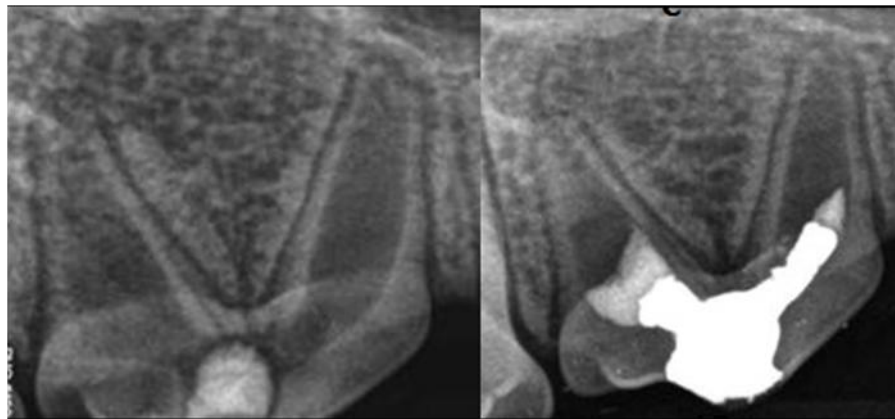


Figura 4.2.6. Imágenes radiográficas del grupo A1. Izquierda: preoperatoria. Derecha: postoperatoria.

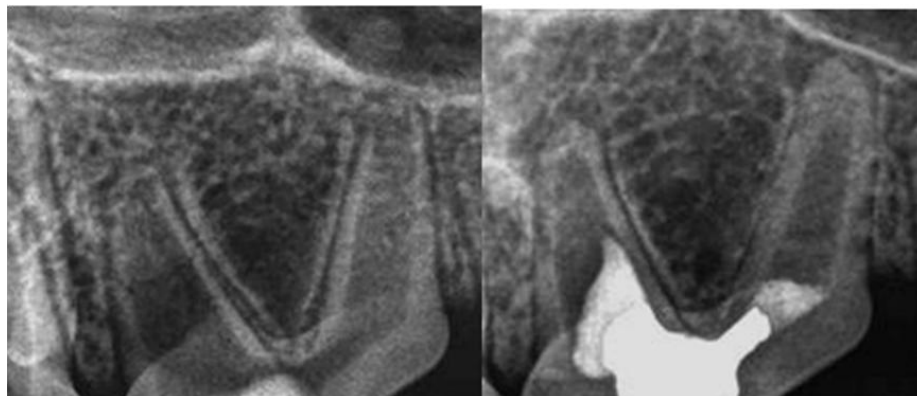


Figura 4.2.7. Imágenes radiográficas del grupo A2. Izquierda: preoperatoria. Derecha: postoperatoria.

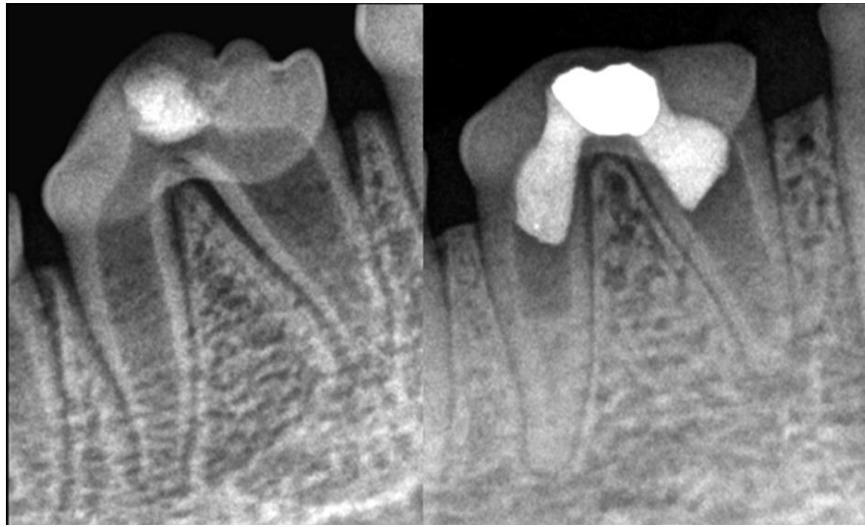


Figura 4.2.8. Imágenes radiográficas del grupo B1. Izquierda: preoperatoria. Derecha: postoperatoria.



Figura 4.2.9. Imágenes radiográficas del grupo B2. Izquierda: preoperatoria. Derecha: postoperatoria.

5 DISCUSIÓN

Aunque los tratamientos de apexificación con hidróxido de calcio o con MTA para crear una barrera artificial han demostrado tener buenos resultados, los efectos a largo plazo, los dientes quedan con delgadas paredes de dentina que podrían dejar el diente débil y aumentar así el riesgo de una fractura posterior (Witherspoon DE, 2008; Shabahang S, 2013).

Según Banchs y Trope, la revascularización del tejido pulpar en un diente inmaduro necrótico y con periodontitis apical se ha considerado a priori como un hecho imposible (Banchs F, 2004).

Sin embargo, se ha comprobado en los últimos años que el tratamiento de revascularización permite aumentar el pronóstico de los dientes inmaduros (García-Godoy F, 2012; Law AS, 2013), ya que permite continuar el engrosamiento de las paredes dentinarias (Torabinejad M, 2011), permite el crecimiento radicular en longitud y produce el cierre apical (Torabinejad M, 2011; Chandran V, 2014).

Jeeruptan y colaboradores aprecian un mayor aumento de la longitud de la raíz y el grosor de la raíz en dientes sometidos al tratamiento de revascularización, en comparación con el tratamiento de apexificación con hidróxido de calcio o MTA (Jeeruptan T, 2012).

En otro trabajo observan que, con el tratamiento de revascularización se produce el cierre apical total pero no un completo crecimiento en longitud y engrosamiento de las paredes de dentina (Saoud TM, 2014).

Otros autores han demostrado que el desarrollo radicular proporcionado por el tratamiento de revascularización no es superior al proporcionado por las técnicas de apexificación convencionales (Jung IY, 2011; Alobaid AS, 2014)

Para que la revascularización tenga lugar, se requiere una desinfección profusa del conducto radicular, una matriz sobre la que se crezca el nuevo tejido; y un sellado del acceso coronal (Khademi AA, 2014).

Se ha demostrado que la eliminación de microorganismos del sistema de conductos radiculares es determinante para el éxito del tratamiento de

conductos, particularmente en los casos de revascularización en dientes con pulpa necrótica y lesión periapical (Nagata JY, 2014).

Se han propuesto diferentes protocolos de desinfección e inducción de la revascularización en dientes con ápices inmaduros sin que se haya establecido definitivamente cuál de ellos obtiene mejores resultados, por lo que se necesitan más estudios para establecer un protocolo definitivo (Diogene AG, 2014; Lin LM, 2014; Bezgin T, 2015;).

Todos los protocolos incluyen la desinfección de los conductos necróticos con hipoclorito sódico al 4 – 6%, para eliminar la flora bacteriana, así como para evitar el crecimiento de bacterias resistentes. McCabe propone la desinfección en una sola cita con hipoclorito al 5% para promover la revascularización (McCabe P, 2015).

Essner demostró que si utilizamos una concentración de hipoclorito de sodio del 4% disminuye la viabilidad celular (Essner MD, 2011). Sin embargo, Trevino demostró que la irrigación con EDTA al 17% e hipoclorito al 6% fue compatible con la supervivencia de las células madre (Trevino EG, 2011).

Cohenca y colaboradores determinaron que la irrigación con hipoclorito de sodio al 2,5% usando el sistema de presión negativa apical Endovac[®] proporciona una mayor reducción bacteriana de los conductos radiculares comparada con la irrigación convencional con presión positiva mas el uso de pasta triantibiótica (Cohenca N, 2010; Abarajithan M, 2011; Howard RK, 2011; Gade VJ, 2013).

En nuestro estudio se consiguió un nivel de desinfección similar en una cita, utilizando hipoclorito de sodio al 5,25% con el sistema de presión negativa, que en dos citas usando una medicación intraconducto adicional de clorhexidina o pasta triantibiótica

Con la finalidad de eliminar la capa de barrillo dentinario de las paredes de la dentina y exponer la matriz de colágeno de la dentina para que se adhieran mejor las células madre a las paredes de dentina (Galler KM, 2011), hay autores que recomiendan una irrigación final con EDTA al 17% (Soares JA, 2010) durante 1 minuto; y otros autores que recomiendan una irrigación final con solución Q-mix[®], que contiene EDTA y clorhexidina (Haapasalo M, 2010;

Ma J, 2011; Lin Dai, 2011; Pai S, 2011), ofreciendo una eficacia superior en la eliminación de la materia inorgánica y erosionar menos la dentina que con el EDTA al 17% (Stojcic S, 2012).

Las complejidades anatómicas y las condiciones clínicas de los conductos infectados comprometen el nivel de desinfección que pueda alcanzarse, por lo cual algunos autores recomiendan la colocación de un medicamento intraconducto con actividad antimicrobiana antes de la obturación del conducto (Arnold M, 2013).

Se debe elegir un desinfectante efectivo en su acción antibacteriana pero a la vez que permita la supervivencia de las células madre.

Se ha demostrado en un estudio de revascularización que, la desinfección con hipoclorito al 6% y clorhexidina al 2% no daña las células madre (Shin SY, 2009).

Sin embargo, Trevino y colaboradores, concluyen que la sustantividad de la clorhexidina puede intervenir en la adhesión de las células madre a la matriz extracelular dentinaria (Trevino EG, 2011).

En un trabajo reciente se ha documentado que después de la irrigación con solución Q-mix[®] inducía la muerte celular de manera más lenta que cuando se utilizaba hipoclorito, por lo que se puede considerar, que el Q-mix[®] puede ser menos agresivo para los tejidos vivos que el hipoclorito (Alkahtani A, 2014).

El hidróxido de calcio ha sido utilizado en el tratamiento de revascularización como medicación temporal entre una sesión y la siguiente en dientes inmaduros con periodontitis apical ya que ayuda al desarrollo radicular (Cehreli ZC, 2011; Iwaya S, 2011; Soares Ade J, 2013).

Se ha descrito como principal inconveniente calcificaciones del conducto radicular tras el uso del hidróxido de calcio como medicación temporal (Nosrat A, 2013), que evitará la migración de tejido de generación dentro del espacio pulpar, además el alto pH de éste puede dañar las células mesenquimáticas indiferenciadas existentes (Chen MY, 2012).

La pasta triantibiótica es utilizada en tratamientos de revascularización para reducir en mayor número las bacterias del conducto (Trope M, 2010;

Nosrat A, 2012; Taneja S, 2012; Ordinola-Zapata R, 2013) para que los tejidos regenerados ocupen el espacio remanente del sistema de conductos, ya que no produce daño en las células madre(Gomez-Filho JE, 2012; Chuensombat S, 2013), y es eficaz contra el *E. faecalis* y *Porfiromonas Gingivalis* (Sabrah AH, 2013); pero hay autores que han determinado que el uso de pasta triantibiótica puede provocar reacciones alérgicas (Bhalla M, 2007) y tinciones no deseadas (Kim J, 2010; Petrino JA; 2010; Akcay M, 2014).

Para evitar las tinciones en la corona, algunos autores han sugerido sustituir la minociclina por amoxicilina (Thomson A, 2010) o por cefalosporina (Trope M, 2010).

Otro inconveniente del uso de la pasta triantibiótica es la desmineralización de la dentina radicular (Yassen GH, 2013) y la mayor dificultad de eliminarlo en comparación con el hidróxido de calcio (Berkhoff JA, 2014).

Es necesario una matriz de andamiaje sobre la que se promueva el nuevo tejido, permita la adherencia de las células madre y aporte factores de crecimiento (Aggarwal V, 2012)

Como matrices se han utilizado el coágulo sanguíneo por aportar gran cantidad de factores de crecimiento (Thibodeau B, 2009); gel de colágeno (Petrino JA, 2010; Yamauchi N, 2011); plasma rico en plaquetas (PRP) (Torabinejad M, 2011 y 2012; Jadhav G, 2012; Bezgin T, 2014; Yeom KH, 2015); y la fibrina rica en plaquetas (Shivashankar VY, 2012; Mishra N, 2013; Johns DA, 2014). Sin embargo, en otro estudio mostraron que no hay diferencias en la formación de nuevo tejido si se realiza con coágulo o PRP (Zhu X, 2012).

Khademi y colaboradores, en un trabajo realizado en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical, evaluaron radiográficamente un engrosamiento de las paredes de dentina del 40%, un cierre apical del 70% y una disminución de las lesiones radiolúcidas del 70% después de la desinfección de los conductos con hipoclorito de sodio al 5,25% y pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacino y tetraciclina) y como matriz, el coágulo sanguíneo (Khademi AA, 2014).

En nuestro estudio encontramos un engrosamiento de las paredes del conducto del 87,5%, un cierre apical del 75% y una mejoría de las lesiones radiolúcidas del 87,5% utilizando hipoclorito al 1,25% mas pasta triantibiótica (metronidazol, ciprofloxacino, cefixima) como desinfectante de los conductos radiculares y plasma rico en plaquetas como matriz.

6 CONCLUSIONES

6.1 Conclusiones de: Evaluación de la eficacia de diferentes protocolos de desinfección utilizados para la revascularización pulpar en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

Muchos han sido los protocolos de irrigación utilizados para la erradicación de bacterias de los conductos radiculares infectados.

Los resultados del presente estudio demuestran que la desinfección con 40 ml de hipoclorito de sodio a una concentración del 5,25% usando el sistema de presión negativa Endovac[®] en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica, aporta un nivel de desinfección similar que cuando se utiliza una solución adicional con Q-mix[®], medicación intraconducto con gel de clorhexidina al 2% o pasta triantibiótica; por lo que una irrigación final con solución Q-mix[®] o una segunda cita dejando medicación intraconducto podría no ser necesaria para alcanzar una desinfección eficaz de los conductos radiculares.

6.2 Conclusiones de: Evaluación radiográfica de distintos protocolos de irrigación y de diferentes matrices utilizadas para la revascularización en dientes inmaduros de perros con periodontitis apical crónica.

Los resultados de este estudio sugieren que la revascularización pulpar en dientes inmaduros con necrosis y periodontitis apical crónica es posible. Con una desinfección de los conductos radiculares a base de 20 ml de hipoclorito de sodio al 1,25% y medicación intraconducto con pasta antibiótica (metronidazol, ciprofloxacino y cefixima) y plasma rico en plaquetas usado como matriz, se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a mejoría de imágenes radiolúcidas, engrosamiento de las paredes radiculares, y cierre apical. Sin embargo, hacen falta más estudios para comprender el mecanismo de revascularización pulpar.

7 BIBLIOGRAFÍA

1. **Abarajithan M, Dham S, Velmurugan N, Valerian-Albuquerque D, Ballal S, Senthilkumar H.** Comparison of Endovac irrigation system with conventional irrigation for removal of intracanal smear layer: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:407-11.
2. **Abbott PV, Heijkoop PS, Cardaci SC, Hume WR, Heithersay GS.** An SEM study of the effects of different irrigation sequences and ultrasonics. *Int Endod J* 1991;24: 308-16.
3. **Aggarwal V, Miglani S, Singla M.** Conventional apexification and revascularization induced maturogenesis of two non-vital, immature teeth in same patient: 24 months follow up of a case. *J Conserv Dent* 2012; 15:68-72.
4. **Ahmad M, Pitt Ford TJ, Crum LA.** Ultrasonic debridement of root Canals: acoustic streaming and its possible role. *J Endod* 1987;13:490-9.
5. **Akcay M, Arslan H, Yasa B, Kavrik F, Yasa E.** Spectrometric analysis of crown discoloration induced by various antibiotic pastes used in revascularization. *J Endod* 2014;40:845-8
6. **Al-Ahmad A, Ameen H, Pelz K, Karygianni L, Wittmer A, Anderson AC, Spitzmüller B, Hellwig E.** Antibiotic resistance and capacity for biofilm formation of different bacteria isolated from endodontic infections associated with root-filled teeth. *J Endod* 2014;40:223-30.
7. **Albuquerque MT, Valera MC, Moreira CS, Bresciani E, de Melo RM, Bottino MC.** Effects of ciprofloxacin-containing scaffolds on enterococcus faecalis biofilms. *J Endod* 2015;41:710-4.
8. **Al-Kahtani A, Shostad S, Schifferle R, Bhambhani S.** In-vitro evaluation of microleakage of an orthograde apical plug of mineral trioxide aggregate in permanent teeth with simulated immature apices. *J. Endod* 2005; 31:117-19.

9. **Al-Kahtani A, Al-Kahtani SM, Mahmood A, Elsafadi MA, Aldahmash AM, Anil S.** Cytotoxicity of Qmix endodontic irrigating solution on human bone marrow mesenchymal stem cells. *BMC Oral Health* 2014; 29:14-27.
10. **Almyroudi A, Mackenzie D, McHugh S, Saunders W.** The effectiveness of various disinfectants used as endodontic intracanal medications: An in vitro study. *J Endod* 2002; 28:163-7.
11. **Alobaid AS, Cortes LM, Lo J, Nguyen TT, Albert J, Abu-Melha AS, Lin LM, Gibbs JL.** Radiographic and clinical outcomes of the treatment of immature permanent teeth by revascularization or apexification: a pilot retrospective cohort study. *J Endod* 2014;40:1063-70.
12. **Alves FR, Almeida BM, Neves MA.** Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod.* 2011;37:496-501.
13. **Andreasen JO, Kristerson L, Andreasen FM.** Damage of the Hertwig's epithelial root sheath: effect upon root growth after autotransplantation of teeth in monkeys. *Dent Traumatol* 1988;4:145-51.
14. **Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC.** Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol* 2002;18:134-7.
15. **Anitua E.** Plasma rich in growth factors: Preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999.; 14:529-35.
16. **Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I.** The potencial impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007;28:4551-4560.
17. **Archer R, Reader A, Nist R, Beck M, Meyers WJ.** An in vivo evaluation of the efficacy of ultrasound after step-back preparation in mandibular molars. *J Endod* 1992;18: 549-52.
18. **Arnold M, Ricucci D, Siqueira JF Jr.** Infection in a complex network of apical ramifications as the cause of persistent apical periodontitis: a case report. *J Endod.* 2013;39:1179-84.

