

Efecto de la solución 3mix en la viabilidad del ligamento periodontal en procedimientos de reimplantación dental.

The effect of 3Mix solution in the viability of the periodontal ligament in tooth replantation procedures.

Angela Quispe-Salcedo¹, Hayato Ohshima²

RESUMEN

Objetivo: El procedimiento de reimplantación dental es un método terapéutico que consiste en la reubicación de una pieza dentaria en el alveolo del cual ha sido desplazada total o parcialmente como en el caso de las avulsiones dentarias. El presente estudio tiene como objetivo elucidar de manera descriptiva la respuesta del periodonto frente a la solución antibiótica 3Mix usando un modelo de reimplantación dental intencionalmente demorada.

Métodos: Se extrajeron las primeras molares superiores de dieciséis ratones tipo ICR las cuales fueron divididos en dos grupos: Grupo control, usando solución fosfato búfer salino y grupo experimental usando la solución antibacteriana 3Mix (Metronidazol, Ciprofloxacina y Minociclina). Las molares fueron sumergidas en ambas soluciones por 30 minutos y luego reimplantadas en el alveolo sin ningún procedimiento adicional. **Resultados:** Al cabo de 1 y 2 semanas las muestras se evaluaron histológicamente mediante la tinción Hematoxilina-Eosina, la cual reveló anquilosis severa en las molares tratadas con la solución 3Mix dos semanas después de la operación de reimplantación, a diferencia del grupo control donde se observó la sobrevivencia del ligamento periodontal. Por otro lado, la pulpa dental mostró señales clara recuperación en el grupo 3Mix una semana después de la operación y formación de tejidos duros en la cámara pulpar a las dos semanas. **Conclusión:** El uso de la Solución 3Mix afecta negativamente la viabilidad del ligamento periodontal en piezas sometidas a procedimiento de reimplantación dental intencionalmente demorada; sin embargo, acelera la recuperación del tejido pulpar afectado por traumatismos severos.

Palabras clave: reimplantación dental, antibióticos, solución 3Mix, anquilosis, ligamento periodontal, ratones.

ABSTRACT

Aim: Tooth replantation is a therapeutic procedure in which the totally or partially dislocated tooth is relocated in its alveolar socket following tooth injuries, such in the case of tooth avulsion. Despite of the several publications on the effectiveness of 3Mix antibiotic mixture (Metronidazole, Ciprofloxacin and Minocycline) in the treatment of afflicted teeth, little is known about its effect on periodontal tissues. This study aims to describe the response of periodontal ligament to 3Mix solution using a model for intentionally delayed tooth replantation in mice. **Methods:** Sixteen upper first molars of 3-week-old ICR mice were extracted and divided into two groups: Control, using phosphate buffer saline and experimental, using 3Mix antibacterial solution. The molars were immersed in PBS or 3Mix solution for 30 minutes, and then replanted in their original alveolar socket without any additional treatment. **Results:** The samples were then collected at weeks 1 and 2 after operation and assessed by Hematoxylin-Eosin (HE) staining. At week 1, a number of inflammatory cells were observed in the periodontal ligament of both groups. Nevertheless, two weeks after operation HE revealed severe root ankyloses in all the replanted molars treated with 3Mix solution, while in the PBS group the periodontal ligament was still conserved. On the other hand, 3Mix solution accelerated the healing of the dental pulp at week 1 and hard tissue formation in the pulp chamber at week 2. **Conclusion:** the use of 3Mix solution negatively affects the viability of the periodontal ligament of intentionally-delayed replanted teeth; however, it accelerates the healing of the dental pulp in severely injured teeth.

Key words: Tooth replantation, antimicrobials, 3Mix solution, ankyloses, periodontal ligament, mice.

1. Departamento de Ciencias Básicas y Biología Craniofacial. Facultad de Odontología, Universidad de Nueva York, Estados Unidos.

