

RELAÇÃO ENTRE A MICROBIOTA DO CANAL RADICULAR DE DENTES HUMANOS PERMANENTES TRAUMATIZADOS COM COROA INTACTA E O TESTE DE PERCUSSÃO VERTICAL

The relation between the microbiota of the root canals in traumatized human permanent teeth with intact crown and the vertical percussion test

* Karla de Faria **VASCONCELOS**; ** Kely Firmino **BRUNO**;*** Ana Helena Gonçalves de **ALENCAR** ;
*** Carlos **ESTRELA**;**** Fabiana Cristina **PIMENTA**

* Mestre em Odontologia, Universidade Federal de Goiás

** Profa. Dra., Universidade Paulista - Goiânia

***Profa. Adjunta, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás

****Prof. Titular e Livre-Docente, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás

*****Profa. Dra., Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás

Endereço para correspondência:

Karla de Faria Vasconcelos

Alameda das Rosas, nº 847, apt. 1500, Setor Oeste, ed. Solar das Varandas, Goiânia-GO, Brasil. CEP 74110-060. - E-mail: karlafav@hotmail.com

RELEVÂNCIA CLÍNICA

Os critérios clínicos e radiográficos sugeridos para o diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados são relativos e apresentam significados diferentes no período pós traumatismo. A resposta positiva ao teste de percussão vertical, semanas após o traumatismo, tem sido indicada como critério diagnóstico preciso relacionado a polpas necróticas infectadas.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivos avaliar a microbiota do canal radicular de 20 dentes humanos permanentes traumatizados com coroa intacta e diagnóstico clínico de necrose pulpar e relacionar a resposta ao teste de percussão vertical com a presença de microrganismos nesses dentes. A coleta microbiológica foi realizada com cones de papel absorvente autoclavados e a determinação do número de unidades formadoras de colônias (ufc) de bactérias foi efetuada pela semeadura do material coletado em ágar chocolate (contagem de bactérias totais), ágar mitis salivarius (contagem de estreptococos bucais) e ágar SB20 (contagem de estreptococos do grupo mutans). O Teste de Regressão Linear e Análise de Diagnóstico revelaram que: em apenas 15% das amostras não foi detectado o desenvolvimento microbiano. O tempo decorrido do traumatismo dentário até a intervenção endodôntica variou de 15 dias a 31 meses, sendo que o transcurso desse tempo só foi estatisticamente significativo ($p = 0,047$) em relação ao número de estreptococos bucais isolados no canal radicular. Verificou-se um aumento desse número à medida que o tempo também era maior. O teste de percussão vertical apresentou alta sensibilidade (80%) na detecção de microrganismos no canal radicular de dentes traumatizados. Diante dos resultados, as seguintes conclusões podem ser destacadas: 85% dos dentes apresentaram microrganismos no canal radicular, com coroa intacta; o diagnóstico clínico da necrose pulpar foi realizado, em 70% dos dentes, em até 3 meses e a resposta positiva ao teste de percussão vertical esteve associada à necrose pulpar com presença de microrganismos.

Palavras chave: traumatismo, microbiologia, diagnóstico.

SUMMARY

This study aimed to evaluate the microbiota of root canals of 20 human permanent traumatized teeth with crown intact and clinical diagnosis of pulpal necrosis and relate the response to vertical percussion test with the presence of microorganisms in these teeth. The microbiological sampling was performed with autoclaved absorbent paper cones and determining the number of colony-forming units (cfu) of bacteria was performed by seeding the material collected on chocolate Agar (count of total bacteria), mitis salivarius agar (count of buccal streptococcus) and agar SB20 (counts of mutans streptococcus of the group). The Linear Regression test and Diagnostics Analysis revealed that in only 15% of the samples was not detected the microbial development. The time of dental trauma to the endodontic intervention ranged from 15 days to 31 months, with the passage of time only was statistically significant ($p = 0.047$) on the number of buccal streptococcus isolated in the root canal. There is an increase that number as time was also higher. The vertical percussion test showed high sensitivity (80%) in the detection of microorganisms in root canals of traumatized teeth. Basing on these results we can conclude that: 85% of teeth showed microorganisms in root canal with crown intact, the clinical diagnosis of pulpal necrosis was achieved in 70% of the teeth, up to 3 months and the positive response to the vertical percussion test was associated with pulpal necrosis with the presence of microorganisms.