19. **Asgary S, Nazarian H, Khojasteh A, Shokouhinejad N.** Gene expression and cytokine release during odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells induced by 2 endodontic biomaterials. *J Endod* 2014; 40:387-92.
20. **Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT.** Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod* 2011;37:1121-3.
21. **Banchs F, Trope M.** Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod.* 2004; 30: 196-200.
22. **Barthel C, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Göbel U, Roulet J.** In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide: gel and paste versus gutta-percha points. *J Endod* 2002;28:427-30.
23. **Basrani B, Ghanem A, Tjäderhane L.** Physical and chemical properties of chlorhexidine and calcium hydroxide-containing medications. *J Endod* 2004;30:413-7.
24. **Baumgartner J, Khemaleelakul S, Xia T.** Identification of spirochetes (treponemes) in endodontic infections. *J Endod* 2003;29:794-7.
25. **Becerra P, Ricucci D, Loghin S, Gibbs JL, Lin LM.** Histologic study of a human immature permanent premolar with chronic apical abscess after revascularization/revitalization. *J Endod* 2014 ;40:133-9.
26. **Behnen M, West L, Liewehr F, Buxton T, Mcpherson J.** Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod* 2001; 27:765-7.
27. **Beltes R, Pissiotis E, Koulaouzidou E, Kaortsaris A.** In vitro release of hydroxyl ions from six types of calcium hydroxide nonsetting pastes. *J Endod* 1997; 23:413-5.
28. **Bergenholtz G.** Pathogenic mechanisms in pulpal disease. *J Endod* 1990;16:98-101.
29. **Bergenholtz G.** Evidence for bacterial causation of adverse pulpal responses in resin-based dental restorations. *Crit Rev Oral Biol Med* 2000;11:467-80.

30. **Berkhoff JA, Chen PB, Teixeira FB, Diogenes A.** Evaluation of triple antibiotic paste removal by different irrigation procedures. *J Endod* 2014;40:1172-7.
31. **Bezgin T, Yilmaz AD, Celik BN, Sónmez H.** Concentrated platelet-rich plasma used in root canal revascularization: 2 case reports. *Int Endod J* 2014; 47: 41-9.
32. **Bezgin T, Sónmez H.** Review of current concepts of revascularization/revitalization. *Dent Traumatol* 2015; May 6 doi: 10.1111/edt.12177. [Epub ahead of print]
33. **Bhalla M, Thami GP, Singh N.** Ciprofloxacin-induced erythema nodosum. *Clin Exp Dermatol* 2007;32:115-6.
34. **Bolhari B, Nekoofar MH, Sharifian M, Ghabrai S, Meraji N, Dummer PM.** Acid and microhardness of mineral trioxide aggregate and mineral trioxide aggregate-like materials. *J Endod* 2014;40:432-5.
35. **Bose R, Nummikoski P, Hargreaves K.** A retrospective evaluation of radiographic outcomes in immature teeth with necrotic root canal systems treated with regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2009;35:1343-9.
36. **Burleson A, Nusstein J, Reader A, Beck M.** The in vivo evaluation of hand-rotary ultrasound instrumentation in necrotic, human mandibular molars. *J Endod* 2007;33:782-7.
37. **Cachovan G, Schiffner U, Altenhof S, Guentsch A, Pfister W, Eick S.** Comparative antibacterial efficacies of hydrodynamic and ultrasonic irrigation systems invitro. *J Endod.* 2013;39:1171-5.
38. **Calt S, Serper A.** Time-dependent effects of EDTA on dentin structures. *J Endod* 2002;28:17-9.
39. **Camilleri J.** Color stability of white mineral trioxide aggregate in contact with hypochlorite solution. *J Endod* 2014;40:436-40.
40. **Canalda C.** Medicación intraconducto. En: Canalda C, Brau E, editores. *Endodoncia. Técnicas clínicas y Bases científicas.* España. Editorial Masson, 2001:236-238.

41. **Caron G, Nham K, Bronnec F, Matchou P.** Effectiveness of different final irrigation activation protocols on smear layer removal in curved Canals. *J Endod* 2010;36:1361-6.
42. **Cehreli ZC, Isbitiren B, Sara S, Erbas G.** Regenerative endodontic treatment (revascularization) of immature necrotic molars medicated with calcium hydroxide: a case series. *J Endod* 2011 ;37:1327-30.
43. **Chang SW, Lee SY, Kum KY, Kim EC.** Effects of ProRoot MTA, bioaggregate, and micromega MTA on odontoblastic differentiation in human dental pulp cells. *J Endod* 2014; 40:113-8.
44. **Chen MY-H, Chen KL, Chen CA, Tayebaty F, Rosenberg PA, Lin LM.** Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J* 2012;45: 294-305.
45. **Chong B, Pitt Ford T.** The role of intracanal medication in root canal treatment. *Int Endod J* 1992, 25:97-106.
46. **Chueh LH, Huang GT.** Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod* 2006;32:1205-13.
47. **Chueh LH, Ho YC, Kuo TC, Lai WH, Chen YH, Chiang CP.**Regenerative endodontic treatment for necrotic immature permanent teeth.*J Endod* 2009 ;35:160-4.
48. **Chuensombat S, Khemaleelakul S, Chattipakorn S, Srisuwan T.** Cytotoxic effects and antibacterial efficacy of a 3-antibiotic combination: an in vitro study. *J Endod* 2013;39:813-9.
49. **Cohen S, Burns RC.** Pathways of the pulp 1998. Missouri. Mosby.
50. **Cohen S y Burns R.** Vías de la Pulpa. 7º Ed. Harcourt España. Cap 1. 1999.
51. **Cohenca N, Heilborn C, Johnson JD, Flores DS, Ito IY, da Silva LA.** Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth.*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:42-6.

52. **Cohenca N, Romualdo PC, da Silva LA, da Silva RA, de Queiroz AM, De Rossi A, Nelson-Filho P.** Tissue response to root canal irrigation systems in dogs' teeth with apical periodontitis. *Clin Oral Investig* 2015;19:1147-56.
53. **Costerton J, Cheng G, Geesey T, Ladd J, Nickel M, Dasgupta M, Marrie T.** Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu. Rev. Microbiol*, 1987, 41:435-64.
54. **Cotter JL, Fader RC, Lilley C, Herndon DN.** Chemical parameters, antimicrobial activities, and tissue toxicity of 0.1 and 0.5% sodium hypochlorite solutions. *Antimicrob Agents Chemother* 1985;28:118-22.
55. **Cotti E, Mereu M, Lusso D.** Regenerative treatment of an immature, traumatized tooth with apical periodontitis: report of a case. *J Endod* 2008;34:611-616.
56. **Cvek M. Cleaton-Jones P, Austin J, Lownie J, Kling M, Fatti P.** Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization and periodontal healing in reimplanted monkey incisors. *Dent Traumatol* 1990;6: 170-6.
57. **Cvek M.** Prognosis of luxated non-vital maxillary incisors treated with calcium hydroxide and filled with gutta-percha: a retrospective clinical study. *Dent Traumatol* 1992;8:45-55.
58. **Da Silva LA, Nelson-Filho P, Da Silva RA, Flores DS, Heilborn C, Johnson JD, Cohenca N.** Revascularization and periapical repair after endodontic treatment using apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in dogs' teeth with apical periodontitis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:779-87.
59. **Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, Gutmann JL, Pashley D, Tay FR.** The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod* 2011;37:80-4.

60. **Das A, Kottoor J, Mathew J, Kumar S, George S.** Dentine microhardness changes following conventional and alternate irrigation regimens: an in vitro study. *J Conserv Dent* 2014;17:546-9.
61. **De Oliveira LD, Jorge AO, Carvalho CA, Koga-Ito CY, Valera MC.** In vitro effects of endodontic irrigants on endotoxins in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:135-42.
62. **Delgado RJ, Gasparoto TH, Sipert CR, Pinheiro CR, Moraes IG, Garcia RB, Bramante CM, Campanelli AP, Bernardineli N.** Antimicrobial effects of calcium hydroxide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*. *J Endod* 2010;36:1389-93.
63. **Delivanis P, Fan V.** The localization of blood-borne bacteria in instrumented unfilled and over instrumented canals. *J Endod* 1984;10:521-4.
64. **Desai P, Himel V.** Comparative safety of various intracanal irrigation systems. *J Endod* 2009;35:545-9
65. **Diagenes AR, Ruparel NB, Teixeira FB, Hargreaves KM.** Translational science in disinfection for regenerative endodontics. *J Endod* 2014; 40: 52-7.
66. **Ding RY, Cheung GSP, Chen J.** Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod* 2009;35:745-9.
67. **Elnaghy AM.** Effect of QMix irrigant on bond strength of glass fibre posts to root dentine. *Int Endod J.* 2014;47:280-9.
68. **Ercan E, Özekinci T, Atakui F, Gül K.** Antibacterial activity of 2% chlorhexidine gluconate and 5.25% sodium hypochlorite in infected root canal: in vivo study. *J Endod* 2004; 30:84-6.
69. **Essner MD, Javed A, Eleazer PD.** Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an in vitro study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112:662-6.
70. **Evans M, Craig J, Khemaleelakul S, Xia T.** Efficacy of calcium hydroxide: chlorhexidine paste as and intracanal medication in bovine dentin. *J Endod* 2003; 29:338-9.

71. **Evanov C, Liewehr F, Buxton TB, Joyce AO.** Antibacterial efficacy of calcium hydroxide and chlorhexidine gluconate irrigants at 37 degrees C and 46 degrees C. *J Endod* 2004;30:653-7.
72. **Fava L, Saunders W.** Calcium Hydroxide pastes: classification and clinical indications. *Int Endod J* 1999, 32: 257-82.
73. **Ferreira F, Ferreira A, Gomes B, Souza-Filho F.** Resolution of persistent periapical infection by endodontic surgery. *Int Endod J* 2004, 37:61-9.
74. **Ferrer-Luque MC, Teresa Arias-Moliz M, Ruíz-Linares M, Elena Martínez García M, Baca P.** Residual activity of cetrimide and chlorhexidine on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *Int J Oral Sci.*2014;6:46-9.
75. **Flake NM, Gibbs JL, Diogenes A, Hargreaves KM, Khan AA.** A standardized novel method to measure radiographic root changes after endodontic therapy in immature teeth. *J Endod* 2014;40:46-50.
76. **Frais S, NG YL, Gulabilava K.** Some factors affecting the concentration of available chlorine in comercial sources of sodium hypochlorite. *Int Endod J* 2001;34:206-15.
77. **Freymler EG, Aghaloo TL.** Platelet-rich plasma: ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62:484–8.
78. **Fucks AB.** Tratamiento de la pulpa para las denticiones primarias y permanentes juvenil. *Dent Clin North Am* 2000;44:571-96.
79. **Galler KM, D'Souza RN, Federlin M, Cavender AC, Hartgerink JD, Hecker S, Schmalz G.** Dentin conditioning codetermines cell fate in regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:1536-41.
80. **Garberoglio R, Becce C.** Smear layer removal by root canal irrigants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78:359-67.
81. **García-Godoy F, Murray PE.** Recommendations for using regenerative endodontic procedures in permanent immature traumatized teeth. *Dent Traumatol* 2012; 28:33-41.

82. **George S, Kisben A, Song K.** The role of environmental changes on monospecies biofilm formation on root canal wall by *Enterococcus faecalis*. *J Endod*, 2005, 31:867-72.
83. **Ghaeth H Yassen, Alaa HA Sabrah, George J Eckert, Jeffrey A Platt.** Effect of different endodontic regeneration protocols on wett ability, roughness, and chemicals composition of surface dentin. *J Endod* 2015. Published online: March 30.
84. **Goldberg F, Abramovich A.** Analysis of the effect of EDTAC on the dentinal walls of the root canal. *J Endod* 1977; 3: 101-5.
85. **Goldberg F, Soares I.** Endodoncia. Técnicas y fundamentos. Buenos Aires. Editorial Médica Panamericana, 2002: 133-140.
86. **Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Bernabé PF.** Tissue reaction to a triantibioticpaste used for endodontic tissue self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *J Endod* 2012 ;38:91-4.
87. **Gomes-Filho JE, Duarte PC, Ervolino E, Mogami Bomfim SR, Xavier Abimussi CJ, Mota da Silva Santos L, Lodi CS, Penha De Oliveira SH, Dezan E Jr, Cintra LT.** Histologic characterization of engineered tissues in the canal space of closed-apex teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2013;39:1549-56.
88. **Gomez B, Sato E, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Sousa- Filho F.** Evaluation of time required for recontaminations of coronal sealed canals medicated with calcium hydroxide and chlorexidine. *Int Endod J* 2003, 36:604-9.
89. **Greenstein G, Polson A.** The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *J Periodontol* 1998;69:507-20.
90. **Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, denBesten P, Robey PG, Shi S.** Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res* 2002; 81:531-5.

91. **Grossman L.** *Práctica Endodóntica.* 3^o edición. Editorial Mundi. Buenos Aires. 1973; 155-65.
92. **Guerreiro- Tanomaru J.M, Chula DG, de Pontes Lima RK.** Release and diffusion of hydroxyl ion from calcium hydroxide-based medicaments. *Dent. Traumatology* 2012;28:320-3.
93. **Gulabivala K, Patel B, Evans G, Ng YL.** Effects of mechanical and chemical procedures on root canal surfaces. *Endodontic Topics* 2005;10:103-22.
94. **Gutierrez J, Jofre A, Villena F.** Scanning electron microscope study on the action of endodontic irrigants on bacteria invading the dentinal tubules. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1990;69:491-501.
95. **Haapasalo M, Shen Y, Qian W, Gao Y.** Irrigation in endodontics. *Dent Clin North Am* 2010; 54:291-312.
96. **Hahn CL, Liewehr FR.** Relationships between caries bacteria, host responses, and clinical signs and symptoms of pulpitis. *J Endod* 2007;33:213-19.
97. **Ham JW, Patterson SS, Mitchell DF.** Induced apical closure of immature pulpless teeth in monkeys. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.*1972; 33:438-49.
98. **Hancock H, Sigurdsson A, Trope M, Moiseiwitsch J.** Bacteria isolated after unsuccessful endodontic treatment in a North American population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2001;91:579-86.
99. **Hargreaves KM, Giesler T, Henry M, Wang Y.** Regeneration potential of the young permanent tooth: what does the future hold? *J Endod* 2008;34:51–6.
100. **Hargreaves KM, Diogenes A, Teixeira FB.** Treatment options: biological basis of regenerative endodontic procedures. *J Endod* 2013;39:30-43.
101. **Harrison AJ, Chivatxaranukul P, Parashos P, Messer HH.** The effect of ultrasonically activated irrigation on reduction of *Enterococcus faecalis* in experimentally infected root canal. *Int Endod J* 2010;43:968-77.

102. **Herman BW.** Calciumhydroxyd als mittel zum behandel und fúlen von zahnwurzelkanálen, Wúrzburg, Med. Diss. V German dissertation,1920.
103. **Hockett JL, Dommisch JK, Johnson JD, Cohenca N.** Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an in vitro study. *J Endod* 2008; 34:1374-7.
104. **Holland R, Otoboni Filho JA, de Souza V, Nery MJ, Bernabé PF, Dezan E Jr.** A comparison of one versus two appointment endodontic therapy in dogs' teeth with apical periodontitis. *J Endod.* 2003;29:121-4.
105. **Hong BY, Lee TK, Lim SM, Chang SW, Park J, Han SH, Zhu Q, Safavi KE, Fouad AF, Kum KY.** Microbial analysis in primary and persistent endodontic infections by using pyrosequencing. *J Endod.* 2013;39:1136-40.
106. **Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, Uematsu H, Sato M, Kota K, Iwaku M.** In-vitro antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J.* 1996; 29:125-30.
107. **Howard RK, Kirkpatrick TC, Rutledge RE, Yaccino JM.** Comparison of debris removal with three different irrigation techniques. *J Endod.* 2011;37:1301-5.
108. **Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB.** Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998; 24:1998.
109. **Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S.** The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod* 2008; 34: 645–651.
110. **Hülsmann M, Hahn W.** Complications during root canal irrigation: literature review and case reports. *Int Endod J* 2000;33:186-93.
111. **Hülsmann M, Heckendorff M, Lennon A.** Chelating agents in root canal treatment: mode of action and indications for their use. *Int Endod J* 2003;36:810-30.