2. Division de Anatomía y Biología Celular de los Tejidos Duros, Facultad de Odontología, Universidad de Niigata, Japón.

Correspondencia: Dra. Angela Quispe-Salcedo **Dirección:** Departamento de Ciencias Básicas y Biología Craniofacial. Facultad de Odontología, Universidad de Nueva York, Estados Unidos. **Correo electrónico:** Aq9@nyu.edu

La avulsión dental implica el desplazamiento total del diente fuera de su alveolo, resultando en daño severo al periodonto y al tejido pulpar (Andreassen et al.; Trope M). Las piezas involucradas con mayor frecuencia son los incisivos centrales maxilares; observándose con mayor frecuencia en niños entre siete y nueve años de edad, cuando los incisivos centrales erupcionan y el ligamento periodontal provee a estos de una mínima resistencia a las fuerzas extrusivas (Chaple et al.; Petrovic B.; Fariniuk LF.); en estos casos, el pronóstico de la pieza esta en relación con la severidad del traumatismo y su pronóstico suele ser reservado.

El procedimiento de reimplantación dental es un método terapéutico que consiste en la reubicación de una pieza dentaria en el alveolo del cual ha sido desplazada total o parcialmente de forma accidental o intencional (Pérez et al.; Quispe-Salcedo et al.) En casos de avulsión, la reimplantación dental es la opción principal de tratamiento; sin embargo, la viabilidad del ligamento periodontal dependerá del tiempo extra-alveolar, las condiciones de almacenamiento temporal de la pieza, y la manipulación de la superficie de la raíz hasta el momento de la reimplantación. La contaminación bacteriana es un factor importante a ser controlado, ya que durante las 3 - 4 primeras horas luego del traumatismo se produce un proceso inflamatorio que tiene como objetivo eliminar microorganismos asociados a la injuria traumática (De Souza-Gomes et al.; Andreassen JO).

La complicación más común relacionada al procedimiento de reimplantación es la anquilosis dentoalveolar, la cual conduce a una reabsorción gradual de los tejidos duros del diente para ser reemplazados por hueso. Esto ocurre debido a que la pieza ha sido expuesta largo tiempo a la desecación o almacenada en un medio no adecuado (Hammarstrom et al.). Un punto clave para el éxito de un procedimiento de reimplantación es que la pieza avulsionada sea reposicionada en el alveolo lo más pronto posible; adicionalmente, es importante emplear un medio de almacenamiento adecuado para la mantención de la pieza hasta su reimplantación (Tsukiboshi et al.). A la fecha se han publicado varios protocolos con la finalidad de mantener la viabilidad del ligamento periodontal. Algunos de ellos involucran el uso de leche (Khademi et al.), saliva (Blomlof et al.), Solución de Hanks (Hiltz et al.), propóleos (Casaroto et al.), sustancias que atenúan la reabsorción tales como el alendronato (Lustosa-Pereira et al.), y proteínas del esmalte dentario (Lam et al.; Tuna et al.), entre otros. Sin embargo, no existe un consenso sobre cual medio de almacenamiento es el más favorable para la pieza dental avulsionada.

En los últimos años, se ha propagado el uso de la pasta 3Mix-MP en el tratamiento de endodóntico no instrumentado de piezas deciduas y como medicación intraconducto en piezas permanentes (Takushige et al.). Esta pasta está formada a base de tres antibióticos de amplio espectro: Metronidazol, Minociclina y Ciprofloxacino los cuales actúan sinérgicamente para erradicar la mayor cantidad posible de bacterias presentes en las patologías pulpares y periapicales (Sato et al.). En un estudio reciente, el uso de la combinación antibiótica 3Mix a manera de solución, ha demostrado ser efectiva para la regeneración

del tejido pulpar severamente comprometido en piezas dentales sometidas a procedimiento de reimplantación intencionalmente demorada (Quispe-Salcedo et al.). A pesar de los promisorios resultados obtenidos en estudios in vivo, no se ha reportado con detalle el efecto de la solución 3Mix en los tejidos de soporte del diente en casos de reimplantación. Por tanto, el presente estudio preliminar tiene como objetivo elucidar de manera descriptiva la respuesta del periodonto frente a la solución antibiótica 3Mix usando un modelo de reimplantación dental intencionalmente demorada en ratones.