Key-words: trauma, microbiology, diagnosis.

INTRODUÇÃO

Os traumatismos dentários têm representado um desafio frequente na clínica odontológica. Resultam em lesões às estruturas pulpares e periodontais que comprometem a estética e a função do aparelho estomatognático, além de representarem um sério problema de ordem emocional e psicológica para o paciente¹⁻²⁻³.

As principais alterações pulpares decorrentes dos traumatismos dentários são: necrose pulpar, obliteração e reabsorção do canal radicular^{2,4-5-6}. Sendo a primeira a mais frequente^{7-8-9-10,32}, o seu diagnóstico precoce se faz necessário previamente à invasão de microrganismos e início das reabsorções externas, para que se obtenha um prognóstico mais favorável. Todavia, esse diagnóstico é limitado e pode apresentar falhas, uma vez que ainda não existe precisão nem padronização dos métodos de diagnóstico para determinação da condição pulpar pós traumatismo^{1-2,5}. Alguns critérios têm sido sugeridos para o diagnóstico de necrose pulpar em dentes traumatizados como ausência de resposta aos testes de sensibilidade pulpar, escurecimento progressivo da coroa, radiolucidez periapical, paralização da rizogênese ou resposta positiva ao teste de percussão vertical¹. Entretanto, esses critérios podem ser relativos e ter significados diferentes ao longo do período que se segue ao traumatismo¹².

Os testes de sensibilidade pulpar térmicos ao calor e ao frio (87,5%) e elétrico (62,5%) não se mostraram totalmente confiáveis na detecção de necrose pulpar¹⁵. A alteração de coloração da

coroa também não é patognomônica, pois com a hemorragia intrapulpar pós-traumática, poderia haver o extravasamento de eritrócitos e subprodutos de sua decomposição para o tecido adjacente, tornando a coroa rósea ou acinzentada. Uma vez restabelecida a circulação normal da área, esses subprodutos poderiam ser removidos e a coroa recuperar sua coloração original¹⁴. A presença de áreas radiolúcidas localizadas no periápice de dentes luxados pode representar estágios intermediários do reparo pulpar, não sendo necessariamente, indicativa de necrose pulpar¹⁵. A resposta positiva ao teste de percussão vertical, semanas após o traumatismo, tem sido sugerida como o critério diagnóstico mais preciso relacionado à polpas necróticas infectadas^{5,16}.

Estudos prévios demonstraram que em dentes traumatizados com câmara pulpar intacta, a polpa isquêmica pode permanecer com ausência de microrganismos por longo período de tempo bem como mostrar-se infectada¹⁷⁻¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰. Os microrganismos, uma vez presentes no canal radicular desses dentes, contribuem para o desenvolvimento de necrose pulpar, por comprometerem definitivamente a revascularização da polpa³.

O presente estudo teve como objetivos avaliar a microbiota do canal radicular de dentes humanos permanentes traumatizados com coroa intacta e diagnóstico clínico de necrose pulpar e relacionar a resposta ao teste de percussão vertical com a presença de microrganismos nesses dentes.

MATERIAL E MÉTODO

Procedimentos Clínicos

Para este estudo foram selecionados 20 pacientes do Projeto de Pesquisa e Extensão “Lugar de dente é na boca” da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

Os critérios de inclusão para amostra foram dentes que haviam sofrido traumatismo aos tecidos periodontais (subluxação - 8 dentes, luxação extrusiva - 3 dentes, luxação lateral - 2 dentes e avulsão - 7 dentes), com coroa intacta e diagnóstico clínico de necrose pulpar. Os critérios de exclusão foram dentes portadores de fratura radicular, de lesão periapical, de bolsa periodontal, de reabsorções ou de obliteração do canal radicular.