112. **Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa, Nakasima A, Akamine A.** Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res* 2004;83:590-595.
113. **Iwaya S, Ikawa M, Kubota M.** Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol.* 2001;17:185-7.
114. **Iwaya S, Ikawa M, Kubota M.** Revascularization of an immature permanent tooth with periradicular abscess after luxation. *Dent Traumatol.*2011;27:55-8.
115. **Jadhav G, Shah N, Logani A.** Revascularization with and without platelet-rich plasma in nonvital, immature, anterior teeth: a pilot clinical study. *J Endod* 2012 ;38:1581-7.
116. **Jadhav GR, Shah D, Raghvendra SS.** Autologous platelet rich fibrin aided revascularization of an immature, non-vital permanent tooth with apical periodontitis: A case report. *J Nat Sci Biol Med* 2015;6:224-5.
117. **Jeeruphan T, Jantararat J, Yanpiset K, Suwannapan L, Khewsawai P, Hargreaves KM.** Mahidol study 1: comparison of radiographic and survival outcomes of immature teeth treated with either regenerative endodontic or apexification methods: a retrospective study. *J Endod* 2012;38:1330-6.
118. **Jensen SA, Walter TL, Hutter JW, Nicoll BK.** Comparison of the cleaning efficacy of passive sonic activation and passive ultrasonic activation after hand instrumentation in molar root Canals. *J Endod* 1999;25:735-8.
119. **Johns DA, Shivashankar VY, Krishnamma S, Johns M.** Use of photoactivated disinfection and platelet-rich fibrin in regenerative endodontics. *J Conserv Dent* 2014;17:487-90.
120. **Jung IY, Lee SJ, Hargreaves KM.** Biologically based treatment of immature permanent teeth with pulpal necrosis: a case series. *J Endod* 2008; 34:876–87.
121. **Jung IY, Kim ES, Lee CY, Lee SJ.** Continued development of the root separated from the main root. *J Endod.* 2011;37:711-4.

122. **Kahler B, Mistry S, Moule A, Ringsmuth AK, Case P, Thomson A, Holcombe T.** Revascularization outcomes: a prospective analysis of 16 consecutive cases. *J Endod* 2014;40:333-8.
123. **Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ.** The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 20: 340-349.
124. **Kamburis JJ, Barker TH, Barfield RD, Eleazer PD.** Removal of organic debris from bovine dentin shavings. *J Endod* 2003;29:559-61.
125. **Kaptan F, Karapinar-Kazandag M, Kayahan MB, Bora T, Bayirli G.** Potential of an Er:YAG laser in the removal of calcium hydroxide from root canals. *Photomed Laser Surg.* 2012;30:250-4.
126. **Kerekes K, Heide S, Jacobsen I.** Follow-up examination of endodontic treatment in traumatized juvenile incisors. *J Endod* 1980;6:744-8.
127. **Khademi AA, Dianat O, Mahjour F, Razavi SM.** Outcomes of revascularization treatment in immature dog's teeth. *Dent Traumatol* 2014;30:374-9.
128. **Kim J, Kim K, Shin S, Park JW, Jung IY.** Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod* 2010;36:1086-91.
129. **Kim DS, Park HJ, Yeom JH, Seo JS, Ryu GJ, Park KH, Shin SI, Kim SY.** Long-term follow-ups of revascularized immature necrotic teeth: three case reports. *Int J Oral Sci.* 2012;4:109-13.
130. **Kleier DJ, Barr ES.** A study of endodontically apexified teeth. *Dent Traumatol* 1991;7:112-7.
131. **Kolenbrander P, Andersen R, Blehert D, Eglund P, Foste J, Palmer R.** Communication among Oral Bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002; 66:486-505.
132. **Lambrianidis T, Kosti E, Boutsoukis C, Mazinis M.** Removal efficacy of various calcium hydroxide/chlorhexidine medicaments from the root canal. *Int Endod J.* 2006;39:55-61.

133. **Langer R and Vacanti JP.** Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920-2
134. **Lasala A.** Endodoncia. 3^o edición Salvat editores S.A., 1988; 224-8.
135. **Laureys WG, Cuvelier CA, Dermaut LR, De Pauw GA.** The critical apical diameter to obtain regeneration of the pulp tissue after tooth transplantation, replantation, or regenerative endodontic treatment. *J Endod* 2013;39:759-63.
136. **Law AS.** Considerations for regeneration procedures. *J Endod* 2013; 39:44-56.
137. **Lee Mt, Bird PS, Walsh LJ.** Photo-activated disinfection of the root canals: a new role of the lasers in endodontis. *Aust Endod J* 2004;30:93-8.
138. **Lenet B, Komorowski R, Wu X, Huang J, Grad H, Lawrence H, Friedman S.** Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod* 2000;26:652-5.
139. **Lenzi R, Trope M.** Revitalization procedures in two traumatized incisors with different biological outcomes. *J Endod* 2012;38:411-4.
140. **Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo R deT, Utrilla LS, Assed S.** Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and perapical lesions. *J Endod* 1993;19:348-52.
141. **Leonardo M, Simoes A.** Preparación biomecánica de los conductos radiculares, medios físicos: irrigación, aspiración e inundación. En: Leonardo M, Leal J. Editores. Endodoncia tratamiento de los conductos radiculares. Argentina, Editorial Médica Panamericana, 1994:268-75.
142. **Leonardo M, Rossi M, Silva L, Ito IY, Bonifácio KC.** EM evaluation of bacterial biofilm and microorganism on the apical external root surface of human teeth. *J Endod* 2002; 28: 815-8.
143. **Leonardo, M.R, Hernandez ME, Silva LA.** Effect of a calcium hydroxide based root canal dressing on periapical repair in dogs a histological study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006;102:680-5.

144. **Lewis K.** Riddle of Biofilm Resistance. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* 2001, 45:999-1007.
145. **Lin S, Zuckerman O, Weiss E, Mazor Y, Fuss Z.** Antibacterial efficacy of a new chlorhexidine slow release device to disinfect dentinal tubules. *J Endod* 2003 ;29:416-18.
146. **Lin LM, Shimizu E, Gibbs JL, Loghin S, Ricucci D.** Histological and histobacteriologic observations of failed revascularization/revitalization therapy: a case report. *J Endod* 2014; 40: 291-5.
147. **Lin LM, Ricucci D, Huang GT.** Regeneration of the dentine-pulp complex with revitalization/revascularization therapy: challenges and hopes. *Int Endod J* 2014;47:713-24.
148. **Loel DA.** Use of acid cleanser in endodontic therapy. *J Am Dent Assoc* 1975;90:148-51.
149. **Love R, Jenkinson H.** Invasion of dentinal tubules by oral bacteria. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13:171-183.
150. **Love R.** Invasion of dentinal tubules by root canal bacteria. *Endodontics topics*, 2004, 9:52-65.
151. **Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A.** Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGFI) in rat molars. *Advances in Dental Research* 2001;15: 108-112.
152. **Ma J, Wang Z, Shen Y, Haapasalo M.** A new noninvasive model to study the effectiveness of dentin disinfection by using confocal laser scanning microscopy. *J Endod* 2011;37:1380-5.
153. **McCabe P.** Revascularization of an immature tooth with apical periodontitis using a single visit protocol: a case report. *Int Endod J* 2015;48:484-97.
154. **Maeda H, Wada N, Nakamuta H, Akamine A.** Human periapical granulation tissue contains osteogenic cells. *Cell Tissue Res* 2004;315:203–8.
155. **Mancini M, Cerroni L, Iorio L, Armellin E, Conte G, Cianconi L.** Smear layer removal and canal cleanliness using different irrigation systems

- (EndoActivator, EndoVac, and passive ultrasonic irrigation): field emission scanning electron microscopic evaluation in an in vitro study. *J Endod* 2013;39:1456-60.
- 156. Manguno C, Murray PE, Howard C, Madras J, Mangan S, Namerow KN.** A survey of dental residents' expectations for regenerative endodontics. *J Endod* 2012;38:137-43.
- 157. Martin J, Ponce A.** Terapéutica inductora del ápice abierto. En: Rodríguez Ponce A, editor. *Endodoncia Consideraciones Actuales*. España. Amolca, 2003: 223-3.
- 158. Martin G, Ricucci D, Gibbs JL, Lin LM.** Histological findings of revascularized/revitalized immature permanent molar with apical periodontitis using platelet-rich plasma. *J Endod* 2013;39:138-44.
- 159. Marx RE.** Platelet-rich plasma: evidence to support its use. *J Oral Maxillofac Surg* 2004; 62:489-96.
- 160. Mathieu S, Jeanneau C, Sheibat-Othman N, Kalaji N, Fessi H, About I.** Usefulness of controlled release of growth factors in investigating the early events of dentin-pulp regeneration. *J Endod* 2013 ;39:228-35.
- 161. Mendoza A, Solano E, Luque F.** Cierre apical mediante agregado de trióxido mineral (MTA). *Endodoncia* 2002;20:28-38.
- 162. Mente J, Leo M, Panagidis D, Ohle M, Schneider S, Lorenzo Bermejo J, Pfefferle T.** Treatment outcome of mineral trioxide aggregate in open apex teeth. *J Endod* 2013; 39:20-6.
- 163. Messer HH, Chen RS.** The duration of effectiveness of root canal medicaments. *J Endod* 1984; 10:240-5.
- 164. Mishra N, Narang I, Mittal N.** Platelet-rich fibrin-mediated revitalization of immature necrotic tooth. *Contemp Clin Dent* 2013 J;4:412-5
- 165. Mitchell RP, Baumgartner JC, Sedgley CM.** Apical extrusion of sodium hypochlorite using different root canal irrigation systems. *J Endod* 2011;37:1677-81.
- 166. Molander A, Reit C, Dahlen G, Kvist T.** Microbiological status of root-filled teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1998;31:1-7.

167. **Molven O, Olsen I, Kerekes K.** Scanning electron microscopy of bacteria in the apical part of root canals in permanent teeth with periapical lesions. *Dent Traumatol* 1991;7:226-9.
168. **Morgental RD, Singh A, Sappal H, Kopper PM, Vier-Pelisser FV, Peters OA.** Dentin inhibits the antibacterial effect of new and conventional endodontic irrigants. *J Endod* 2013 ;39:406-10.
169. **Muñoz HR, Camacho-Cuadra K.** In vivo efficacy of three different endodontic irrigation systems for irrigant delivery to working length of mesial canals of mandibular molars. *J Endod* 2012;38:445-8.
170. **Murray PE, Garcia-Godoy F, Hargreaves KM.** Regenerative endodontics: a review of current status and a call for action. *J Endod* 2007;33:377–90.
171. **Naenni N, Thoma K, Zehnder M.** Soft tissue dissolution capacity of currently used and potencial endodontic irrigants. *J Endod* 2004;30: 785-7.
172. **Nagata JY, Soares AJ, Souza-Filho FJ, Zaia AA, Ferraz CC, Almeida JF, Gomes BP.** Microbial evaluation of traumatized teeth treated with triple antibiotic paste or calcium hydroxide with 2% chlorhexidine gel in pulp revascularization. *J Endod* 2014;40:778-83.
173. **Nagata JY, Gomes BP, Rocha Lima TF, Murakami LS, de Faria DE, Campos GR, de Souza-Filho FJ, Soares Ade J.** Traumatized immature teeth treated with 2 protocols of pulp revascularization. *J Endod* 2014;40:606-12.
174. **Nagy MM, Tawfik HE, Hashem AA, Abu-Seida AM.** Regenerative potential of immature permanent teeth with necrotic pulps after different regenerative protocols. *J Endod* 2014 ;40:192-8.
175. **Nair R.** Light and electron Microscopic Studies of Root Canal Flora and Periapical Lesions. *J Endod*, 1987, 13:29-39.
176. **Nair P, Sjogren U, Krey G, Kahnberg K, Sundqvist G.** Intraradicular bacteria and fungi in root-filled, asymptomatic human teeth with therapy-resistant periapical lesions: a long-term light and electron microscopic follow-up study. *J Endod* 1990; 16: 580-8.

177. **Nair P.** Essential endodontology. "Pathology of apical periodontitis". En: Pitt Ford T.R., Orstavik D, editors. Editorial Blackwell Science Ltd. 1998; 76-84.
178. **Nevins A, Wrobel W, Valachovic R, Finkelstein F.** Hard tissue induction into pulpless open-apex teeth using collagen-calcium phosphate gel. J Endod 1977;3:431-3.
179. **Nevins A, Crespi P.** A clinical study using the collagen gel Zyplast in endodontic treatment. J Endod 1998;24:610-3.
180. **Nielsen BA, Baumgartner CJ.** Comparison of the Endovac system to needle irrigation of root Canals. J Endod 2007;33:611-5.
181. **Nosrat A, Seifi A, Asgary S.** Regenerative endodontic treatment (revascularization) for necrotic immature permanent molars: a review and report of two cases with a new biomaterial. J Endod 2011;37:562-7.
182. **Nosrat A, Homayounfar N, Oloomi K.** Drawbacks and unfavorable outcomes of regenerative endodontic treatments of necrotic immature teeth: a literature review and report of a case. J Endod 2012;38:1428-34.
183. **Nosrat A, Li KL, Vir K, Hicks ML, Fouad AF.** Is pulp regeneration necessary for root maturation? J Endod 2013;39:1291-5.
184. **Oliveira LD, Carvalho CA, Carvalho AS, Alves Jde S, Valera MC, Jorge AO.** Efficacy of endodontic treatment for endotoxin reduction in primarily infected root canals and evaluation of cytotoxic effects. J Endod 2012;38:1053-7.
185. **Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, Cavenago BC, Garcia RB, Bernardineli N, Jaramillo DE, Hungaro Duarte MA.** Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. J Endod 2013;39:115-8.
186. **Ørstavik D.** Medicación Intraconducto. En: Pitt Ford J, editores. Endodoncia en la práctica clínica. México. McGraw-Hill Interamericana, 1999: 106-22.
187. **Ostby BN.** The role of the blood clot in endodontic therapy. An experimental histologic study. Acta Odontol Scand 1961; 19: 324-53.

188. **Ozdemir HO, Buzoglu HD, Calt S.** Chemical and ultramorphologic effects of ethylenediaminetetraacetic acid and sodium hypochlorite in young and old root canal dentin. *J Endod* 2012;38:204-8.
189. **Pai S, Thomas MS.** The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod* 2011; 37:741.
190. **Pasqualini D, Cuffini AM, Scotti N, Mandras N, Scalas D, Pera F, Berutti E.** Comparative evaluation of the antimicrobial efficacy of a 5% sodium hypochlorite subsonic-activated solution. *J Endod* 2010;36:1358-60.
191. **Pawar R, Alqaied A, Safavi K, Boyko J, Kaufman B.** Influence of an apical negative pressure Irrigation system on bacterial elimination during endodontic therapy: a prospective randomized clinical study. *J Endod* 2012;38:1177-81.
192. **Peters LB, Wesselink PR, van Winkelhoff AJ.** Combinations of bacterial species in endodontic infections. *Int Endod J* 2002;35:698-702.
193. **Petrino JA.** Revascularization of necrotic pulp of immature teeth with apical periodontitis. *Northwest Dent* 2007;86:33–5.
194. **Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB.** Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010;36:536-41.
195. **Pinheiro E, Gomes B, Ferraz C, Teixeira F, Zaia A, Souza Filho F.** Evaluation of root canal microorganisms isolated from teeth with endodontic failure and their antimicrobial susceptibility. *Oral Microbiol Immunol* 2003;18:100-3.
196. **Pitt Ford T.** Apexificación y Apexogénesis. En: Walton R, Torabinejad M, editores. *Endodoncia. Principios y Práctica.* México. McGraw-Hill Interamericana, 1997: 402-32.
197. **Pitt WG.** Removal of oral biofilm by sonic phenomena. *Am J Dent* 2005; 18:345-52.

198. **Pumarola J y Canalda C.** Patología de la Pulpa y del Periápice. En: Canalda Sahli C, Brau Aguadé E. Endodoncia: Técnicas clínicas y bases científicas. 2 Ed. Masson Barcelona 2006. 234-8.
199. **Rafter M.** Apexification: a review. Dent Traumatol 2005;21:1-8.
200. **Rasimick BJ, Nekich M, Hladek MM, Musikant BL, Deutsch AS.** Interaction between chlorhexidine digluconate and EDTA. J Endod 2008;34:1521-3.
201. **Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N.** Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. Int Endod J. 2009;42:84-92.
202. **Richman MJ.** The use of ultrasonics in root canal therapy and root resection. J Med 1957;12:12-8.
203. **Ruddle CJ.** Cleaning and shaping the root canal system. En: Cohen S, Burns RC, Eds. Pathways of the pulp. 8 th Ed. St Louis: Mosby, Inc; 2002:231-91.
204. **Ruddle CJ.** Endodontic disinfection: tsunami irrigation. Endod Practice 2008 :7-15.
205. **Rule DC, Winter GB.** Root growth and apical repair subsequent to pulpal necrosis in children. Br Dent J 1966;120:586 –90.
206. **Sabins RA, Johnson JD, Hellstein JW.** A comparison of the cleaning efficacy of short-term sonic and ultrasonic passive irrigation after hand instrumentation in molar root canals. J Endod 2003;29:674-8.
207. **Sabrah AH, Yassen GH, Gregory RL.** Effectiveness of antibiotic medicaments against biofilm formation of *Enterococcus faecalis* and *Porphyromonas gingivalis*. J Endod 2013 ;39:1385-9.
208. **Saoud TM, Zaazou A, Nabil A, Moussa S, Lin LM, Gibbs JL.** Clinical and radiographic outcomes of traumatized immature permanent necrotic teeth after revascularization/revitalization therapy. J Endod 2014;40:1946-52.
209. **Saoud TM, Zaazou A, Nabil A, Moussa S, Aly HM, Okazaki K, Rosenberg PA, Lin LM.** Histological observations of pulpal replacement

tissue in immature dog teeth after revascularization of infected pulps. *Dent Traumatol* 2015 ;31:243-9.