MÉTODOS

Procedimiento de reimplantación dental

Los experimentos descritos en el presente estudio se realizaron de acuerdo a los lineamientos y recomendaciones del Comité de Ética en Experimentación Animal de la Universidad de Niigata, Japón. Dieciséis ratones machos del tipo Crlj:CD1 (ICR) de tres semanas de edad fueron adquiridos de un proveedor local (Clea Company, Japón) y mantenidos en uno de los ambientes del laboratorio durante el tiempo en el que se desarrolló el proyecto. Los animales se dividieron en dos grupos principales: Grupo control, usando solución búfer fosfato salino (PBS, phosphate buffered saline, siguiendo sus siglas en ingles) y grupo experimental, usando la solución 3Mix en concentración estándar: Cirprofloxacina 0.1 mg., Metronidazol 0.2 mg, y Minociclina 0.1 mg. diluidos en 10 ml. de agua destilada. Con ayuda de un microscopio endodóntico y bajo anestesia profunda (Hidrato de cloral, inyección intraperitoneal, dosis máxima de 350mg/kg.), la primera molar superior de cada animal fue extraída usando una pinza de algodón para luego ser sumergida en solución PBS o 3Mix. Al cabo de 30 minutos de inmersión, las piezas fueron reposicionadas en el alveolo sin necesidad de tratamientos adicionales en la pieza y/o en el alveolo.

Preparación de la muestra

Las muestras se recolectaron de cada uno de los grupos a los 7 (n=8) y 14 (n=8) días (Ver Tabla 1) luego de la operación de reimplantación. En cada uno de los dos periodos de observación los animales fueron sacrificados bajo anestesia profunda mediante la técnica de perfusión intracardiaca con solución salina, seguida por solución de Paraformaldehído al 4% en 0.1M de búfer fosfato salino (pH 7.4), previa inyección intraperitoneal de Hidrato de Cloral. La maxila de cada animal fue removida en su totalidad e inmersa por 12 horas adicionales en la solución fijadora de Paraformaldehído al 4%. Todas las muestras fueron decalcificadas usando Solución de Morse (10% Citrato de Sodio y 22.5% de Ácido Fórmico) por 4-6 días en condiciones de refrigeración. Las muestras fueron posteriormente deshidratadas y embebidas en parafina formando bloques, de los cuales se obtuvieron cortes de sagitales de la maxila de un grosor de 4 mm con la ayuda de un micrótopo. A continuación, los cortes de parafina fueron colocados en láminas histológicas silanizadas recubiertas (MAS,

Matsunami, Japón) y procesadas posteriormente para la tinción Hematoxilina-Eosina de acuerdo al protocolo descrito previamente por Saito y Col. (Saito et al.).

Tabla 1. Distribución de las muestras por periodos de observación

	Semana 1	Semana 2
Grupo PBS	n=4	n=4
Grupo 3Mix	n=4	n=4

RESULTADOS

Lado izquierdo (Sin tratamiento)

Se analizó la histología normal de una pieza no intervenida. El ligamento periodontal y el hueso de soporte se encuentra, debidamente conservado (Figura 1A, asterisco). Se aprecian pequeños vasos sanguíneos en el espacio periodontal y una completa ausencia de defectos óseos. Las fibras periodontales se observan debidamente adheridas al cemento (Imagen no presentada) sin áreas de reabsorción radicular a lo largo del perímetro de ambas raíces. El tejido pulpar también muestra características normales, incluyendo la presencia de vasos sanguíneos ubicados en toda la extensión de la pulpa radicular y coronal.