Os seguintes dados clínicos foram coletados: a) tipo de traumatismo; b) data do traumatismo e tempo decorrido desse até a intervenção endodôntica; c) coloração da coroa; d) resposta aos testes de vitalidade pulpar (TVP) térmicos e elétrico (positiva ou negativa) - (calor: utilizou-se bastão de guta percha aquecido, que foi aplicado no centro da face vestibular do dente em questão, previamente lubrificado com vaselina, sob isolamento relativo; frio: utilizou-se o gás refrigerante Endofrost - 50oC (Roeko, Langenau – Alemanha), que foi aplicado no centro da face vestibular do dente em questão, sob isolamento relativo; teste elétrico: foi utilizado o aparelho Endoanalyser (Kerr, Michigan – EUA), colocando-se a ponta do eletrodo no centro da face vestibular lubrificada com flúor gel, sob isolamento relativo, e o valor de resposta fornecido foi anotado; e) resposta aos testes de percussão vertical (TPV) e horizontal (TPH) (positiva ou negativa); f) dor à palpação (ausente ou presente); g) sintomatologia (ausente ou presente); g) mobilidade (normal ou aumentada). Todos esses dados clínicos também foram coletados dos dentes contralaterais aos traumatizados, com o objetivo de verificar o padrão de resposta de cada paciente.

O exame radiográfico foi realizado com posicionador de radiografia para adulto (Indusbelo, Londrina-PR) e filme radiográfico Insight (Kodak, Eastman - EUA), em um mesmo aparelho de radiografia, garantindo-se tensão e intensidade de correntes constantes. A análise das radiografias ocorreu em ambiente de luz indireta, em momento diferente do exame clínico. Máscaras especiais de papel cartão preto foram confeccionadas para permitir melhor visualização da radiografia no negatoscópio.

Uma vez diagnosticada clinicamente a necrose pulpar, pela associação de no mínimo três critérios clínicos, os dentes foram submetidos à

intervenção endodôntica. Cada dente selecionado foi isolado com dique de borracha e recebeu anti-sepsia com solução de hipoclorito de sódio a 1% (Probem, Catanduva - SP). A abertura coronária foi realizada restringindo-se apenas à trepanação da câmara pulpar. A coleta microbiológica do canal radicular foi realizada utilizando-se cones de papel absorvente autoclavados (Tanari, Manacapuru - AM) de número 20. Para cada dente foram utilizados três cones de papel. Cada cone foi introduzido no canal radicular com pinça esterilizada, até o comprimento de trabalho provisório, e mantido por 30 segundos até ser removido e colocado em tubo de ensaio contendo solução de tampão fosfato de Sørensen (PBS). A amostra foi encaminhada ao Departamento de Microbiologia, Imunologia, Parasitologia e Patologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás para processamento microbiológico.

Cada dente foi, então, devidamente preparado segundo o protocolo de tratamento endodôntico para dentes traumatizados do Projeto de Pesquisa e Extensão “Lugar de dente é na boca” da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás e acompanhado a cada três meses, por meio de exames clínico e radiográfico, até ser indicada a obturação do canal radicular.

Processamento Microbiológico

A determinação do número de unidades formadoras de colônias (ufc) de bactérias foi efetuada pela semeadura do material coletado em ágar chocolate (contagem de bactérias totais), ágar mitis salivarius (contagem de estreptococos bucais) e ágar SB20 (contagem de estreptococos do grupo mutans). As placas de Petri semeadas foram incubadas em jarras de anaerobiose (microaerofilia) a 37oC por até 96 horas.

Após o período de incubação, as colônias desenvolvidas foram contadas, com o auxílio de estereomicroscópio, de acordo com as características macroscópicas. Aquelas com diferentes características foram submetidas à coloração de Gram para a determinação do morfotipo. Com o objetivo de diferenciar estafilococos de estreptococos, a prova da catalase também foi realizada.

Análise estatística

O Teste de Regressão Linear foi utilizado para avaliar o tempo decorrido do traumatismo à intervenção endodôntica quanto ao número de microrganismos presentes no canal radicular dos dentes traumatizados. O nível de significância considerado foi de 5%.