210. **Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E.** Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J* 1996;29:118-24.
211. **Scheie A, Petersen F.** The biofilm concept: consequences for future prophylaxis of oral disease? *Crit Rev Oral Biol Med* 2004, 15:4-12.
212. **Schneider A, Taboas JM, McCauley LK, Krebsbach PH.** Skeletal homeostasis in tissue-engineered bone. *J Orthop Res* 2003; 21:859-64.
213. **Segura JJ, Jiménez-Rubio A, Guerrero JM, Calvo JR.** Comparative effects of two endodontic irrigants, chlorhexidine digluconate and sodium hypochlorite, on macrophage adhesion to plastic surfaces. *J Endod.* 1999;25:243-6.
214. **Seltzer S, Bender I.** *Pulpa Dental*. 3^o edición. Editorial El Manual moderno S.A. México. 1987;46-8.
215. **Sen B, Safavi K, Spångberg L.** Growth patterns of *Candida albicans* in relation to radicular dentin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1997, 84:68
216. **Shabahang S, Torabinejad M, Boyne P, Abedi H, McMillan, P.** A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J. Endod* 1999, 25:1-5.
217. **Shabahang S.** Treatment options: apexogenesis and apexification. *J Endod* 2013 ;39:26-9.
218. **Shah N, Logani A, Bhaskar U, Aggarwal V.** Efficacy of revascularization to induce apexification/apexogenesis in infected, nonvital, immature teeth: a pilot clinical study. *J Endod* 2008;34:919-25.
219. **Sheehy EC, Roberts GJ.** Use of calcium hydroxide for apical barrier formation and healing in non-vital immature permanent teeth: a review. *Br Dent J* 1997;183:241-6.

- 220. Shimizu E, Jong G, Partridge N, Rosenberg PA, Lin LM.** Histologic observation of a human immature permanent tooth with irreversible pulpitis after revascularization/regeneration procedure. *J Endod* 2012;38:1293-7.
- 221. Shimizu E, Ricucci D, Albert J, Alobaid AS, Gibbs JL, Huang GT, Lin LM.** Clinical, radiographic, and histological observation of a human immature permanent tooth with chronic apical abscess after revitalization treatment. *J Endod.* 2013;39:1078-83
- 222. Shin SY, Albert JS, Mortman RE.** One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J* 2009; 42:1118-26.
- 223. Shivashankar VY, Johns DA, Vidyanath S, Kumar MR.** Platelet richfibrin in the revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex. *J Conserv Dent* 2012;15:395-8.
- 224. Silva LA, Leonardo MR, Assed S, Tanomaru Filho M.** Histological study of the effect of some irrigating solutions on bacterial endotoxin in dogs. *Braz Dent J* 2004;15:109-14.
- 225. Simon J, Walton R, Pashley D, Dowden W y Bakland L.** Endodoncia. En: Ingle J, Bakland L, editors..4^o edición. McGraw-Hill Interamericana 1996.
- 226. Siqueira J, Uzeda M.** Disinfection by calcium hydroxide pastes of dentinal tubules infected with two obligate and one facultative anaerobic bacteria. *J Endod* 1996 ; 22:674-6.
- 227. Siqueira J, Lopes H.** Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: A critical review. *Int Endod J* 1999,32:361-9.
- 228. Siqueira JF, Rôças IN, Favieri A, Lima K.** Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod* 2000; 6:331-34.
- 229. Siqueira JF, Rôças IN, Souto R, de Uzeda M, Colombo A.** Actinomyces species, streptococci, and Enterococcus faecalis in primary root canal infections. *J Endod* 2002;28:168-72.

- 230. Siqueira JF Jr, Rôças I, Lopes H, Magalhaes F, de Uzeda M.** Elimination of *Candida albicans* infection of the radicular dentin by intracanal medications. *J Endod* 2003;29:501-4.
- 231. Siqueira JF Jr, Rôças IN.** Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004;97:85-94.5.
- 232. Siqueira JF Jr, Rôças IN.** Exploiting molecular methods to explore endodontic infections: Part 2-Redefining the endodontic microbiota. *J Endod* 2005;31:488-98.
- 233. Sirén EK, Kerosuo E, Lavonius E, Meurman JH, Haapasalo M.** Ca(OH)₂ application modes: in vitro alkalinity and clinical effect on bacteria. *Int Endod J* 2014;47:628-38.
- 234. Sirtes G, Waltimo T, Schaetzle M, Zehnder M.** The effects of temperature on sodium hypochlorite short-term stability, pulp dissolution capacity, and antimicrobial efficacy. *J Endod* 2005;31:669-71.
- 235. Siu C, Baumgartner JC.** Comparison of the debridement efficacy of the Endovac irrigation system and conventional needle root canal irrigation in vivo. *J Endod* 2010;36:1782-5.
- 236. Sjögren U, Fiador D, Persson S, Sundquist G.** Influence of infection at the time of root filling on the outcome of endodontic treatment of teeth with apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:297-306.
- 237. Sloan AJ, Rutherford RB, Smith AJ.** Stimulation of the rat dentine-pulp complex by bone morphogenetic protein-7 in vitro. *Archives of Oral Biology* 2000; 45:173–177.
- 238. Slots J.** Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontal Res* 2002; 37:389-98.
- 239. Smulson M, Sieraski S.** Histofisiología y alteraciones de la pulpa dental. En: Weine F. Tratamiento endodóntico. 5^o edición Harcourt Brace España 1997.
- 240. Soares JA, Roque de Carvalho MA, Cunha Santos SM.** Effectiveness of chemomechanical preparation with alternating use of sodium hypochlorite

- and EDTA in eliminating intracanal *Enterococcus faecalis* biofilm. *J Endod* 2010;36:894-8.
- 241. Soares Ade J, Lins FF, Nagata JY, Gomes BP, Zaia AA, Ferraz CC, de Almeida JF, de Souza-Filho FJ.** Pulp revascularization after root canal decontamination with calcium hydroxide and 2% chlorhexidine gel. *J Endod* 2013;39:417-20.
- 242. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT.** Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod* 2008; 34:166-171.
- 243. Souza M, Cecchin D, Farina AP, Leite CE, Cruz FF, Pereira Cda C, Ferraz CC, Figueiredo JA.** Evaluation of chlorhexidine substantivity on human dentin: a chemical analysis. *J Endod* 2012;38:1249-52.
- 244. Spratt DA, Pratten J, Wilson M, Gulabivala K.** An in vitro evaluation of the antimicrobial efficacy of irrigants on biofilms of root canal isolates. *Int Endod J* 2001;34:300-7.
- 245. Stashenko P.** Etiology and pathogenesis of pulpitis and apical periodontitis. En: *Essential endodontology, prevention and treatment of apical periodontitis*. Orstavik D, Pitt Ford T, editors. Blackwell Science. USA 1998:42-67.
- 246. Stojicic S, Zivkovic S, Qian W, Zhang, Haapasalo M.** Tissue dissolution by sodium hypochlorite: effect of concentration, temperature, agitation, and surfactant. *J Endod* 2010;36:1558-62.
- 247. Stojicic S, Shen Y, Qian W, Johnson B, Haapasalo M.** Antibacterial and smear layer removal ability of a novel irrigant, QMiX. *Int Endod J* 2012;45:363-71.
- 248. Sundqvist G.** Ecology of the root canal flora. *J Endod* 1992;18:427-30.
- 249. Svensäter G, Bergenholtz G.** Biofilms in endodontic infections. *Endodontic Topics* 2004, 9:27-36.
- 250. Takemura N, Noiri Y, Ehara A, Kawahara T, Noguchi N, Ebisu S.** Single species biofilm-forming ability of root canal isolates on gutta-percha points. *Eur J Oral Sci* 2004, 112:523-9.

251. **Tambe VH, Nagmode PS, Vishwas JR, P SK, Angadi P, Ali FM.** Evaluation of the amount of debris extruded apically by using conventional syringe, Endovac and ultrasonic irrigation technique: an in vitro study. *J Int Oral Health* 2013;5:63-6.
252. **Taneja, S, Kumari M.** Use of triple antibiotic paste in the treatment of large periradicular lesions. *J Investig Clin Dent* 2012;3:72-6.
253. **Tanomaru JM, Leonardo MR, Tanomaru Filho M, Bonetti Filho I, Silva LA.** Effect of different irrigation solutions and calcium hydroxide on bacterial LPS. *Int Endod J* 2003;36:733–9.
254. **Tavares WL, de Brito LC, Henriques LC, Oliveira RR, Maciel KF, Vieira LQ, Sobrinho AP.** The impact of chlorhexidine-based endodontic treatment on periapical cytokine expression in teeth. *J Endod* 2013 ;39:889-92.
255. **Tay FR.** Reply to Drs. Pai and Thomas. *J Endod* 2011;37:741-3.
256. **Thé SD.** The solvent action of sodium hypochlorite on fixed and unfixed necrotic tissue. *Oral Surg Oral Med Pathol* 1979;47:558-61.
257. **Thibodeau B, Texeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M.** Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2007;33:680-9.
258. **Thibodeau B, Trope M.** Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent* 2007;29: 47–50.
259. **Thibodeau B.** Case report: pulp revascularization of a necrotic, infected, immature, permanent tooth. *Pediatr Dent* 2009;31:145-8.
260. **Thomson A, Kahler B.** Regenerative endodontics biologically based treatment for immature permanent teeth: a case report and review of the literature. *Aust Dent J* 2010;55:446-52.
261. **Torabinejad M, Watson TF, Pitt Ford TR.** Sealing ability of mineral trioxide aggregate when used as a root and filling material. *J Endod* 1993; 19:591-595.

- 262. Torabinejad, M. Chivian, N.** Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999;25:197-05.
- 263. Torabinejad M, Turman M.** Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod* 2011 ;37:265-8.
- 264. Torabinejad M, Faras H.** A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod* 2012;38:864-8.
- 265. Torabinejad M, Milan M, Shabahang S, Wright KR, Faras H.** Histologic examination of teeth with necrotic pulps and periapical lesions treated with 2 scaffolds: an animal investigation. *J Endod*. 2015 Mar 6. [Epub ahead of print]
- 266. Torneck CD.** Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1966; 21:379-87.
- 267. Torneck CD.** Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. II. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1967; 24:674-83.
- 268. Torres CP, Apicella MJ, Yancich PP, Parker MH.** Intracanal placement of calcium hydroxide: a comparison of techniques, revisited. *J Endod* 2004; 30:225-7.
- 269. Tran-hung L, Mathieu S, About I.** Role of human pulp fibroblasts in angiogenesis. *J Dent Res* 2006; 85: 819-823.
- 270. Trevino EG, Patwardhan AN, Henry MA, Perry G, Dybdal-Hargreaves N, Hargreaves KM, Diogenes A.** Effect of irrigants on the survival of human stem cells of the apical papilla in a platelet-rich plasma scaffold in human root tips. *J Endod* 2011;37:1109-15.
- 271. Tronstad L, Barnett F, Schwartzben L, Frasca P.** Effectiveness and safety of a sonic vibratory endodontic instrument. *Dent Traumatol* 1985;1:69-76.
- 272. Trope M.** Regenerative potencial of dental pulp. *J Endod* 2008; 34: 13-17.
- 273. Trope M.** Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am* 2010; 54:313–324.

- 274. Turk BT, Sen BH, Ozturk T.** In vitro antimicrobial activity of calcium hydroxide mixed with different vehicles against *Enterococcus faecalis* and *Candida albicans*. *Oral Surg Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;108:297-301.
- 275. Tziafas D, Smith AJ, Lesot H.** Designing new treatment strategies in vital pulp therapy. *J Endod* 2000; 28: 77–92.
- 276. Uroz-Torres D, González-Rodríguez MP, Ferrer-Luque MC.** Efectiveness of the EndoActivator system in removing the smear layer after root canal instrumentation. *J Endod* 2010;36:308-11.
- 277. Wadachi R, Araki K, Suda H.** Effect of calcium hydroxide on the dissolution of soft tissue on the root canal wall. *J Endod* 1998; 24: 326-30.
- 278. Walmsley AD, Murgel C, Krell KV.** Canal markings produced by endosonic instrument. *Dent Traumatol* 1991;7:84-9.
- 279. Waltimo T, Siren E, Torkko H, Olsen I, Haapasalo M.** Fungi in therapy-resistant apical periodontitis. *Int Endod J* 1997;30:96-101.
- 280. Waltimo T, Kuusinen M, Järvensivu A, Nyberg P, Väänänen A, Richardson M, Salo T, Tjäderhane L.** Examination on *Candida* Spp. In refractory periapical granulomas. *Int Endod J* 2003, 36:643-7.
- 281. Walton R, Holton I, Michelich R.** Calcium hydroxide as an intracanal medication: effect on posttreatment pain. *J Endod* 2003;29:627-9.
- 282. Walton RE.** Outcomes. *J Endod*.2013;39:63-6.
- 283. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GT.** Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:56-63.
- 284. Wang Y, Zhao Y, Jia W, Yang J, Ge L.** Preliminary study on dental pulpstem cell-mediated pulp regeneration in canine immature permanent teeth. *J Endod* 2013 ;39:195-201.
- 285. Warfvinge J, Dahlen G, Bergenholtz G.** Dental pulp response to bacterial cell wall material. *J Dent Res* 1985; 64:1046 –50.

- 286. Weber C, McClanahan S, Millar G, Diener-West M, Jonson J.** The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod* 2003;29: 562-4.
- 287. West J.** Endodontic update 2006. *Journal of Estetic and Restorative Dentistry* 2006; 18: 280-300.
- 288. White RR, Hays GL, Janer LR.** Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod* 1997;23:229-31.
- 289. Whitman DH, Berry RL, Green DM.** Platelet gel: an autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;55:1294-9.
- 290. Wigler R, Kaufman AY, Lin S, Steinbock N, Hazan-Molina H, Torneck C.** Revascularization: a treatment for permanent teeth with necrotic pulp and incomplete root development. *J Endod* 2013; 39: 319-326.
- 291. Wimpenny J, Manz W, Szewzyk U.** Heterogeneity in Biofilms. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24:661-71.
- 292. Windley W 3rd, Teixeira F, Levin L, Sigurdsson A, Trope M.** Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005;31:439-43.
- 293. Witherspoon DE, Small JC, Regan JD, Nunn M.** Retrospective analysis of open apex teeth obturated with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2008; 34:1171-6.
- 294. Wu M, Bummer P, Wesselink P.** Consequences of and strategies to deal with residual post-treatment root canal infection. *Int Endod J* 2006, 39:343-56.
- 295. Xavier AC, Martinho FC, Chung A, Oliveira LD, Jorge AO, Valera MC, Carvalho CA.** One-visit versus two-visit root canal treatment: effectiveness in the removal of endotoxins and cultivable bacteria. *J Endod* 2013;39:959-64.

- 296. Yamamura T.** Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with reference to pulpal wound healing. *J Dent Res* 1985; 64:530-40.
- 297. Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, Duggan D, Zhong S, Lee SM, Texeira FB, Yamauchi M.** Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2011;37:390-7.
- 298. Yassen GH, Chu TM, Eckert G, Platt JA.** Effect of medicaments used in endodontic regeneration technique on the chemical structure of human immature radicular dentin: an in vitro study. *J Endod* 2013;39:269-73.
- 299. Yeom KH, Ariyoshi W, Okinaga T, Washio A, Morotomi T, Kitamura C, Nishihara T.** Platelet-rich plasma enhances the differentiation of dental pulp progenitor cells into odontoblasts. *Int Endod J* 2015 Feb 23. [Epub ahead of print].
- 300. Yesilsoy C, Whitaker E, Cleveland D, Phillips E, Trope M.** Antimicrobial and toxic effects of established and potential root canal irrigants. *J Endod* 1995;21:513-5.
- 301. Yokose S, Kadokura H, Tajima N.** "Platelet-derived growth factor exerts disparate effects on odontoblast differentiation depending on the dimers in rat dental pulp cells". *Cell and Tissue Research* 2004; 315:375–384.
- 302. Young CS, Abukawa H, Asrican R, Ravens M, Troulis MJ, Kaban LB, Vacanti JP, Yelick PC.** Tissue-engineered hybrid tooth and bone. *Tissue Eng* 2005;11:1599-610.
- 303. Young CS, Terada S, Vacanti JP, Honda M, Bartlett JD, Yelick PC.** Tissue engineering of complex tooth structures on biodegradable polymer scaffolds. *J Dent Res* 2002; 81:695-700.
- 304. Zamany A, Safavi K, Spångberg LS.** The effect of chlorhexidine as an endodontic disinfectant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:578–81.
- 305. Zehnder M.** Root canal irrigants. *J Endod* 2006;32:389–98.

- 306. Zhu X, Zhang C, Huang GT, Cheung GS, Dissanayaka WL, Zhu W.**
Trasplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich-plasma for regeneration. J Endod 2012;38:1604-9.
- 307. Zhu W, Zhu X, Huang GT, Cheung W, Dissanayaka WL, Zhang C.**
Regeneration of dental pulp tissue in immature teeth with apical periodontitis using platelet-rich plasma and dental pulp cells. Int Endod J 2013;46:962-970

8 ANEXOS



A quien pueda interesar:

El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, habiendo examinado el Proyecto "Evaluación clínica e histomorfológica de la regeneración pulpar en dientes inmaduros y necróticos de perros beagle; comparación de diferentes protocolos" presentado por D. Juan José Segura Egea emite el siguiente informe,

El proyecto cumple los requisitos exigidos para experimentación en sujetos humanos y en animales, y se ajusta a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Sevilla, a 31 de marzo de 2011.