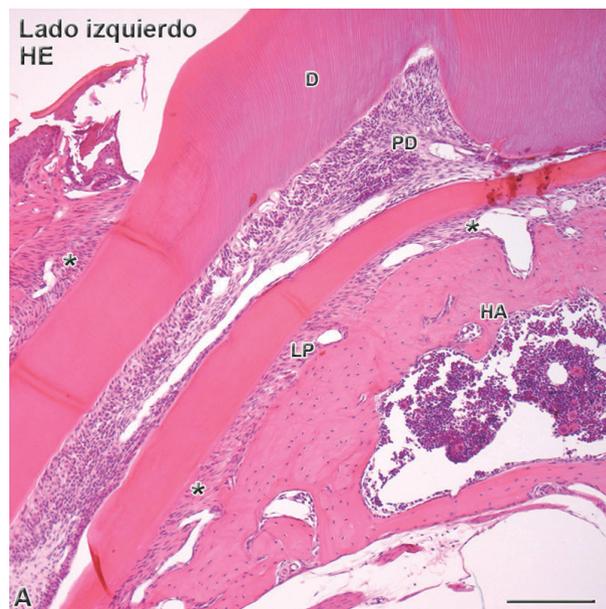


Figura 1. Tinción Hematoxilina-Eosina (A) de un corte sagital de una primera molar superior de un ratón albino de 3 semanas de edad. Se observan las características normales del periodonto y la pulpa dental. D, dentina; HA, hueso alveolar; LP, ligamento periodontal; PD, pulpa dental; * espacio periodontal. Escala: 250mm.

Primera semana

El uso de solución de PBS en piezas replantadas mostró ser relativamente favorable para la sobrevivencia del ligamento periodontal. Una semana después de la

operación de reimplantación (Figura 2A), el ligamento periodontal presenta características inflamatorias, con presencia de células inflamatorias entre las fibras periodontales y el tejido conectivo. El espacio periodontal se muestra ensanchado con un reducido número de capilares a comparación de lo observado en la molar sin tratamiento. El reborde alveolar ha retrocedido a causa de la inflamación producto del trauma de reimplantación y se observa la presencia de células osteoclasticas multinucleadas adheridas a la superficie radicular y a la tabla interna del hueso alveolar. En cuanto al tejido pulpar, este se encuentra completamente inflamado con pérdida total de su morfología característica, presencia de matrices eosinofílicas y ausencia de capilares sanguíneos. En el grupo experimental, se observó reacción inflamatoria leve en el ligamento periodontal de las piezas tratadas con solución 3Mix una semana luego del procedimiento de reimplantación (Figura 2B). Se identificaron células multinucleadas del tipo osteoclasto ubicadas en la periferia de la tabla interna del hueso alveolar y en las áreas de reabsorción radicular, las que a diferencia de lo observado en el grupo PBS, se localizaron con mayor frecuencia en el perímetro de la superficie radicular, incluyendo la unión cemento esmalte. El espacio entre el cemento radicular y la cortical se observa ensanchado debido a la recesión del hueso alveolar. En ciertas áreas, se observó la presencia de tejido óseo adherido a la superficie radicular (Flechas en Figura 2B). La pulpa dental mostró signos tempranos de recuperación, siendo la zona apical la primera en mostrar signos claros de reparación, con presencia de células tipo odontoblasticas alineadas bajo la pre-dentina, células fibroblásticas formando el cuerpo de la pulpa y vasos capilares ubicados en los dos tercios de la extensión de la pulpa radicular.

Segunda semana

Dos semanas después de la operación de reimplantación, el ligamento periodontal de las piezas tratadas con solución PBS muestra señales de recuperación, incluyendo la reaparición de vasos sanguíneos a lo largo de su extensión (Figura 3A). Sin embargo, se observó que el espacio periodontal disminuyó en grosor, mientras que el hueso alveolar aumentó en su dimensión vertical. El espacio ocupado por la médula ósea también disminuyó comparado con lo observado en la pieza sin tratamiento. Numerosas áreas de reabsorción radicular fueron identificadas en este periodo de observación, principalmente en el tercio apical y en la unión cemento esmalte. La pulpa dental ha recuperado parcialmente su morfología habitual aunque ciertas áreas de inflamación aún persisten bajo los cuernos pulpares; los odontoblastos se encuentran alineados bajo la pre-dentina y los capilares sanguíneos reaparecieron en el tejido pulpar. Por el contrario, la inmersión en solución 3Mix por 30 minutos demostró ser nociva para la sobrevivencia del ligamento periodontal en piezas replantadas, más no así para la reparación del tejido pulpar (Figura 3B). Las muestras tratadas con la solución 3Mix mostraron en su totalidad una severa anquilosis de la raíz en este periodo de