Análise de diagnóstico foi utilizada para avaliar a sensibilidade, especificidade e acurácia do teste de percussão vertical quanto à presença de microrganismos no canal radicular desses dentes

Este estudo foi realizado após aprovação junto ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, com protocolo de aprovação de número 068/2004.

RESULTADOS

Das 20 amostras obtidas dos canais radiculares dos dentes traumatizados, em apenas 3 (15%) não foi detectado o desenvolvimento microbiano. Os microrganismos isolados foram: Estreptococos bucais (31%), bactérias anaeróbias facultativas - cocos Gram positivos, cocos Gram positivos alfa-hemolíticos e bacilos Gram positivos alfa-hemolíticos (52%), Staphylococcus sp (6,7%)

e bacilos Gram positivos esporulados (10,3%). Em 12 dentes foi observada a presença de mais de um tipo de microrganismo.

O tempo decorrido do traumatismo dentário até a intervenção endodôntica variou de 15 dias a 31 meses (Tabela 1). Esse tempo não foi estatisticamente significativo (p = 0,591) em relação ao número de microrganismos presentes no canal radicular, quando analisados todos os tipos conjuntamente. Entretanto, na análise isolada de cada tipo, o tempo decorrido do traumatismo dentário até a intervenção endodôntica foi estatisticamente significativo (p = 0,047) em relação ao número de estreptococos bucais isolados no canal radicular, verificando-se um aumento desse número à medida que o tempo também era maior (Figura 1).

O teste de percussão vertical foi avaliado quanto à presença de microrganismos em dentes traumatizados, revelando alta sensibilidade (80%) (Tabela 2).

Tabela 1 – Distribuição do número de dentes traumatizados (n = 20) de acordo com o período de tempo decorrido do traumatismo dentário até a intervenção endodôntica.

Período de tempo	Número de dentes (%)
15 dias – 3 meses	14 (70%)
4 meses – 6 meses	2 (10%)
> 7 meses	4 (20%)

Tabela 2 – Análise do teste de percussão vertical (TPV) em relação à presença de microrganismos no canal radicular.

Presença de microrganismo	TPV (+)		TPV (-)	
	n	%	n	%
Não	3	20	0	0
Sim	12	80	5	100
Total	15	100	5	100

Sensibilidade = 80% ; Especificidade = 0% ; Acurácia = 60%; n: número de dentes.

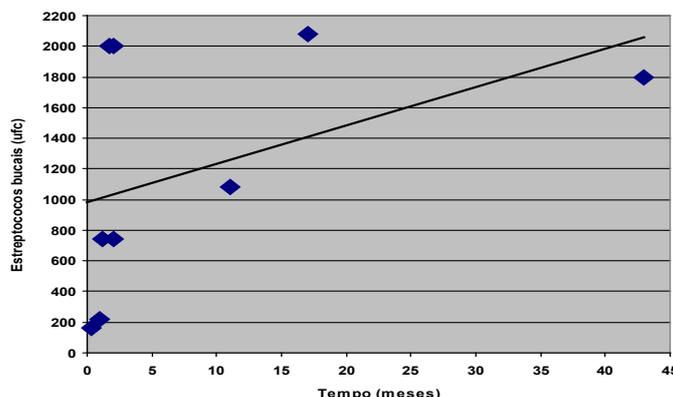


Figura 1 – Gráfico representativo da correlação entre o número de unidades formadoras de colônias (ufc) de Estreptococos bucais e o tempo decorrido do traumatismo dentário até a intervenção endodôntica.

DISCUSSÃO

Para o presente estudo foram selecionados pacientes com dentes permanentes que sofreram traumatismo aos tecidos periodontais (subluxação, luxação extrusiva, luxação lateral e avulsão), com coroa intacta e diagnóstico clínico de necrose pulpar. Não foram formados grupos com número idêntico de amostras porque este estudo não teve como objetivo correlacionar o tipo de traumatismo dentário com o desenvolvimento de necrose pulpar, mas sim, verificar a relação entre a microbiota do canal radicular de dentes humanos permanentes traumatizados com coroa intacta e o teste de percussão vertical.