EL PRESIDENTE DEL COMITE,

Fdo.: Prof. Dr. Fernando Rodríguez Fernández.

Journal section: *Integral Dentistry*
 Publication Types: *Research*

doi:10.4317/jced.51475
<http://dx.doi.org/10.4317/jced.51475>

Root canal disinfection of immature dog teeth with apical periodontitis: comparison of three different protocols

Soledad Rodríguez-Benítez¹, Carlos Stambolsky Guelfand¹, Milagros Martín-Jiménez¹, Juan-José Segura-Egea¹

¹ Department of Stomatology (Endodontic Section), School of Dentistry, University of Sevilla, C/ Avicena s/n, 41009-Sevilla, Spain

Correspondence:
 Facultad de Odontología
 C/ Avicena s/n, 41009-Sevilla, Spain
segurajj@us.es

Received: 25/01/2014
 Accepted: 01/05/2014

Rodríguez-Benítez S, Stambolsky Guelfand C, Martín-Jiménez M, Segura-Egea JJ. Root canal disinfection of immature dog teeth with apical periodontitis: comparison of three different protocols. J Clin Exp Dent. 2014;6(4):e357-63.

<http://www.medicinaoral.com/odo/volumenes/v6i4/jcedv6i4p357.pdf>

Article Number: 51475	http://www.medicinaoral.com/odo/indice.htm
© Medicina Oral S. L. C.I.F. B 96689336 - eISSN: 1989-5488	
eMail: jced@jced.es	
Indexed in:	
Pubmed	
Pubmed Central® (PMC)	
Scopus	
DOI® System	

Abstract

Objectives: The present in vivo study was designed to assess the efficacy of 3 root canal disinfection protocols in immature dog teeth with apical periodontitis (AP).

Material and Methods: Forty immature premolars with pulp necrosis and AP of five Beagle dogs were used. Three experimental disinfection protocols were established. After irrigation with 40 ml 5.25% sodium hypochlorite using the Endovac system, in Group 1 canals were flushed with QMix solution; in Group 2, canals were flushed with QMix solution and 2% chlorhexidine gel dressing was placed for two weeks; and in Group 3, triantibiotic paste dressing was placed for two weeks. Canals were sampled after periapical lesions were radiographically visible (S1), after the first disinfection session (S2) and, in groups 2 and 3, after dressing (S3).

Results: After the first session of the disinfection protocol (S2), there was significant ($p < 0.05$) bacterial reduction in the three experimental groups. Microorganisms were absent in 100% of S2 samples in groups 1 and 2, and in 75% of group 3 ($p > 0.05$). After dressing, 87.5% of the S3 samples showed increased bacterial count: in group 2, CFU counts (median = 891) were significantly higher than in group 3 (median = 18) ($p = 0.03$).

Conclusions: In immature dog teeth with AP, root canal irrigation using QMix solution, with or without chlorhexidine gel dressing, or a triantibiotic paste dressing, provides the same level of disinfection than irrigation with 5.25% sodium hypochlorite alone in only one session.

Key words: *Apical periodontitis, chlorhexidine, Endovac, immature teeth, QMix solution, root canal disinfection, triantibiotic paste*

Introduction

The main etiologic factor of pulp and periradicular pathosis are microorganisms invading into dentin and further into the root canal system of the teeth (1). Therefore, the goal of endodontic therapy is to eliminate the bacteria and their products and by-products from the root canal

and the infected dentin. This is particularly important in teeth with pulp necrosis and periapical injury (2).

Because of the anatomic complexity of root canal systems, organic waste, pulp tissue remnants, inorganic debris and bacteria remain into the root canals after mechanical preparation alone (3). For that reason, irriga-

tion solutions are essential for successful debridement, cleaning and disinfection of the root canals after mechanical shaping procedures. However, there are cases in which bacteria are left in the canal system even after a thoroughly instrumentation and irrigation of the root canals (2). This risk is higher when the biomechanical preparation is more difficult, such as in immature teeth with apical periodontitis with thin divergent or parallel dentinal walls (4).

Taking into account the difficulty of root canal system disinfection in immature teeth and considering the polymicrobial nature of endodontic infection, it has been proposed the use of a mixture of antibiotics dressing [ciprofloxacin, metronidazole and minocycline] to reduce the diverse root canal system microflora (5). But considering that this intracanal dressing can produce crown discoloration (6), an alternative protocol for immature teeth with apical periodontitis using apical negative pressure irrigation [EndoVac; Discus Dental, Culver City, CA] has been suggested (7). This new protocol has been shown to provide similar bacterial reduction that apical positive pressure irrigation plus triantibiotic intracanal dressing in immature dog teeth with apical periodontitis (7).

Recently, a new root canal irrigant [QMix, Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK] containing a mixture of the bisbiguanide antimicrobial agent chlorhexidine, the calcium-chelating agent EDTA, and a surfactant detergent, have been found to be effective for smear layer removal and against bacterial biofilms (8). QMix solution should be considered as a potential new approach for immature teeth with apical periodontitis.

The present *in vivo* study was designed to compare the efficacy of 3 different protocols for root canal disinfection in immature dog teeth with apical periodontitis: 5.25% sodium hypochlorite and apical negative pressure irrigation combined with QMix alone, QMix plus chlorhexidine gel or triantibiotic paste. The null hypothesis tested was that there are no differences in the ability of these three protocols to reduce the root canal microflora.

Material and Methods

The study protocol was reviewed and approved by the Ethical Committee of the University of Sevilla [Spain]. Forty double-rooted second and third maxillary and mandibular immature premolars of five Beagle dogs, approximately 5 months old and weighing approximately 11 kg each, were selected for this study. The teeth were randomly divided into 3 experimental groups, 10 teeth each one, and two control groups, 5 positive controls [infected but untreated] and 5 negative controls.

Before the start of the study, all teeth were examined radiographically [Kodak RVG 6100® Digital Radiography System, Carestream Health, Inc. Rochester, NY,

USA] using radiograph paralleling devices [Dentsply Rinn, Elgin, IL, USA] to confirm incomplete root formation and open apices (Fig. 1).

The dogs were preanesthetised with an endovenous injection of tiletamine hydrochloride: zolazepam hydrochloride [Zoletil 100, 0.1 mL/kg body wt.; Virbac España, S.A., Spain] and were kept with inhalation anesthesia with Isoflurane [Isoflo, Abbott Laboratories Ltd., Berkshire, UK.]. Local anesthetic Lidocain [Lidocaína hiperbárica Braun 5%, B. Braun Medical S.A, Barcelona, Spain] was also used during all procedures to prevent the animals from suffering.

The aim of the first treatment session was to infect the pulps of randomly selected immature dog teeth. Coronal accesses were done with a round diamond sterilized bur #12, at high speed with copious water cooling under nonaseptic conditions. Then, the pulp was disrupted with a #20 sterile stainless steel Hédstrom file [Colorex, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland] and the root canals were left exposed to the oral cavity for 7 days to allow microbial contamination. This procedure was repeated for each individual dog (Fig. 1). The coronal accesses were sealed with Cavit [ESPE, Norristown, PA, USA] with no intracanal dressing to induce apical periodontitis, which occurred within 15 to 25 days.

At the end of this period, radiographs were taken to confirm periapical radiolucencies (Fig. 1). Once the lesions were radiographically visible, 30 teeth were randomly assigned to 3 experimental groups, 10 teeth each one, according to the intracanal disinfection protocol (Fig. 2). Ten teeth were assigned to the control groups [5 negative and 5 positive].

The intracanal disinfection protocol carried out in each of the experimental groups was as follows: all teeth were firstly disinfected with 40 ml 5.25% sodium hypochlorite [NaOCI] using the apical negative pressure irrigation system Endovac [Endovac; Discus Dental, Culver City, CA, USA] (7), then Group 1 received a final flush of QMix; Group 2 received a flush of Qmix, followed by intracanal dressing with 2% chlorhexidine gel; Group 3 received an intracanal dressing with a triantibiotic paste consisting of metronidazole, ciprofloxacin, and minocycline. The three experimental groups were tested in each animal, and the experimental protocols were performed in alternate quadrants in a randomized manner.

All teeth were isolated with a rubber dam, and the operative field was disinfected with 30% hydrogen peroxide until no bubbling of the peroxide occurred. All surfaces were then coated with tincture of iodine and allowed to dry. The temporary restoration was removed with a round sterilized bur #12 in a high-speed handpiece. Sterile saline was then used to flush any debris from the pulp chamber. Sterile cotton pellets were then used to dry the pulp chamber before the placement of 1 ml of the sample fluid Schaedler Anaerobe Broth with hemin and

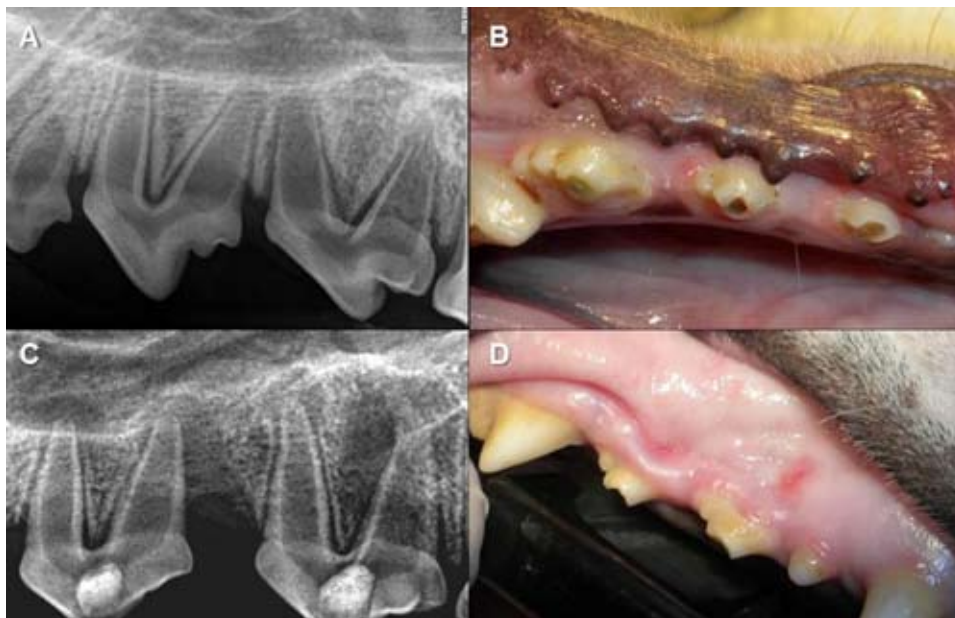


Fig. 1. A) Initial periapical radiograph to confirm incomplete root formation and open apices; B) Root canals were left exposed to the oral cavity to allow microbial contamination; C) Periapical radiograph confirming apical periodontitis; D) Sinus fistula in relation with a tooth with chronic apical periodontitis.

vitamin K1 [Oxoid TV5008D, Oxoid Ltd., U.K.] into the mesial canal of each premolar with a sterile tuberculin syringe inserted 1 mm short of the estimated root canal length.

The fluid was then agitated with a sterile stainless steel K-file #20 [Colorinox. Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland] (7). Any excess of sample fluid in the chamber was removed so that only the root canals remained filled. The sample fluid was then soaked from the canals with a sterile paper point [Protaper F2, Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland] placed 1 mm short of the estimated root canal length and transferred to the sample fluid vial. This one constituted the first sample [S1] for groups 1, 2, 3 and for the positive control group. All samples were immediately forwarded to a certified laboratory [Laboratorio Veterinario Garfia S.L., Córdoba, Spain] for the microbiological analysis.

Then, the root canals were washed with 10 ml of sterile saline to eliminate the sample fluid. The working length [WL] was established 1 mm short of the radiographic apex, and the canals of the 3 experimental groups were disinfected with 40 ml of 5.25% sodium hypochlorite [NaOCl] using the apical negative pressure irrigation system Endovac [Endovac; Discus Dental, Culver City, CA, USA]. Taking into account that they were being treated immature teeth with open apices, the EndoVac protocol was modified to avoid the extrusion of the sodium hypochlorite to the apical tissues, as described by Cohenca *et al.* (7), briefly: first was fit the apical size of the canal and then, 40 ml 5.25% sodium hypochlorite [NaOCl] was delivered using the open-ended macrocannula in an up and down movement from a point just below the coronal orifice of the canal to the WL. To

ensure that the canal persisted totally filled with the irrigant solution and no air was drawn into the canal space, the macrocannula was removed from the canal being the pulp chamber plenty of irrigant. The canals were left filled with NaOCl for 60 seconds and then were irrigated with 10 ml sterile saline solution to eliminate the rests of sodium hypochlorite and dried with sterile paper points (7).

- Group 1: QMix solution

Each canal was then flushed with 1 ml of QMix solution [Dentsply/Tulsa Dental, Johnson City, TN, USA] (8) using a sterile tuberculin syringe. The canals were left filled with the solution for 90 seconds [according to the manufacturer recommendation] and then irrigated again with sterile saline and dried with sterile paper points. Approximately 1 ml of sample fluid Schaedler Anaerobe Broth was delivered into the canals using a sterile tuberculin syringe inserted at the WL. Any excess of sample fluid in the chamber was removed so that only the root canals remained filled. The fluid was then agitated with a size #20 sterile stainless steel file. The sample fluid was then soaked from the canals with a sterile absorbent paper point placed in the mesial root at the WL and transferred to the sample fluid vial. This constituted the second sample [S2] for group 1. All samples were immediately forwarded to the laboratory.

All canals received a final irrigation with saline solution to eliminate the sample fluid and were dried with sterile paper points. A sterile cotton pellet was placed in the pulp chamber and the coronal access was double sealed with IRM [Caulk Co., Division Dentsply International Inc., Milford, DE, USA] and Vitrebond glass ionomer cement [3M/ESPE, St. Paul, MN, USA].

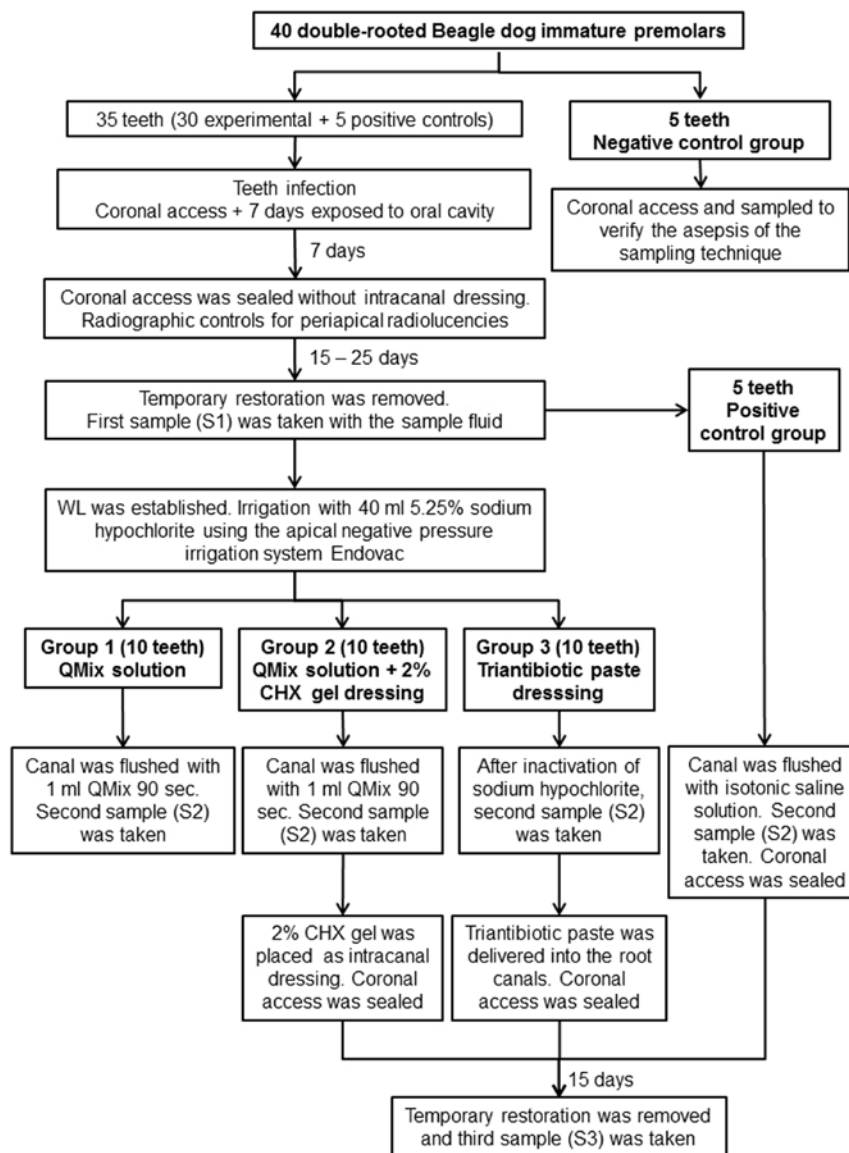


Fig. 2. Flow chart showing the different steps of the experimental protocols. CHX: chlorhexidine. WL: working length.

- Group 2: QMix solution + 2% chlorhexidine gel dressing

The teeth from Group 2 were disinfected in two sessions. The canals were irrigated with 1 ml of QMix solution with a sterile tuberculin syringe. The solution was left in the canals for 90 seconds. Then the QMix solution was eliminated with 10ml of saline solution with a sterile tuberculin syringe and the root canals were filled with the sample fluid Schaedler Anaerobe Broth with an insulin syringe. The fluid was agitated with a sterile stainless steel #20 K-file. A sterile paper point was placed in the mesial canals at working length to impregnate with the sample fluid and put it in the sample bottle. This constituted the second sample [S2] for Group 2.