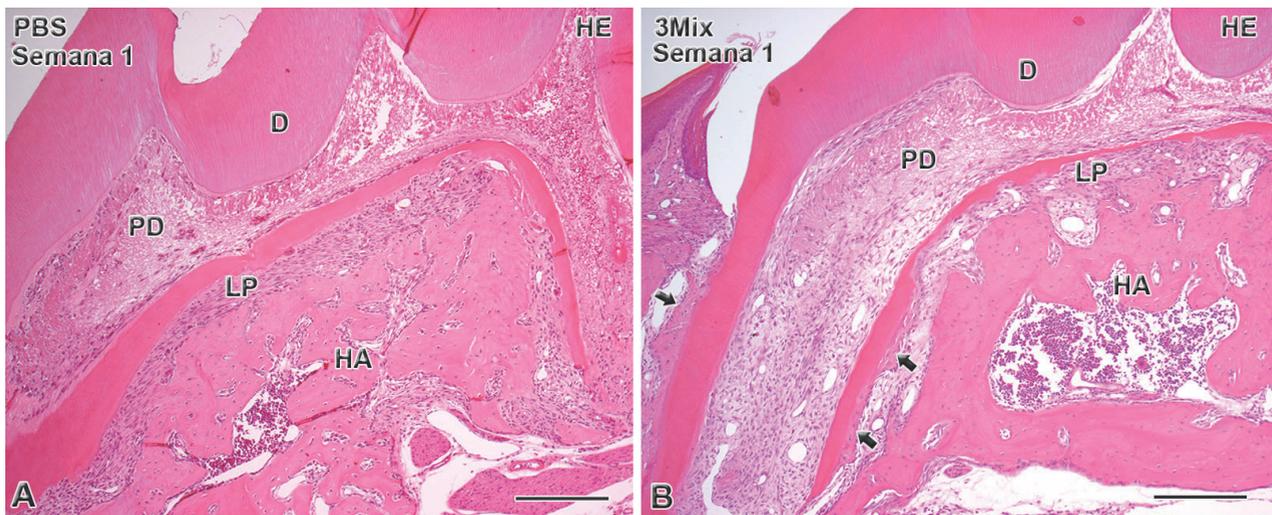


Figura 2. Tinción Hematoxilina-Eosina del grupo PBS (A) y 3Mix (B) en la primera semana luego de la operación de reimplantación. En el grupo 3Mix se observan zonas con hueso alveolar adherido a las raíces. D, dentina; HA, hueso alveolar; LP, ligamento periodontal; PD, pulpa dental. Escala: 250mm.