Eram dentes com ausência de cárie, de restauração, de fratura e comprometimento periodontal, as quais poderiam prover possíveis fontes de invasão microbiana ao tecido pulpar²¹⁻²². Dentes com presença de lesão periapical ou reabsorções também foram excluídos, visto que já foi comprovada, nesses casos, a presença de microrganismos livres no canal radicular, aderidos às suas paredes e/ou penetrando nos túbulos dentinários²³.

A coleta do material dos dentes traumatizados para a determinação de unidades formadoras de colônias de bactérias foi realizada utilizando-se três cones de papel absorvente esterilizados, seqüencialmente introduzidos no canal radicular durante 30 segundos. O procedimento se baseou em trabalhos prévios²⁴⁻²⁵, nos quais a indicação mais confiável para a coleta com positividade da cultura foi obtida quando da utilização de três cones de papel nesse período de tempo.

Das 20 amostras obtidas dos canais radiculares dos dentes traumatizados, em 17 (85%) foi detectado desenvolvimento microbiano. Resultado superior ao de Arwill et al.¹⁷ (1967) e Bergholtz¹⁸ (1974) que verificaram crescimento microbiano em dentes traumatizados de 28,6% e 64,0%, respectivamente, e inferior ao de Taklan²⁰ (1974) e o de Le Goff et al.¹⁹(1997), que encontraram desenvolvimento microbiano em dentes traumatizados com câmara pulpar intacta em 100,0% e em 90,0%, respectivamente.

O tempo decorrido do traumatismo até a intervenção endodôntica nos dentes selecionados também foi verificado, visto que pouco se sabe a respeito de quando a necrose pulpar pode ser diagnosticada nesses dentes com precisão. No presente trabalho, o período de tempo decorrido do traumatismo até a intervenção endodôntica variou de 15 dias a 31 meses. Os dentes indicados para tratamento em 15 dias foram aqueles avulsionados com rizogênese completa, visto ser a necrose pul-

par o único resultado esperado nesses casos^{7,14}. Ainda, em 14 dentes (70%), o diagnóstico clínico da necrose pulpar foi realizado em até três meses. Resultado esse concordante com o encontrado por Andreasen¹⁴ (1989) e próximo ao observado por Jacobsen¹² (1980), que foi de quatro meses. Contrariamente, Barkin²⁶(1973) atestou que nenhum padrão para prever a vitalidade do dente traumatizado pode ser feito nos primeiros três meses. Para Andreasen & Vestergaard-Pedersen²⁷ (1985) e Andreasen¹⁴ (1989) existem diferentes padrões cronológicos para diferentes tipos de traumatismo, podendo a necrose pulpar ocorrer após três meses ou mesmo após dois anos nos casos de luxações lateral e intrusiva.

A verificação desse tempo também atendeu ao objetivo de investigar a existência de correlação entre seu transcurso e o número de microrganismos presentes no canal radicular. Apesar de Bergholtz¹⁸ (1974) relatar que o número de microrganismos presentes no canal radicular aumentava com um maior intervalo de tempo decorrido do traumatismo até a intervenção endodôntica, no presente estudo esse aumento não foi estatisticamente significativo para o número total de microrganismos isolados, exceto para os estreptococos bucais. Esse fato pode ser explicado pois, após traumatismo dentário com rompimento do suprimento neurovascular pulpar, a polpa pode tornar-se isquêmica e portanto, susceptível à invasão microbiana. Como os estreptococos bucais são os microrganismos mais prevalentes e sempre presentes na cavidade bucal, a colonização do canal radicular por eles se torna facilitada. Ainda, esses microrganismos são hábeis para sobreviver em ambientes com pouco nutriente²⁸.

Algumas hipóteses têm sido propostas para explicar como os microrganismos alcançariam a câmara pulpar intacta de dentes traumatizados. Essa origem estaria relacionada com o rompimento de vasos sanguíneos no periodonto, permitindo a entrada de microrganismos pelo sulco gengival, pela circulação colateral ou, às vezes, pela sistêmica^{20,29} e através dos túbulos dentinários nos casos de fraturas coronárias associadas ou não às luxações¹⁸. Essa invasão também poderia acontecer mediante a entrada de microrganismos através de trincas presentes no esmalte e na dentina de dentes avulsionados³⁰.