Then, canals received a final irrigation with 10 ml of

saline solution and were dried with sterile paper points. Immediately, 2% chlorhexidine gel [Consepsis, Ultra-dent Products Inc., South Jordan, UT, USA] was placed as intracanal dressing using a #4 lentulo paste carrier [Densply Maillefer, Ballaigues, Switzerland]. All excess of chlorhexidine gel was removed and a sterile cotton pellet was placed into the pulp chamber. The coronal access was temporary restored with a doubled seal of Cavit and Vitrebond. The intracanal dressing was left for 15 days.

In a second session, all teeth from this group were isolated with a rubber dam in aseptic conditions, as described above. The coronal seal was removed with sterile high speed diamond round bur under copious water cooling followed by flushing of the pulp chamber with 20 ml

saline solution to eliminate the chlorhexidine intracanal dressing. Each canal was then flushed with 2.5 ml of the combination of 3% Tween 80 [P4780 Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain] and 0.3% L- α -lecithin solution to neutralize the chlorhexidine residual effect (9). The root canals were then irrigated again with saline to eliminate the Tween 80 solution. Then 1 ml of sample fluid Schaedler Anaerobe Broth was delivered into the mesial canals using a sterile insulin syringe. The fluid was then agitated with a size #20 sterile stainless steel file. The sample fluid was then soaked from the canals with a sterile absorbent paper point placed in the mesial root at the WL and transferred to the sample fluid vial. This constituted the third sample [S3] for Group 2. All canals received a final irrigation and were sealed as previously explained in group 1.

- Group 3: Triantibiotic paste

The teeth from Group 3 were also disinfected in two sessions. In the first treatment session, after sodium hypochlorite irrigation, canals were flushed with 2.5 ml 5% sodium thiosulfate [Sigma-Aldrich Quimica SA, Madrid, Spain] to neutralize the sodium hypochlorite and then irrigated again with 10 ml of sterile saline. The sample fluid Schaedler Anaerobe Broth was delivered in the mesial canals and agitated with a sterile stainless steel #20 K-file. The fluid was then soaked from the canal with a sterile paper point and placed in the sample vial. This constituted the second sample [S2] for group 3. All canals received a final irrigation with 10 ml sterile saline solution to eliminate the sample fluid.

A triantibiotic paste, prepared immediately before the treatment by mixing ciprofloxacin, metronidazole and minocycline with sterile distilled water, at a concentration of 20 mg of each antibiotic, was delivered into the root canal with a #4 lentulo paste carrier. All excess of the triantibiotic paste in the pulp chamber was removed and a sterile cotton pellet was placed. The coronal access was then restored with a double sealed of Cavit and Vitrebond. The intracanal dressing was left in the canals during 15 days.

At the second treatment session, two weeks later, teeth were isolated with a rubber dam as previously described. The coronal seal was removed with sterile high speed diamond round bur under copious water cooling followed by flushing of the pulp chamber with 20 ml saline solution to eliminate the triantibiotic intracanal dressing. After that, 1 ml sample fluid Schaedler Anaerobe Broth was delivered into the mesial canals using a sterile insulin syringe. The fluid was then agitated with a size #20 sterile stainless steel file. The sample fluid was then soaked from the canals with a sterile absorbent paper point placed in the mesial root at the WL and transferred to the sample fluid vial. This constituted the third sample [S3] for Group 3. All canals received a final irrigation and were sealed as previously explained in group 1.

- Control groups

As negative control group, five premolars diagnosed with a normal healthy pulp and no radiographic signs of apical periodontitis were accessed and sampled identically to the experimental groups. These served as controls to verify the effectiveness and asepsis of the sampling technique.

Positive control group was also constituted by five premolars that were infected and sampled at S1. Then, were left untreated and irrigated only with 40 ml of isotonic saline solution and, finally, sampled at S2 and S3.

- Microbiological processing

Samples S1, S2 and S3 were diluted in saline solution until reaching 1/10, 1/100, 1/1000, and 1/10.000 final concentrations. Then, 1 ml of each dilution were seeded using the Westergreen technique in the culture medium, Schaedler Anaerobe Agar with sheep blood [supplemented with hemin and K1 vitamin] [Oxoid PB5034A, Oxoid Ltd., U.K.] for detection of anaerobic growth bacteria.

The dishes were placed in a jar with an anaerobiosis generator [Anaerogen Compact, Oxoid AN0010, Oxoid Ltd., U.K.] and were incubated at 37°C for 10 days. After the incubation period, the number of colony forming units CFU was counted with a colony counter [IUL Colony Counter, IUL S.A., Barcelona, Spain].

Throughout the experimental phase, all the dogs were daily monitored for signs of pain associated with the dental procedures.

- Statistical analysis

Differences were assessed between three time points [S1-S2, S2-S3, and S1-S3]. A log transformation of each CFU count was performed to normalize the data before statistical evaluation because of the high range of bacterial counts.

Data were analyzed statistically by the U-Mann-Whitney test, and a significant level of 5% was set for all the analysis.

Results

Four teeth, two in group 2 and two in group 3, were lost due to the initial infection procedure, reducing the sample size to 8 teeth in both groups. No bacterial growth was observed from samples taken from the teeth serving as negative controls. On the contrary, bacteria were present in 100% of S1, S2 and S3 samples taken in positive controls teeth.

In the three experimental groups, all S1 samples showed bacterial growth (Table 1). Colony-forming units [CFU] counts ranged from 27 to 270,000 [median 2,880] in group 1, from 1,188 to 3,456,000 [median 22,860] in group 2, and from 9 to 3,456,000 [median 25,200] in group 3. There was no statistically significant difference between the groups [$p > 0.05$].

After the first session of the disinfection protocol, there

was significant [$p < 0.05$] bacterial reduction from S1 to S2 in the three experimental groups. Microorganisms were absent in 100% of S2 samples in groups 1 and 2, and in 75% of the teeth of group 3 [range 0 to 99 cfu, median 0], but there was no statistically significant difference between the groups [$p > 0.05$].

Finally, the S3 samples, taken after dressing in groups 2 and 3, showed an increased bacterial count. In both groups, 87.5% of teeth showed bacterial growth. In group 2, CFU counts [range = 0 - 18,360; median 891] were significantly higher than in group 3 [range = 0 - 1,908; median 18] [$p = 0.03$], indicating that triantibiotic paste dressing was more effective in bacterial reduction than chlorhexidine dressing.

There were significant differences between S2 samples of group 1 and 2 and S3 samples of group 2 and 3 [$p < 0.05$], indicating that 40 ml 5.25% sodium hypochlorite, using Endovac system, plus a final irrigation with 1 ml QMix solution, provides a higher bacterial reduction than two treatment sessions with intracanal dressing of 2% chlorhexidine gel or triantibiotic paste.

Discussion

In this study, three different disinfection protocols have been assessed in vivo in immature dog teeth with pulp necrosis and apical periodontitis. The results showed that root canal irrigation with 5.25% sodium hypochlorite alone, using Endovac system in one session, provides the same level of disinfection than when using additionally a QMix solution, with or without chlorhexidine gel dressing, or a triantibiotic paste dressing.

In order to achieve the success of the endodontic therapy, it is required to eliminate bacteria from all infected canals, especially in teeth with pulp necrosis and periapical lesions (2). Moreover, periapical repair and tissue healing only can occur after reducing sufficiently the microbial load in root canals (10). Nowadays, most of disinfection protocols include conventional irrigation with 4-6% sodium hypochlorite, with or without dressing with a triantibiotic paste (11), and apical negative pressure irrigation (12). It has been demonstrated that apical negative pressure irrigation eliminates more microorganisms from the root canals than the traditional

apical positive irrigation (7,12).

Different disinfection techniques have been proposed for immature teeth with apical periodontitis, however it has not been definitively established which one provides the best results (13). Most of the irrigation protocols include sodium hypochlorite solution due to its effectiveness eliminating organic tissue and its broad antibacterial spectrum. Sodium hypochlorite neutralizes bacteria, fungus, spores and viruses [HIV, Hepatitis A and B] (14). The apical negative pressure irrigation system Endovac, appears to be safe to use in immature teeth because it prevents the irrigation solution to extrude to the periapical tissues (15). Some authors recommend conducting a final irrigation with QMix solution to eliminate the smear layer from the dentin walls and to provide additional disinfection because QMix contains EDTA and chlorhexidine (8). The QMix solution provides superior efficacy eliminating inorganic wastes and erodes less dentin than 17% EDTA solution (8). In this study, the disinfection with 40 ml 5.25% sodium hypochlorite, using the apical negative pressure system Endovac, plus a final irrigation with QMix solution in a unique session, eliminates 100% of microorganisms in immature dog premolars with apical periodontitis. Nevertheless, root canal irrigation with 5.25% sodium hypochlorite, using EndoVac system, alone, achieves similar results.

It has been claimed that the use of medical dressings in the endodontic procedure might reduce the bacterial flora below the limits reached only with the endo treatment, mainly because they access to areas of the root canal system where irrigation cannot (16). Thus, several investigators (16,17) have found that the percentage of success in infected root canals decreases when there is no use of intracanal dressing. Therefore, chlorhexidine has been used not only as irrigant but also as intracanal dressing (18), because it is bactericide, has sustantivity and low toxicity, and adapts to the irregularities of the root canal (19), but it cannot solve the organic tissue (20-22). After exposing the root canal to chlorhexidine for at least one week, the medicament has a residual antimicrobial activity of 72 to 168 hours (18), but the residual gel makes the sealing of the root canal more difficult during obturation (23). Alternatively, triantibiotic paste

Table 1. Colony-forming units counts in the first (S1), second (S2) and third (S3) samples collection of groups 1 (QMix solution; n = 10), 2 (QMix solution + 2% chlorhexidine gel dressing, for 15 days; n = 8), and 3 (triantibiotic paste, for 15 days; n = 8).

Sample collection	Group 1			Group 2			Group 3		
	Median	Q1 - Q3	Min - Max	Median	Q1 - Q3	Min - Max	Median	Q1 - Q3	Min - Max
S1	2880	311 - 5400	27 - 270000	22860	9117 - 94050	1188 - 3456000	25200	340 - 3456000	9 - 3456000
S2*	0	0-0	0-0	0	0-0	0-0	0	0 - 5	0 - 99
S3**	--	--	--	891	340 - 7785	0 - 18360 [#]	18	9 - 23	0 - 1908 ^{§#}

Q1, first quartile; Q3, third quartile.

*S2 groups 1, 2, and 3; $p > 0.05$; U-Mann-Whitney test.

**S3 groups 2 and 3; $p < 0.05$; U-Mann-Whitney test.

§S2 group 3 vs S3 group 3; $p > 0.05$; U-Mann-Whitney test.

[#]S2 groups 1 and 2 vs S3 groups 2 and 3; $p < 0.05$; U-Mann-Whitney test.

[ciprofloxacin, metronidazole and minocycline] dressing has been used to reduce the number of bacteria in the root canal (24,25). But the use of antibiotic pastes could result in development of strain resistance (26,27), allergic reactions (28) and decolorations (29,30).

On the contrary, in the present study the disinfection with sodium hypochlorite, using Endovac system, plus a final irrigation with QMix solution, provides a significantly higher bacterial reduction than two treatment sessions with intracanal dressing of 2% chlorhexidine gel or triantibiotic paste. This result suggests that bacteria reduction is higher when treatment is carried out in only one session, probably because, as it can be seen table 1, there is a slight bacteria growth when the intracanal dressing is left in the canals for 15 days. This could be the result of an apical bacterial micro leakage and as an effect of the flushing of the dressing through the open apices. However, triantibiotic paste dressing was significantly more effective in bacterial reduction than chlorhexidine dressing. Thereafter, if an intracanal dressing must be used, it is more effective to leave the triantibiotic paste than 2% chlorhexidine gel.

The results of the present study demonstrated that, root canal irrigation with 5.25% sodium hypochlorite alone, using Endovac system, in only one session, provides the same level of disinfection than when using additionally a QMix solution, with or without chlorhexidine gel dressing, or a triantibiotic paste dressing. It can be concluded that neither QMix solution or intracanal dressing with chlorhexidine gel or triantibiotic paste, improve root canal disinfection of immature dog teeth with apical periodontitis.

References

1. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The effects of surgical exposures of dental pulps in germ-free and conventional laboratory rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1965;20:340-9.
2. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev.* 1994;7:462-78.
3. Siqueira JF Jr, Lima KC, Magalhães FA, Lopes HP, de Uzeda M. Mechanical reduction of the bacterial population in the root canal by three instrumentation techniques. *J Endod.* 1999;25:332-5.
4. Siqueira JF Jr, Rôças IN. Polymerase chain reaction-based analysis of microorganisms associated with failed endodontic treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;97:85-94.
5. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, Iwaku M, Hoshino E. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline in situ. *Int Endod J.* 1996;29:118-24.
6. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J.* 2009;42:84-92.
7. Cohenca N, Heilborn C, Johnson JD. Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:42-6.
8. Dai L, Khechen K, Khan S, Gillen B, Loushine BA, Wimmer CE, Gutmann JL, Pashley D, Tay FR. The effect of QMix, an experimental antibacterial root canal irrigant, on removal of canal wall smear layer and debris. *J Endod.* 2011;37:80-4.

9. Zamany A, Spångberg LS. An effective method of inactivating chlorhexidine. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93:617-20.
10. Nair PN. On the causes of persistent apical periodontitis: a review. *Int Endod J.* 2006;39:249-81.
11. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J.* 2009; 42:1118-26.
12. Nielsen BA, Craig Baumgartner J. Comparison of the Endovac system to needle irrigation of root canals. *J Endod.* 2007;33:611-5.
13. Zhang W, Yelick PC. Vital pulp therapy-current progress of dental pulp regeneration and revascularization. *Int J Dent.* 2010;2010:856087.
14. Siqueira JF Jr, Rôças IN, Favieri A, Lima KC. Chemomechanical reduction of the bacterial population in the root canal after instrumentation and irrigation with 1%, 2,5% and 5,25% sodium hypochlorite. *J Endod.* 2000;26:331-34.
15. Mitchell RP, Baumgartner JC, Sedgley CM. Apical extrusion of sodium hypochlorite using different root canal irrigation systems. *J Endod.* 2011;37:1677-81.
16. Messer HH, Chen RS. The duration of effectiveness of root canal medicaments. *J Endod.* 1984;10:240-5.
17. Behnen MJ, West LA, Liewehr FR, Buxton TB, McPherson JC 3rd. Antimicrobial activity of several calcium hydroxide preparations in root canal dentin. *J Endod.* 2001;27:765-7.
18. Weber CD, McClanahan SB, Miller GA, Diener-West M, Johnson JD. The effect of passive ultrasonic activation of 2% chlorhexidine or 5.25% sodium hypochlorite irrigant on residual antimicrobial activity in root canals. *J Endod.* 2003;29:562-4.
19. Barthel C, Zimmer S, Zilliges S, Schiller R, Göbel UB, Roulet JF. In situ antimicrobial effectiveness of chlorhexidine and calcium hydroxide gel and paste versus gutta-percha points. *J Endod.* 2002;28:427-30.
20. White RR, Hays GL, Janer LR. Residual antimicrobial activity after canal irrigation with chlorhexidine. *J Endod.* 1997;23:229-31.
21. Baca P, Mendoza-Llamas ML, Arias-Moliz MT, Gonzalez-Rodríguez MP, Ferrer-Luque CM. Residual effectiveness of final irrigation regimens on *Enterococcus faecalis*-infected root canals. *J Endod.* 2011;37:1121-3.
22. Alves FR, Almeida BM, Neves MA, Moreno JO, Rôças IN, Siqueira JF Jr. Disinfecting oval-shaped root canals: effectiveness of different supplementary approaches. *J Endod.* 2011;37:496-501.
23. Lenet BJ, Komorowski R, Wu XY, Huang J, Grad H, Lawrence HP, Friedman S. Antimicrobial substantivity of bovine root dentin exposed to different chlorhexidine delivery vehicles. *J Endod.* 2000;26:652-5.
24. Trope M. Treatment of the immature tooth with a non-vital pulp and apical periodontitis. *Dent Clin North Am.* 2010;54:313-24.
25. Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, Watanabe S, Lodi CS, Cintra LT, Bernabé PF. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *J Endod.* 2012;38:91-4.
26. Greenstein G, Polson A. The role of local drug delivery in the management of periodontal diseases: a comprehensive review. *J Periodontol.* 1998;69:507-20.
27. Slots J. Selection of antimicrobial agents in periodontal therapy. *J Periodontol Res.* 2002;37:389-98.
28. Bhalla M, Thami GP, Singh N. Ciprofloxacin-induced erythema nodosum. *Clin Exp Dermatol.* 2007;32:115-6.
29. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, Park JW, Jung IY. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod.* 2010;36:1086-91.
30. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, Bowles WR, McClanahan SB. Challenges in regenerative Endodontics. A case series. *J Endod.* 2010;36:536-41.