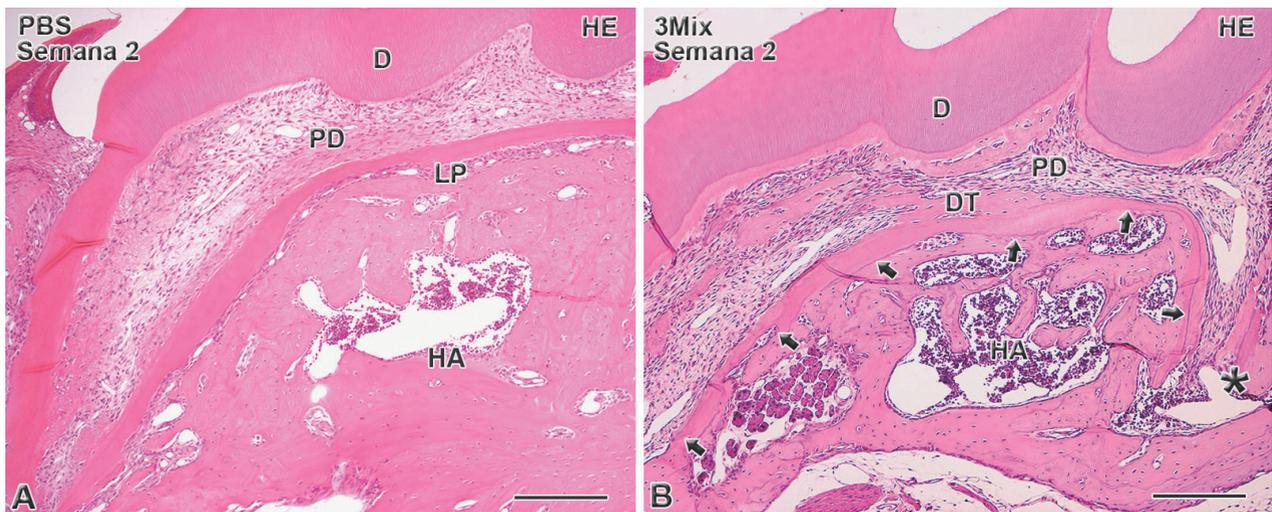


Figura 3. Tinción Hematoxilina-Eosina del grupo PBS (A) y 3Mix (B) en la segunda semana luego de la operación de reimplantación. Nótese completa a anquilosis de las raíces en el grupo tratado con la solución 3Mix. D, dentina; DT, dentina terciaria (ostedentina); HA, hueso alveolar; PD, pulpa dental. Escala: 250mm.

observación (Flechas en Figura 3B). El ligamento periodontal ha sido reemplazado casi en su totalidad por el hueso alveolar hasta la altura de la unión cemento esmalte (Imagen no mostrada); sin embargo, se observó una ligera separación en la zona apical (Figura 3B, asterisco). En cuanto a la pulpa dental, el uso de la solución 3Mix promovió la reparación del tejido pulpar, incluyendo la formación de tejidos duros compatible con dentina terciaria (dentina de reparación u osteodentina), en la pulpa coronal y radicular; y la reaparición de los vasos capilares en toda la extensión de la pulpa dental.

DISCUSIÓN

El presente estudio preliminar ha demostrado histológicamente que la solución 3Mix en procedimientos

de reimplantación afecta negativamente la viabilidad del ligamento periodontal in vivo. Asimismo, el modelo usado en este estudio resultó ser favorable para la evaluación de sustancias experimentales usadas en el tratamiento de piezas extraídas previo a su reimplantación en el alveolo dentario. Nuestra metodología se ha basado en el estudio de Hasegawa et al., quienes en el año 2006 describieron la influencia del tiempo extraoral en el tipo de respuesta pulpar de piezas reimplantadas sin tratamiento endodóntico en ratones. Sin embargo, aquel estudio se limitó a describir el estado de la pulpa dental obviando las implicancias de los tejidos de soporte del diente, haciendo de nuestro reporte uno de los primeros en cuanto al uso de esta metodología para evaluar la condición del periodonto.

La contaminación y desecación de la superficie de la raíz dental, incluyendo las fibras periodontales remanentes; así