Para esses dentes, microrganismos provenientes da cavidade bucal ou da superfície radicular, contaminada durante o período extra-alveolar, poderiam alcançar a área apical do dente reimplantado por meio do coágulo sanguíneo presente no alvéolo

antes do reimplante ou formado durante a fase inicial do processo de cicatrização, uma vez que o coágulo é um excelente substrato para a proliferação de microrganismos. Dezan Júnior³² (2001) atestou também que bactérias poderiam atingir o tecido pulpar pela corrente sanguínea durante uma bacteremia, em um fenômeno denominado de anacorese.

No presente estudo, os critérios utilizados para o diagnóstico clínico da necrose pulpar consistiram em: alteração de coloração da coroa, resposta negativa aos testes de sensibilidade pulpar térmicos e elétrico, resposta positiva aos testes de percussão vertical e horizontal, dor à palpação e mobilidade aumentada^{7,12,27}. O diagnóstico clínico da necrose pulpar do dente traumatizado só foi realizado mediante a associação de no mínimo três desses critérios clínicos. Estudos prévios afirmaram não existir nenhum critério diagnóstico patognômico para necrose pulpar pós-traumatismo, embora alguns apresentem maior confiabilidade^{7,12,15}.

O teste de percussão vertical tem se mostrado um critério clínico de simples execução e de grande valia. Andreasen¹⁵ (1986) observou que dentes com polpas necróticas infectadas apresentaram maior sensibilidade à percussão quando comparados a dentes com polpas necróticas não infectadas, indicando que uma resposta positiva ao teste de percussão vertical estaria associada a uma necrose pulpar com presença de microrganismos. Esse dado foi confirmado no presente estudo, em que o referido teste apresentou alta sensibilidade (80%) na detecção de microrganismos no canal radicular de dentes traumatizados.

CONCLUSÃO

De acordo com a metodologia empregada e os resultados obtidos, podem ser destacadas as seguintes conclusões:

1. Mediante os achados microbiológicos, 85% dos dentes traumatizados apresentaram microrganismos no canal radicular, apesar de terem coroa intacta.
2. O diagnóstico clínico da necrose pulpar foi realizado, em 70% dos dentes traumatizados, em até 3 meses.
3. A resposta positiva ao teste de percussão vertical em dentes traumatizados esteve associada à necrose pulpar com presença de microrganismos.

REFERÊNCIAS

1. Andreasen JO. Challenges in clinical dental traumatology. *Endod Dent Traumatol.* 1985; 1 (2): 45-55.
2. Bastos JV. Prognóstico pulpar após lesões traumáticas na dentição permanente: avaliação clínico-radiográfica. [Dissertação de Mestrado]. Belo Horizonte: Faculdade de Odontologia da UFMG; 1996.
3. Côrtes MIS, Bastos JV. Lesões traumáticas na dentição permanente. In: Estrela C. *Ciência Endodôntica.* São Paulo: Ed. Artes Médicas; 2004. p. 799-918.
4. Andreasen JO, Andreasen FM. In: *Texto e atlas colorido de traumatismo dental.* Porto Alegre: Ed. Artmed; 2001.p.770.
5. Andreasen FM. Transient root resorption after dental trauma: the clinician's dilemma. *J Esthet Restor Dent.* 2003; 15 (2): 80-92.
6. Oginni AO, Adekoya-Sofowora CA, Kolawole KA. Evaluation of radiographs, clinical signs and symptoms associated with pulp canal obliteration: an aid to treatment decision. *Dent Traumatol.* 2009; 25 (6): 620-5.
7. Ferrazzini Pozzi EC, Von Arx T Pulp and periodontal healing of laterally luxated permanent teeth: results after 4 years. *Dent Traumatol.* 2008;24(6): 658-62.
8. Andreasen JO. Luxation of permanent teeth due to trauma: a clinical and radiographic follow-up study of 189 injured teeth. *Scand J Dent Res.* 1970; 78 (4): 273-86.
9. Stalhane I., Hedegard B. Traumatized permanent teeth in children aged 7-15 years. *Swed Dent J.* 1975; 68:157.
10. Rock WP, Grundy MC. The effect of luxation and subluxation upon the prognosis of traumatized incisor teeth. *J Dent Bristol.* 1981; 9(3): 224-30.