Conflict of Interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Pulp Revascularization of Immature Dog Teeth with Apical Periodontitis Using Triantibiotic Paste and Platelet-rich Plasma: A Radiographic Study

Soledad Rodríguez-Benítez, DDS, MSc,* Carlos Stambolsky, DDS, MSc, PhD,*
 José L. Gutiérrez-Pérez, MD, DDS, PhD,[†] Daniel Torres-Lagares, DDS, PhD,*
 and Juan José Segura-Egea, MD, DDS, PhD*

Abstract

Introduction: This study evaluates radiographically the efficacy of 4 revascularization protocols in necrotic-infected immature dog teeth with apical periodontitis (AP). **Methods:** Forty double-rooted immature premolar teeth from 4 female beagle dogs aged 5 months were used. Four teeth were left untouched as negative controls; the other 36 teeth were infected to develop pulp necrosis and AP following different treatment protocols. Four teeth were left untreated and assigned to the positive control group, and the last 28 teeth were randomly assigned into 4 experimental groups of 8 teeth: A1, sodium hypochlorite (NaOCl) + a blood clot; A2, NaOCl + platelet-rich plasma (PRP); B1, NaOCl + modified triantibiotic paste (mTAP) + a blood clot; and B2, NaOCl + mTAP + PRP. Teeth were monitored radiographically for 6 months regarding healing of periapical radiolucencies, thickening of the dentinal walls, and apical closure of roots. **Results:** Significant differences ($P < .05$) between the 4 groups were evident in the percentage of teeth showing improvement of periapical radiolucencies (62.5%), continued radiographic thickening of radicular walls (53.1%), radiographic apical closure (43.8%), and deposition of hard tissue on radicular dentin walls (53.1%). Group B2 showed maximal improvement in the 3 variables assessed ($P < .05$). Group A1 showed the minimum percentages in the 3 parameters assessed ($P < .05$). **Conclusions:** These results suggest that an intracanal dressing of mTAP and the use of PRP as scaffold improves the success rate of the revascularization procedure. (*J Endod* 2015; ■:1–6)

Key Words

Apical negative pressure irrigation, immature tooth, mineral trioxide aggregate, platelet-rich plasma, pulp regeneration, pulp revascularization, scaffold, triantibiotic paste

In the last years, revascularization procedures have been proposed to treat immature permanent teeth with necrotic pulp tissue and/or apical periodontitis/abscess (1). Revascularization is a conservative and effective method for inducing maturogenesis in necrotic immature teeth, increasing thickening of the canal walls by deposition of hard tissue, and encouraging continued root development (2). In this endodontic therapy, the immature permanent tooth is not mechanically cleaned to its full length but is copiously irrigated and dressed with antimicrobial agents, which is the most important aspect of the revascularization procedure (1).

Several disinfection protocols have been proposed in the revascularization treatment including conventional irrigation with sodium hypochlorite (NaOCl) in combination of triantibiotic paste (TAP) (a mixture of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline) (3, 4) and the intracanal dressing with calcium hydroxide (5). Most recently, irrigation with apical negative pressure (ANP) has shown similar bacterial reduction to conventional irrigation with NaOCl plus intracanal dressing with TAP (6, 7).

After disinfection of the root canal, the induction of a hemorrhage to form a blood clot into the canal to act as a scaffold aids the ingrowth of new tissue into the empty canal space (4). The blood clot serves as a matrix for the migration of progenitor cells from the apical papilla into the canal (4). Other potential scaffolds for regenerative endodontic treatment regimens have been proposed such as collagen solutions (4, 8) and platelet-rich plasma (PRP) (9, 10).

Previous radiographic studies have shown thickening of the root canal walls and subsequent apical closure (1, 5, 9, 11–13) of immature permanent human teeth with apical periodontitis after a systematic disinfection of the canal space and filling with a scaffold.

This study aims to assess radiographically the ability of 4 different protocols, combining 2 type of scaffolds (blood clot and PRP) and 2 disinfection procedures (NaOCl with ANP using the EndoVac system [Discus Dental, Culver City, CA] and TAP) to obtain revascularization of necrotic-infected immature dog teeth with apical periodontitis.

Materials and Methods

This study was approved by the ethical committee of our university. Forty double-rooted premolar teeth from 4 female beagle dogs aged 5 months were randomly divided into 4 experimental groups of 8 teeth each (16 roots), a positive control group (4 teeth, 8 roots), and a negative control group (4 teeth, 8 roots).

From the *Department of Stomatology, School of Dentistry and [†]Virgen Macarena University Hospital, Andalusian Health Service, University of Sevilla, Sevilla, Spain. Address requests for reprints to Dr Juan J. Segura-Egea, Facultad de Odontología, Universidad de Sevilla, C/ Avicena s/n, 41009 Sevilla, Spain. E-mail address:

segurajj@us.es

0099-2399/\$ - see front matter

Copyright © 2015 American Association of Endodontists.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.joen.2015.05.002>

Basic Research—Biology

Before any interventions, the involved teeth were radiographed (Kodak RVG 6100 Digital Radiography System; Carestream Health, Inc, Rochester, NY) using radiograph paralleling devices (Dentsply Rinn, Elgin, IL) to confirm incomplete root formation and open apices. These radiographic aids were used for all subsequent radiographs to improve the alignment and position of the films and x-ray beam for direct comparison of the radiographs with minimal distortion or magnification.

All interventions were made under general anesthesia (induction by zolazepam hydrochloride [Zoletil 100; Virbac España, SA, Esplugues de Llobregat, Barcelona, Spain] 0.1 mL/kg intravenously and intubation and maintenance with isoflurane [Isoflo; Abbott Laboratories Ltd, Berkshire, UK]) supplemented with local anesthesia (Lidocaine 5%; B Braun Medical, SA, Barcelona, Spain).

In the first treatment session, the teeth of the negative control group were left untouched for natural development for comparison with the experimental and positive control teeth. The pulps of 32 experimental and 4 positive control teeth were infected according to the protocol described previously by Leonardo et al (14). The pulps were mechanically exposed using a #12 diamond bur in a high-speed handpiece with copious saline solution. Then, each pulp was disrupted with a #20 sterile stainless steel endodontic hand file (Colorinox; Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland). This procedure was repeated individually on each dog, and the root canals were left exposed to the oral cavity for 7 days to allow microbial contamination. The animals were given analgesics (butorphanol tartrate [Torbugesic 0.2 mg/kg; Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA]) postoperatively after this and all operative procedures and were monitored in the postoperative period. After 1 week, the coronal access was sealed with Cavit (ESPE, Norristown, PA), without intracanal dressing. The teeth were monitored radiographically by using paralleling devices until there was radiographic evidence of apical periodontitis (AP), which occurred within 15–25 days. Once the injuries were radiographically visible, 32 teeth were randomly assigned into 4 groups of 8 teeth, each following different treatment protocols, and 4 teeth were assigned to the positive control group in which no further treatment was performed.

Under general and local anesthesia, all previously infected teeth were isolated with a rubber dam, and the operative field was disinfected with 30% hydrogen peroxide until no bubbling occurred. All surfaces were then coated with tincture of iodine and allowed to dry. The temporary restoration was removed with a sterilized round bur #12 in a high-speed handpiece. Using a #40 K-file (Colorinox, Dentsply Maillefer), the working length was established radiographically 1 mm short of the radiographic apex. Then, 4 teeth were left with no further treatment as positive controls, and each experimental group was treated according to 4 different protocols as follows:

1. *Group A1*: Disinfection with NaOCl and a blood clot as the scaffold
2. *Group A2*: Disinfection with NaOCl and PRP as the scaffold
3. *Group B1*: Disinfection with NaOCl and a modified TAP (mTAP) dressing during 15 days and a blood clot as the scaffold
4. *Group B2*: Disinfection with NaOCl and mTAP dressing and PRP as the scaffold

Group A1: NaOCl/Blood Clot

The canals were disinfected with 20 mL 1.25% NaOCl (Sigma-Aldrich Química SA, Madrid, Spain) using the ANP irrigation Endovac system (Discus Dental). Taking into account that immature teeth with open apices were being treated, the ANP irrigation Endovac system was modified to avoid the extrusion of the NaOCl solution to the apical tissues as described by Cohenca et al (7). Canals were irrigated using

the macrocannula only after being gauged to fit the apical size of the root.

The canals were left filled with NaOCl solution 1.25% for 3 minutes and then irrigated with 10 mL sterile saline solution to remove the rest of the NaOCl. Then, a final irrigation was accomplished using 1 mL 17% EDTA (Ultradent Products Inc, South Jordan, UT) for 60 seconds (8).

The root canals were dried with sterile paper points (Protaper F3; Dentsply, Tulsa, OK), and a sterile #30 K-file (Colorinox; Dentsply Maillefer, Ballaigues, Switzerland) was used to stimulate bleeding for clot formation. The bleeding was stopped at the level of the cemento-enamel junction by using a small cotton pellet soaked with sterile saline. After 10 minutes, the blood clot was formed. Over the clot, a collagen sponge (Collacote; Integra Lifesciences Corporation, Plainsboro, NJ) was set. Next, a 4-mm plug of mineral trioxide aggregate (MTA) (ProRoot; Dentsply Tulsa Dental, Johnson City, TN) was inserted into the canals using an MTA carrier (Hartzell & Son, Concord, CA) to seal the root canal at the cervical level. The MTA plug was verified radiographically. Then, a moist cotton pellet was placed over the MTA, and the access cavity was double sealed using IRM (Dentsply Caulk, Milford, DE) and glass ionomer cement (Vitrebond; 3M ESPE, Seefeld, Germany).

Group A2: NaOCl/PRP

The disinfection protocol and the final irrigation with EDTA were the same as for group A1. Then, the root canals were dried with sterile paper points ProTaper F3, and PRP was used as the scaffold instead of a blood clot. The PRP was obtained following the protocol described previously by Anitua (15). To prepare the PRP, a 5-mL sample of whole venous blood was drawn from the dogs. Then, the PRP was condensed into the canal until the cemento-enamel junction using a hand plugger (Dentsply Maillefer). Over the PRP, the MTA placement and the coronal seal were set as described in group A1.

Group B1: NaOCl/TAP/Blood Clot

In this group, the teeth were disinfected in 2 sessions. In the first treatment session, the root canals were irrigated with NaOCl using the ANP-Endovac system as described in group A1. Then, the canals were irrigated with 10 mL sterile saline to remove the NaOCl and were dried with sterile paper points ProTaper F3.

After that, mTAP dressing was prepared immediately, mixing ciprofloxacin, metronidazole, and cefixime in sterile distilled water into a creamy mixture at a concentration of 20 mg of each antibiotic (16). The mTAP was delivered into the root canal with a sterile Lentulo spiral filler (Dentsply Caulk) following the technique described previously by Windley et al (3). All excess of the mTAP in the pulp chamber was removed, and a sterile cotton pellet was placed. The access cavity was then double sealed with Cavit (3M ESPE) and glass ionomer cement (3M ESPE). The intracanal dressing was left in the canals for 15 days.

At the second treatment session, the coronal seal was removed in aseptic conditions with a sterile high-speed diamond round bur under copious water cooling followed by flushing of the pulp chamber with 20 mL saline solution to remove the TAP intracanal dressing. Then, a final irrigation was accomplished using 1 mL 17% EDTA (Ultradent Products Inc) for 60 seconds.

The root canals were dried with sterile paper points ProTaper F3. In this group, a blood clot was used as the scaffold following the same protocol used in group A1, and the coronal seal was accomplished using MTA, IRM, and glass ionomer cement as described previously.

Group B2: NaOCl/TAP/PRP

The disinfection protocol was accomplished in 2 sessions as described in group B1. Then, after removal of the TAP, the canals

were dried with sterile paper points, irrigated with 1 mL EDTA for 60 seconds, and once again dried with sterile paper points. In this group, PRP was used as the scaffold instead of a blood clot following the same protocol used in group A2, and the coronal seal was accomplished using MTA, IRM, and glass ionomer cement as described previously.

Radiographic Evaluation

Teeth were monitored radiographically on a monthly basis for 6 months before the animals were sacrificed. Each individual root was taken as the unit of measure. Radiographic evaluation was performed according to the method described previously by Thibodeau et al (4). Briefly, after a training session explaining the gold standard of the 3 evaluation parameters, 2 examiners evaluated the radiographs independently regarding healing of radiolucencies, thickening of the dentinal walls, and apical closure of the roots. Digital radiographs were saved to a computer in jpg format, and the examiners, blinded to the experimental groups, separately viewed the image exposed preoperatively with an image exposed postmortem. Each examiner graded each root for the following 3 parameters:

1. Diminished size or absence of periapical radiolucency (PAR)
2. Presence or absence of continued thickening of radicular walls
3. Presence or absence of apical closure

When there was not agreement between both evaluators, a discussion was undertaken until a consensus was reached. The kappa statistic values comparing the 2 evaluators were as follows: 0.80 for evaluation of PARs, 0.72 for evaluation of thickness of radicular walls, and 0.68 for evaluation of apical closure, all indicating good agreement between the 2 evaluators.

Statistical Analysis

The data were analyzed with chi-square and analysis of variance tests, with the level of significance set at $P > .05$.

Results

No animal showed any established signs of undue distress from the treatment procedures. Because a gross mobility occurred after the initial infection procedure, 1 animal (positive control group) lost 2 experimental teeth during the course of the study, and another animal (positive control group) also lost 1 experimental tooth.

Radiographic Analysis

After 6 months, the radiographic examination of all the untouched negative control teeth revealed normal development of roots (Fig. 1A and B). On the contrary, all positive control teeth showed an arrest of root development and PAR (Fig. 1C and D).

Some teeth from all 4 experimental groups showed radiographic evidence of healed or healing PARs, thickening of root canal walls, and apical closure (Fig. 1E–H).

Radiographic Healing of PARs

The percentage of teeth in all experimental groups showing improvement of PARs was 62.5%, with significant differences between the 4 groups ($P = .014$) (Fig. 1I). Group B2 showed the maximal percentage of healing of PARs (87.5%) and group A1 the minimum (37.5%).

When the individual experimental groups were compared with each other using chi-square tests in 2×2 tables with 1° of freedom for periapical healing, there were significant differences between

groups A1 and B1 ($P = .033$), groups A1 and B2 ($P = .003$), and groups A2 and B2 ($P = .022$). Comparing all teeth in groups B1 and B2 (disinfected in 2 sessions with TAP) with all teeth in groups A1 and A2 (disinfected in 1 session only with NaOCl), there were significant differences, with a higher percentage of periapical healing in the teeth in groups B (81.25%) compared with the teeth in groups A (43.75%) ($P = .002$). Comparing all teeth from groups 1 (blood clot) with all teeth from groups 2 (PRP as scaffold), there were no significant differences ($P = .302$). There were no other significant differences between the experimental groups with respect to periapical healing.

Increase in Root Thickness

The percentage of teeth in all experimental groups showing continued radiographic thickening of radicular walls was 53.1%, and there were significant differences between the 4 groups ($P = .013$) (Fig. 1II). Group B2 showed the maximal percentage of thickening of radicular walls (87.5%) and group A1 the minimum (37.5%).

When the individual experimental groups were compared with each other for thickening of radicular walls, there were significant differences between groups A1 and B2 ($P = .003$), groups A2 and B2 ($P = .003$), and groups B1 and B2 ($P = .022$). Comparing all teeth in groups B1 and B2 (disinfected in 2 sessions with TAP) with all teeth in groups A1 and A2 (disinfected in 1 session only with NaOCl), there were significant differences, with a higher percentage of thickening of radicular walls in the teeth of groups B (68.75%) compared with those of groups A (37.5%) ($P = .012$). On the other hand, comparing all teeth from groups 1 (blood clot) with all teeth from groups 2 (PRP as scaffold), there were no significant differences ($P = .133$). There were no other significant differences between the experimental groups with respect to thickening of radicular walls.

Radiographic Apical Closure

The percentage of teeth in all experimental groups showing radiographic apical closure was 43.8%, with significant differences between the 4 groups ($P = .013$) (Fig. 1III). Group B2 showed the maximal percentage of radiographic apical closure (75.0%) and groups A1 and A2 the minimum (25.0%).

When the individual experimental groups were compared with each other for radiographic apical closure, there were significant differences between groups A1 and B2 ($P = .005$) and groups A2 and B2 ($P = .005$). Comparing all teeth in groups B1 and B2 (disinfected in 2 session with TAP) with all teeth in groups A1 and A2 (disinfected in 1 session only with NaOCl), there were significant differences, with a higher percentage of radiographic apical closure in the teeth in groups B1 and B2 (62.5%) compared with the teeth in groups A1 and A2 (25.0%) ($P = .003$). Comparing all the teeth from groups A1 and B1 (blood clot) with all the teeth from groups A2 and B2 (PRP as the scaffold), there were no significant differences ($P = .313$). There were no other significant differences between the experimental groups with respect to radiographic apical closure.

Discussion

This study provides evidence showing that revascularization of necrotic-infected immature dog root canals with AP can be attained. A thorough disinfection of the root canal followed by the placing of a scaffold (blood clot or PRP) allows the formation of new hard tissue on the dentin walls and continued root development, with radiographic apical closure.