como la contaminación del alveolo dentario son las principales causas del fracaso de los procedimientos de reimplantación. En el año 2003, Ma y Sae-Lim reportaron que el uso de Minociclina aplicada de manera tópica en las raíces de piezas reimplantadas en monos mejoraba ligeramente la reabsorción radicular y la ocurrencia de anquilosis. Recientemente, se ha sugerido que la administración sistémica de antibióticos, tales como la tetraciclina y amoxicilina, podría favorecer el proceso reparativo del ligamento periodontal. Usando un modelo de reimplantación en ratas, se observó que la administración sistémica de amoxicilina favoreció el pronóstico de las piezas reimplantadas, a comparación del uso de la tetraciclina (Souza-Gomes WD et al.). Por otro lado, el grupo de Hoshino, ha publicado desde 1990 una serie de artículos donde se demuestra la eficacia de la combinación de tres antibióticos de amplio espectro: Metronidazol, Minociclina y Ciprofloxacina, comúnmente llamada 3Mix, en bacterias prevalentes en dentina infectada, pulpas necróticas y lesiones periapicales. Ya que las bacterias prevalentes en lesiones endo-perio suelen ser siempre del tipo anaerobio facultativo y/o estricto, es de esperarse que esta combinación antibiótica sea aún más efectiva en la erradicación de bacterias aerobias, las que probablemente sean las primeras en colonizar el alveolo luego de un evento traumático tal como la avulsión dentaria. En nuestro estudio, la Solución 3Mix redujo la condición inflamatoria del ligamento periodontal una semana después de la operación de reimplantación; y, subsecuentemente, indujo una severa reabsorción de la raíz y anquilosis total de las piezas dos semanas después del tratamiento. Este hallazgo desfavorable se relaciona con los resultados obtenidos por Yadlapati et al. en el 2014, quienes reportaron que la combinación antibacteriana 3Mix afectó negativamente la viabilidad de las células del ligamento periodontal de humanos in vitro. De esta manera, se sugiere que las concentraciones usadas en la preparación de la Solución 3Mix estarían elevadas, siendo las causantes de la alta citotoxicidad y posterior degeneración del ligamento periodontal. Por el otro lado, el uso de agua destilada podría también estar alterando la viabilidad de las células del ligamento periodontal dado que el pH alcalino (8.0) de ésta es mayor que el del citoplasma celular en su estado normal (7.0), aunque no se tienen reportes publicados in vitro o in vivo.

Es interesante remarcar que la Solución 3Mix aceleró efectivamente la respuesta de la pulpa dental, observándose la formación de tejidos duros compatibles con dentina terciaria, también llamada dentina de reparación u osteodentina en la cámara pulpar dos semanas después de la reimplantación y tratamiento; a diferencia del grupo PBS, donde se observó que la pulpa dental se encontraba aún en proceso de cicatrización. Este resultado comprueba los hallazgos reportados por Quispe-Salcedo et al., donde observaron también la formación de dentina de reparación, identificada mediante técnica inmunohistoquímica para la proteína Nestina, dos semanas después del tratamiento con Solución 3Mix y reimplantación en el alveolo dental.

CONCLUSIONES

Se demuestra según los hallazgos presentados que el uso de la Solución 3Mix afecta negativamente la viabilidad del ligamento periodontal en piezas sometidas a procedimiento de reimplantación dental intencionalmente demorada. Se sugiere utilizar técnicas inmunohistoquímicas para futuras investigaciones en el tema.

Agradecimientos

Los autores agradecen la asistencia técnica del Sr. Shin-Ichi Kenmotsu. El presente trabajo fue realizado con el apoyo de la Japan Society for Promotion of Science (JSPS) mediante el financiamiento de ayuda para la exploración científica (Grants-in-Aid for Exploratory Research No 25670777) otorgado al Dr. Hayato Ohshima (Universidad de Niigata).

Conflicto de intereses

Los autores no mostramos ningún tipo de interés.

BIBLIOGRAFIA

1. Andreasen JO, Andreasen FM, Andersson L. Textbook and color atlas of traumatic injuries to the teeth. 4th ed. Oxford, UK; Ames, Iowa: Blackwell Munksgaard; 2007.
2. Trope M. Avulsion of permanent teeth: theory to practice. *Dent Traumatol* 2011; 27: 281-94.
3. Pérez PE, Martínez ME, Cortez JI, Marín O, Velasco EC, Arenas JA. Reimplantación dental intencional con regeneración tisular guiada con soporte de injerto óseo. *Oral*. 2007; 8(25): 384-387.
4. Chaple AM, Gil Y, Cobas B. Reimplante dentario después de 72 horas avulsionado
5. *Rev Cubana Estomatol*. 2014; 51(3).
6. Petrovic B. Factors related to treatment and outcomes of avulsed teeth. *Dent Traumatol*. 2010; 26(1):52-59.
7. Fariniuk LF. Evaluation of care of dentoalveolar trauma. *J App Oral Sci*. 2010; 8(4):343-45.
8. Souza-Gomes WD, Antoniali-Silva C, Evangelista-Melo M, Ferreira da Silva V, Marques de Almeida M, Pedrini D, Poi WR, Sonoda CK, Panzarini SR. Delayed tooth replantation in rats: effect of systemic antibiotic therapy with amoxicillin and tetracycline. *Dent Traumatol*. 2015; 31: 448-456.
9. Andreasen JO. Effect of extra alveolar period and storage media upon periodontal and pulpal health after replantation of mature permanent incisors in monkey. *Int J Oral Surg*. 1981a; 10:43-53.
10. Hammarstrom L, Blomlof L, Lindskog S. Dynamics of dentoalveolar ankylosis and associated root resorption. *Endod Dent Traumatol* 1989; 5: 163-175.
11. Tsukiboshi M, Tsukiboshi T. Bone morphology after delayed tooth replantation - case series. *Dent Traumatol*. 2014; 30: 477-483.
12. Khademi AA, Atbaee A, Razzavi SM, Shabani M.