11. Dumsha T, Hovland E J. Pulpal prognosis following extrusive luxation injuries in permanent teeth with closed apices. *J Endod.* 1982; 8 (9):410-12.
12. Jacobsen I. Criteria for diagnosis of pulp necrosis in traumatized permanent incisors. *Scand J Dent Res.* 1980; 88 (4): 306-12.
13. Novoa MMH. Análise comparativa da sintomatologia clínica do dente e a histopatologia do tecido pulpar. [dissertação de Mestrado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru/USP; 2005.
14. Andreasen FM. Pulpal healing after luxation injuries and root fractures in the permanent dentition. *Endod Dent Traumatol.* 1989; 5:111-31.
15. Andreasen FM, Zhijie Y, Thomsen BL. Relationship between pulp dimensions and development of pulp necrosis after luxation injuries in the permanent dentition. *Endod Dent Traumatol.* 1986; 2(3): 90-8.
16. Andreasen FM. Histological and bacteriological study of pulps extirpated after luxation injuries. *Endod Dent Traumatol.* 1988; 4(4):170-81.
17. Arwill T, Henscen B, Sundwall-hagland I. The pulpal reaction in traumatized permanent incisors in children aged 9-18. *Odontol Tidskrift.* 1967; 30-147.
18. Bergenholtz G. Microorganisms from necrotic pulp of traumatized teeth. *Odontol Revy.* 1974; 25 (5): 347-58.
19. Le Goff A, Bunetel L, Mouton C, Bonnaure-Mallet M. Evaluation of root canal bacteria and their antimicrobial susceptibility in teeth with necrotic pulp. *Oral Microbial Immunol.* 1997; 12:318-22.
20. Taklan S. A bacteriological study of pulp of intact non-vital teeth. *J Br Endod Soc.* 1974; 75-77.
21. Abou-Rass M, Bogen G. Microorganisms in closed periapical lesions. *Int Endod J.* 1998;31:39-47.
22. Paul BF, Hutter JW. The endodontic-periodontal continuum revisited: new insights into etiology, diagnosis and treatment. *J Am Dent Assoc.* 1997;128:1541-48.
23. Nair PNR. Light and electron microscopic studies of root canal flora and periapical lesions. *J Endod.* 1987;13:29-39.
24. Engstrom B. The significance of the number of absorvent paper points to positive endodontic cultures. *Odontol Revy* 1966; 17: 216-21.
25. Serene TP, McDonald ED. Endodontic culturing: a statistical study. *J Am Dent Assoc.* 1969; 78(10):13-15.
26. Barkin PR. Time as a factor in predicting the vitality of traumatized teeth. *ASDC J Dent Child.* 1973;40:188-192.
27. Andreasen FM, Vestergaard-Pedersen B. Prognosis of luxated permanent teeth: the development of pulp necrosis. *Endod Dent Traumatol.* 1985 Dec; 1(6): 207–20.
28. Koneman E W, Allen S D, Dowell VRJR, Sommers RSHM. *Diagnóstico Microbiológico – texto e atlas colorido.* 5 ed. São Paulo, 2001.
29. Grossman LI. Origin of microorganisms in traumatized, pulpless, sound teeth. *J Dent Res.* 1967; 46: 551-53.
30. Love RM. Bacterial penetration of the root canal of intact incisor teeth after a simulated traumatic injury. *Endod Dent Traumatol.* 1996;12: 289-93.
31. Cvek M, Cleaton-Jones P, Austin J, Lownie J, Kling M, Fatti P. Pulp revascularization in reimplanted immature monkey incisors-predictability and effect of antibiotic systemic prophylaxis. *Endod Dent Traumatol.* 1990;6: 157-69.
32. Dezan EJ. Indução experimental de anacorese no periápice de dentes após obturação dos canais. Estudo em cães em região geográfica endêmica para Leishmaniose. [tese de Doutorado]. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru/USP; 2001.