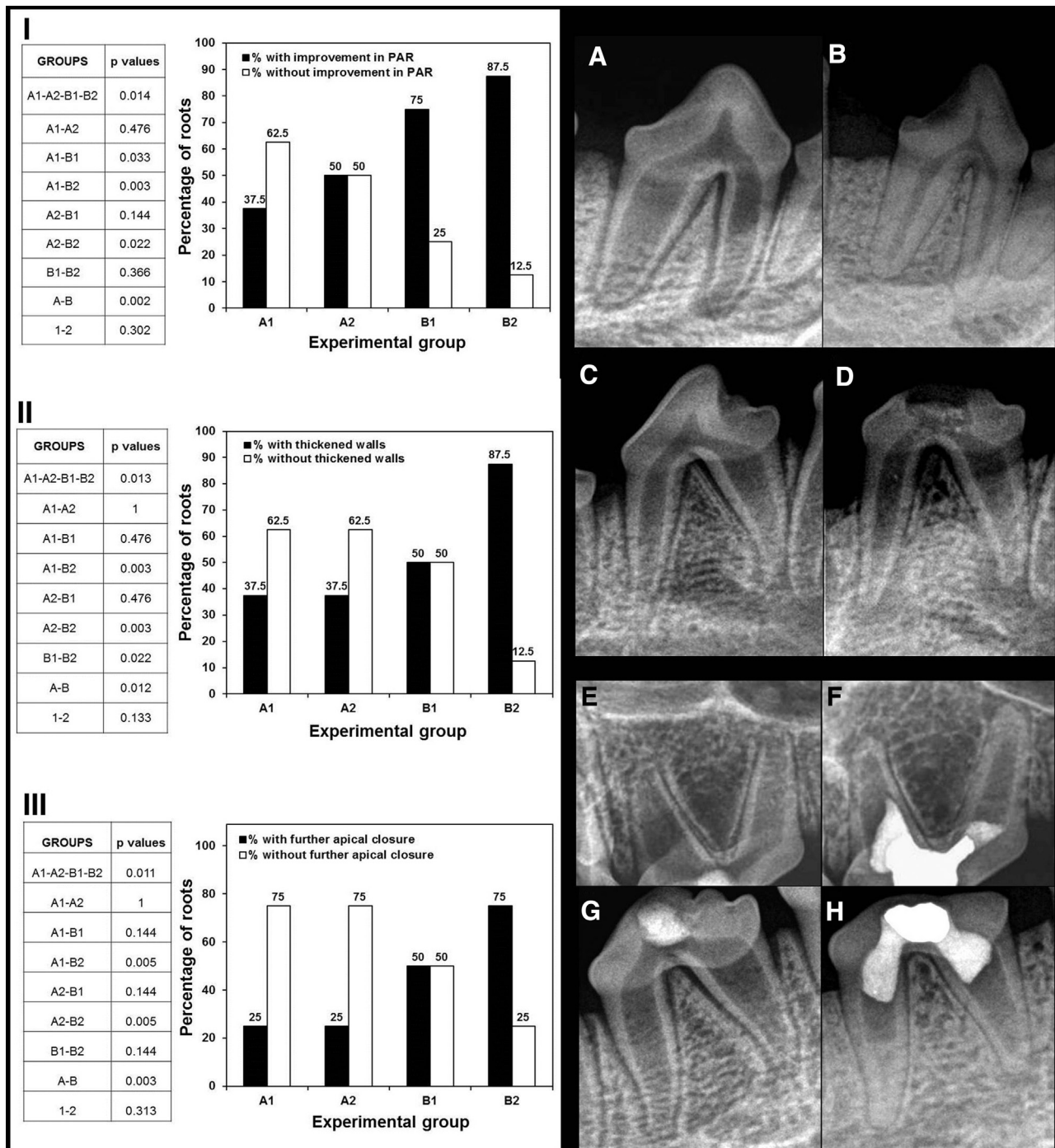


Figure 1. (A) A tooth from the negative control group (untouched) in the initial and final (B) stages of the experiment showing normal development of the roots with thickened root walls and apical development. (C) A tooth from the positive control group (untreated) in the initial and final (D) stages of the experiment showing the arrest of root development with no thickened root walls, no apical closure, and periapical radiolucency. (E) A tooth from group A2 in the initial and final (F) stages of the experiment showing normal development of the roots with thickened root walls and apical development. (G) A tooth from group B2 in the initial and final (H) stages of the experiment showing normal development of the roots with thickened root walls and apical development. (I) The percentage of roots in experimental groups with and without improvement of PARs assessed radiographically. (II) The percentage of roots in experimental groups with and without the presence of thickened radicular walls assessed radiographically. (III) The percentage of roots in experimental groups with and without further apical closure assessed radiographically. (*P* values were calculated with chi-square and analysis of variance tests).

The dog has been selected as animal model because of its similarities in radicular structure to immature human teeth in their open apex characteristics (3, 4, 17–20) and its high growth rate that allows clinicians to obtain results in shorter experimental periods (21).

Radiologic findings have been evaluated by the method described previously by Thibodeau et al (4). The same method also has been used by others investigators (5, 9, 13, 17, 19, 20, 22).

In the total sample of infected root canals analyzed in this study, 62.5% of root canals presented healing/improvement of PARs, 53.1%

showed continued radiographic thickening of radicular walls, and radiographic apical closure was revealed in 43.8% of cases. These results are similar to those reported previously by others investigators. Khademi et al (20), in a study performed on mongrel dogs' teeth, found apical healing and apical closure in 70% of the cases and thickening of the walls in 40%, and Thibodeau et al (4), in a study performed on mixed breed canine model dogs, found thickened walls in 43.9% and apical closure in 54.9%. However, recently Zhang et al (19) have found 78% of radiographic apical closure and 78% of root walls thickening.

In groups B1 and B2, taken together, these percentages were 81.25%, 68.75%, and 62.5%, respectively. The teeth in both groups B1 and B2 (TAP as the intracanal dressing) showed significantly higher percentages of improvement of PARs ($P = .002$), thickening of radicular walls ($P = .012$), and radiographic apical closure ($P = .003$) compared with the teeth of groups A1 and A2 (NaOCl alone). These results highlight the importance of disinfection in revascularization procedures. Moreover, these results suggest that the use of TAP as intracanal dressing (groups B1 and B2) provides a more complete disinfection of the root canals, helping to achieve a significantly higher percentage of revascularization. Similar results have been reported by Thibodeau et al (4), who found radiographic evidence of apical closure among roots of all teeth experimentally infected that were disinfected with the TAP, concluding that TAP can be relied on to consistently render infected canals effectively free of bacteria. This result is also in accordance with previous findings showing that TAP significantly reduces the bacteria in experimentally infected canals of immature dog teeth (3). Conversely, it has been communicated that root canals infected and not disinfected or treated further remained infected with a persistent lack of improvement of PARs, with absence of thickening of radicular dentin walls, and without apical closure (4, 24). However, it must be taken into account that the time frame of the present study may not have been long enough for complete radiographic healing of PARs because it occurred in other studies (4, 8). Outcomes were assessed after 5 months in all experimental groups. In studies by Thibodeau et al (4) and Yamauchi et al (8), a 3-month follow-up period was used. By way of comparison, the pioneer study of Strindberg (23) revealed that in humans the complete healing of PAR lesions may take up to 4 years.

In the present study, the pulps of all experimental teeth were all necrotic and infected before disinfection, as shown in the teeth in the positive control group. Therefore, the healing/improving of PARs with continued thickening of root walls and apical closure evaluated radiographically, can only be explained because of ingrowth of progenitor cells from the periapical area (4, 25). As claimed by Thibodeau et al (4), this was taken as a surrogate outcome measure representing successful revascularization because the new hard tissue was produced by cells that grew in to repopulate the canal space. Recently, Flake et al (26) has proposed the radiographic root area, a measurement of the entire surface area of the root as observed on a periapical radiograph, as a valid method to measure radiographic outcomes of endodontic therapies on immature teeth.

In the revascularization protocols reported in previous studies, decontamination of root canals was performed with 20 mL NaOCl solution at level concentrations from 2.5%–6% (5, 12, 13, 27), without conventional mechanical instrumentation for the prevention of the destruction of cells that might be present in the apical part of the root canal (28). In addition to irrigation, the use of intracanal dressing materials, mainly those composed by TAP (metronidazole, ciprofloxacin, and minocycline), have shown antimicrobial activity against oral bacteria and its ability to decontaminate infected dentin (16, 29, 30). However, the use of antibiotics as intracanal dressing may promote some side effects such as coronal discoloration (27, 31, 32),

bacterial resistance (33), and allergic reactions, as suggested by Reynolds et al (27). Thibodeau and Trope (34) reported substituting minocycline for cefaclor in the triantibiotic formula to avoid dentin discoloration. In the present study, mTAP was used, substituting minocycline with cefixime, a third-generation broad-spectrum cephalosporin.

In the recent review performed by Kontakiotis et al (35) analyzing the protocols that have been used in regenerative endodontic therapy including 60 clinical studies, 49 studies used antibiotics alone ($n = 45$) or in combination with calcium hydroxide ($n = 4$). The antibiotic mixture composed of ciprofloxacin, metronidazole, and minocycline (TAP) is the most widely used intracanal medicament in regenerative endodontic therapy (36). In addition, the TAP has been shown to be biocompatible when placed in polyethylene tubes and implanted subcutaneously in rats (18) although it is important to note that it has been shown that TAP can reduce stem cell survival in a concentration-dependent manner (37); therefore, further investigation is needed to determine appropriate antibiotic formulations or search for other antimicrobial medications with similar useful properties to the tested TAP but without having its associated deleterious side effect.

The experimental protocol performed in group B2 in the present study, including disinfection using NaOCl with the ANP-Endovac system and an intracanal dressing of TAP (ciprofloxacin, metronidazole, and cefixime) followed by the use of PRP as the scaffold, obtained the highest percentages of improvement of PARs (87.5%, $P = .014$), thickening of root canal walls (87.5%, $P = .013$), and apical closure (75%, $P = .013$) compared with the other groups and a significantly higher percentage of thickening of root canal walls ($P = .022$) than group B1 (a blood clot as the scaffold). This result suggests that the use of PRP as the scaffold improves the success rate of the revascularization procedure.

Platelet-rich preparations constitute a relatively new biotechnology for stimulation and acceleration for tissue healing and bone regeneration (38). PRP has been proposed as a potentially ideal scaffold for regenerative endodontic treatment (39). PRP has been shown to contain growth factors and can stimulate collagen production (9). However, several studies have found that the use of PRP into root canals showed no enhancement in new tissue formation compared with inducement of a blood clot into the root canals alone (40). The use of a scaffold of fibrin gel has been found to improve cell infiltration and cell-dentin interaction in pulpless immature human premolars implanted in rodents (41).

Conclusions

Present radiographic findings show that revascularization of necrotic-infected immature teeth with AP is possible. The use of TAP as the disinfectant and PRP as the scaffold seem to be useful in pulp revascularization procedures. However, long-term clinical trials and histologic studies are required to analyze the benefits of using TAP and PRP in revascularization procedures.

Acknowledgments

The authors deny any conflicts of interest related to this study.

References

1. Iwaya SL, Ikawa M, Kubota M. Revascularization of an immature permanent tooth with apical periodontitis and sinus tract. *Dent Traumatol* 2001;17:185–7.
2. Jadhav G, Shah N, Logani A. Revascularization with and without platelet-rich plasma in nonvital, immature, anterior teeth: a pilot clinical study. *J Endod* 2012;38:1581–7.
3. Windley W, Teixeira F, Levin L, et al. Disinfection of immature teeth with a triple antibiotic paste. *J Endod* 2005;31:439–43.

4. Thibodeau B, Texeira F, Yamauchi M, et al. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2007;33:680–9.
5. Chueh LH, Huang GT. Immature teeth with periradicular periodontitis or abscess undergoing apexogenesis: a paradigm shift. *J Endod* 2006;32:1205–13.
6. Hockett JL, Dommisch JK, Johnson JD, Cohenca N. Antimicrobial efficacy of two irrigation techniques in tapered and nontapered canal preparations: an *in vitro* study. *J Endod* 2008;34:1374–7.
7. Cohenca N, Heilborn C, Johnson JD, et al. Apical negative pressure irrigation versus conventional irrigation plus triantibiotic intracanal dressing on root canal disinfection in dog teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010;109:42–6.
8. Yamauchi N, Yamauchi S, Nagaoka H, et al. Tissue engineering strategies for immature teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2011;37:390–7.
9. Torabinejad M, Turman M. Revitalization of tooth with necrotic pulp and open apex by using platelet-rich plasma: a case report. *J Endod* 2011;37:265–8.
10. Torabinejad M, Faras H. A clinical and histological report of a tooth with an open apex treated with regenerative endodontics using platelet-rich plasma. *J Endod* 2012;38:864–8.
11. Cvek M, Cleaton-Jones P, Austin J, et al. Effect of topical application of doxycycline on pulp revascularization and periodontal healing in reimplanted monkey incisors. *Endod Dent Traumatol* 1990;6:170–6.
12. Banchs F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196–200.
13. Petrino JA, Boda KK, Shambarger S, et al. Challenges in regenerative endodontics: a case series. *J Endod* 2010;36:536–41.
14. Leonardo MR, da Silva LA, Leonardo Rde T, et al. Histological evaluation of therapy using a calcium hydroxide dressing for teeth with incompletely formed apices and periapical lesions. *J Endod* 1993;19:348–52.
15. Anitua E. Plasma rich in growth factors: preliminary results of use in the preparation of future sites for implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 1999;14:529–35.
16. Hoshino E, Kurihara-Ando N, Sato I, et al. *In-vitro* antibacterial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endod J* 1996;29:125–30.
17. Wang X, Thibodeau B, Trope M, et al. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:56–63.
18. Gomes-Filho JE, Duarte PC, de Oliveira CB, et al. Tissue reaction to a triantibiotic paste used for endodontic tissue self-regeneration of nonvital immature permanent teeth. *J Endod* 2012;38:91–4.
19. Zhang DD, Chen X, Bao ZF, et al. Histologic comparison between platelet-rich plasma and blood clot in regenerative endodontic treatment: an animal study. *J Endod* 2014;40:1388–93.
20. Khademi AA, Dianat O, Mahjour F, et al. Outcomes of revascularization treatment in immature dog's teeth. *Dent Traumatol* 2014;30:374–9.
21. Citome GP, Kaminski EJ, Heuer MA. A comparative study of tooth apexification in the dog. *J Endod* 1979;5:290–7.
22. Chen MY, Chen KL, Chen CA, et al. Responses of immature permanent teeth with infected necrotic pulp tissue and apical periodontitis/abscess to revascularization procedures. *Int Endod J* 2012;45:294–305.
23. Strindberg LZ. The dependence of the results of pulp therapy on certain factors. An analytic study based on radiographic and clinical follow-up examinations. *Acta Odontol Scand* 1956;14(Suppl 14):1–175.
24. Moller AJ, Fabricius L, Dahlén G, et al. Influence on periapical tissues of indigenous oral bacteria and necrotic pulp tissue in monkeys. *Scand J Dent Res* 1981;89:475–84.
25. Maeda H, Wada N, Nakamuta H, Akamine A. Human periapical granulation tissue contains osteogenic cells. *Cell Tissue Res* 2004;315:203–8.
26. Flake NM, Gibbs JL, Diogenes A, et al. A standardized novel method to measure radiographic root changes after endodontic therapy in immature teeth. *J Endod* 2014;40:46–50.
27. Reynolds K, Johnson JD, Cohenca N. Pulp revascularization of necrotic bilateral bicuspid using a modified novel technique to eliminate potential coronal discoloration: a case report. *Int Endod J* 2009;42:84–92.
28. Essner MD, Javed A, Eleazer PD. Effect of sodium hypochlorite on human pulp cells: an *in vitro* study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;112:662–6.
29. Sato I, Ando-Kurihara N, Kota K, et al. Sterilization of infected root-canal dentine by topical application of a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline *in situ*. *Int Endod J* 1996;29:118–24.
30. Ordinola-Zapata R, Bramante CM, Minotti PG, et al. Antimicrobial activity of triantibiotic paste, 2% chlorhexidine gel, and calcium hydroxide on an intraoral-infected dentin biofilm model. *J Endod* 2013;39:115–8.
31. Kim JH, Kim Y, Shin SJ, et al. Tooth discoloration of immature permanent incisor associated with triple antibiotic therapy: a case report. *J Endod* 2010;36:1086–91.
32. Miller EK, Lee JY, Tawil PZ, et al. Emerging therapies for the management of traumatized immature permanent incisors. *Pediatr Dent* 2012;34:66–9.
33. Huang GT. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: conservation of stem cells for regeneration. *J Dent* 2008;36:379–86.
34. Thibodeau B, Trope M. Pulp revascularization of a necrotic infected immature permanent tooth: case report and review of the literature. *Pediatr Dent* 2007;29:47–50.
35. Kontakiotis EG, Filippatos CG, Tzanetakis GN, Agrafioti A. Regenerative endodontic therapy: a data analysis of clinical protocols. *J Endod* 2015;41:146–54.
36. Diogenes A, Henry MA, Teixeira FB, Hargreaves KM. An update on clinical regenerative endodontics. *Endod Topics* 2013;28:2–23.
37. Ruparel NB, Teixeira FB, Ferraz CC, Diogenes A. Direct effect of intracanal medications on survival of stem cells of the apical papilla. *J Endod* 2012;38:1372–5.
38. Anitua E, Sánchez M, Orive G, Andía I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* 2007;28:4551–60.
39. Ding RY, Cheung GS, Chen J, et al. Pulp revascularization of immature teeth with apical periodontitis: a clinical study. *J Endod* 2009;35:745–9.
40. Zhu X, Zhang C, Huang GT, et al. Transplantation of dental pulp stem cells and platelet-rich plasma for pulp regeneration. *J Endod* 2012;38:1604–9.
41. Ruangsawadi N, Zehnder M, Weber FE. Fibrin gel improves tissue ingrowth and cell differentiation in human immature premolars implanted in rats. *J Endod* 2014;40:246–50.