- Periodontal healing of replanted dog teeth stored in milk and egg albumen. *Dent Traumatol.* 2008; 24: 510-4.
13. Blomlof L, Lindskog S, Hedstrom KG, Hammarstrom L. Vitality of periodontal ligament cells after storage of monkey teeth in milk or saliva. *Scand J Dent Res.* 1980; 88: 441-5.
 14. Hiltz J, Trope M. Vitality of human lip fibroblasts in milk, Hank's balanced salt solution and Viaspan storage media. *Endod Dent Traumatol.* 1991; 7: 69-72.
 15. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RK, Moreschi E et al. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dent Traumatol.* 2010; 26: 323-31.
 16. Lustosa-Pereira AL, Garcia RB, Moraes IG, Bernardineli N, Bramante CM, Bortoluzzi EA. Evaluation of the topical effect of alendronate on the root surface of extracted and replanted teeth. Microscopic analysis on rat's teeth. *Dent Traumatol.* 2006; 22: 30-5.
 17. Lam K, Sae-Lim V. The effect of Emdogain gel on periodontal healing in replanted monkeys' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004; 97: 100-7.
 18. Tuna EB, Arai K, Tekkesin SM, Seymen S, Gencay K, Kuboyama N, Maeda T. Effect of fibroblast growth factor and enamel matrix derivative treatment on root resorption after delayed replantation. *Dent Traumatol.* 2015; 31: 49-56.
 19. Takushige T, Cruz EV, Asgor Moral A, Hoshino E. Endodontic treatment of primary teeth using a combination of antibacterial drugs. *Int Endod J.* 2004; 37(2):132-8.
 20. Sato T, Hoshino E, Uematsu H, Noda, T. In vitro antimicrobial susceptibility to combinations of drugs of bacteria from carious and endodontic of human deciduous teeth. *Oral Microbiol Immunol.* 1993; 8(3): 172-176.
 21. Quispe-Salcedo A, Ida-Yonemochi H, Ohshima H. Effects of a triple antibiotic solution on pulpal dynamics after intentionally delayed tooth replantation in mice. *J Endod.* 2014; 40(10):1566-72.
 22. Saito K, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Kenmotsu S, Ohshima H. The expression of GM-CSF and osteopontin in immunocompetent cells precedes the odontoblast differentiation following allogenic tooth transplantation in mice. *J Histochem Cytochem.* 2011; 59(5):518-29.
 23. Ma KM, Sae-Lim V. The effect of topical minocycline on replacement resorption of replanted monkeys' teeth. *Dent Traumatol.* 2003; 19(2): 96-102.
 24. Hoshino E, et al. In-vitro antimicrobial susceptibility of bacteria taken from infected root dentine to a mixture of ciprofloxacin, metronidazole and minocycline. *Int Endodont J.* 1996; 29(2): 125-130.
 25. Yadlapati M, Souza LC, Dorn S, Garlet GP, Letra A, Silva RM. Deleterious effect of triple antibiotic paste on human periodontal ligament fibroblasts. *Int Endod J.* 2014; 47(8):769-75.