



**UNIVERSIDAD MICHOACANA
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS Y BIOLÓGICAS

DR. IGNACIO CHÁVEZ

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

LABORATORIO DE NEUROCIENCIAS

**“DESARROLLO DE UN MODELO EXPERIMENTAL PARA
EVALUAR RESPUESTA INFLAMATORIA EN PERIODONTO
DE RATA, CON LESIÓN PERIAPICAL INDUCIDA”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD

PRESENTA:

C.D.E.E. RUBÉN ABRAHAM DOMÍNGUEZ PÉREZ

DIRECTOR DE TESIS:

D. en C. GRACIELA MARÍA EUGENIA LETECHIPIA VALLEJO

CODIRECTOR DE TESIS:

M. en C.S. MANUEL LÓPEZ RODRÍGUEZ

MORELIA, MICHOACÁN JUNIO DE 2013

MÉXICO

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Neurociencias de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez” de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la tutoría de la Doctora en Ciencias Biomédicas Graciela María Eugenia Letechipia Vallejo, y en el Laboratorio de Histopatología de la Unidad de Servicios Auxiliares para el diagnóstico (USAD) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo bajo la co-tutoría del Maestro en Ciencias de la Salud Manuel López Rodríguez.

Contenido

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
1.- INTRODUCCIÓN.....	6
2.- ANTECEDENTES.....	15
3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4.- JUSTIFICACIÓN.....	18
5.- HIPÓTESIS.....	19
6.- OBJETIVO GENERAL.....	19
6.1.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	19
7.- MATERIAL Y MÉTODOS.....	20
Método.....	20
• Desarrollo del modelo (primera etapa).....	21
• Evaluación del modelo (segunda etapa).....	30
8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	33
9.-RESULTADOS.....	34
10.- DISCUSIÓN.....	50
11.- CONCLUSIONES.....	58
11.1 Perspectivas.....	59
12. - BIBLIOGRAFÍA.....	60

RESUMEN.

Introducción: El éxito de un tratamiento endodóntico depende en gran medida del tipo de materiales que se utilizan en la obturación de los conductos. Se reporta en la literatura una respuesta inflamatoria periapical que persiste años después de la obturación endodóntica, incluso sin manifestaciones clínicas, ni alteraciones radiográficas, la cual puede estar relacionada con la ausencia de biocompatibilidad del material de obturación. Existen algunos modelos experimentales que permiten la evaluación de biomateriales de uso endodóntico *in vivo*, sin embargo no existen modelos que permitan su evaluación en tejidos similares y bajo las mismas condiciones patológicas para los que son diseñados. Los tejidos periodontales de rata poseen similitudes anatómicas, histológicas, y fisiológicas con los tejidos humanos. **Objetivos:** Desarrollar y evaluar un modelo experimental que permita estudiar la respuesta a materiales de endodoncia en tejido periapical inflamado. **Material y Métodos:** Se utilizaron ratas Wistar a las que se indujo periodontitis apical, posteriormente se realizó el tratamiento endodóntico, finalizándolo con la sobre obturación de dos diferentes selladores endodónticos. La respuesta inflamatoria ante estos materiales fue evaluada por medio de cortes histológicos del tejido periapical. **Resultados:** se desarrollo el modelo y se realizaron 2 ensayos experimentales para evaluar su funcionalidad. El primero mostró que la exposición pulpar al medio bucal de la rata durante 21 días es suficiente para inducir la lesión, obteniendo una media de $1.409 \pm 0.1071 \text{ mm}^2$ en el área de lesión radiográficamente detectable, presentando una diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.0001$) al compararlo con la inducción de 36 días. El segundo ensayo evaluó histológicamente las muestra, encontrando que en el Grupo Control negativo: los tejidos periápicales permanecieron sanos y normales, en el grupo Control positivo: se observaron los datos característicos de un tejido periodontal inflamado, mientras que en los Grupos expuestos claramente se observo un infiltrado inflamatorio adyacente a ambos cements implantados en todos los casos, además de que se encontró una correlación ($P < 0.0001$) entre el área de infiltrado inflamatorio y la longitud de material expuesto.

ABSTRACT.

Introduction: The success of an endodontic treatment depends largely on the type of materials used in sealing the canals. There are some reports in the literature about periapical inflammatory response that persists years after endodontic sealing even without clinical or radiographic abnormalities, which may be related to lack of biocompatibility of the sealing material. Some animal experimental models have been proposed which enable the evaluation of endodontic biomaterials *in vivo*; however there are no models for evaluation of these materials in similar tissues under the same pathological conditions for which they are designed. Rat periodontal tissue has anatomical, histological, and physiologic similarities with human tissues. **Objectives:** To develop and evaluate an experimental model that allows to study the response to endodontic materials in inflamed periodical tissue. **Material and Methods:** Wistar rats were used for induced apical periodontitis, later, endodontic treatment was performed, ending it with a overextend obturation of two different endodontic sealers. The inflammatory response to these materials was assessed by histological tissue analysis. **Results:** We developed the model and conducted two experimental trials to evaluate its functionality. The first showed that the pulp exposure to the oral environment of the rat for 21 days is sufficient to induce the injury, with a mean of $1,409 \pm 0.1071 \text{ mm}^2$ in radiographically detectable lesion area, showing a statistically significant difference ($P < 0.0001$) when compared with the induction of 36 days. The second trial evaluated histologically shows, that in the Intact Group: periapical tissues remained healthy and normal, in the positive control group: data observed characteristic of inflamed periodontal tissue, while clearly exposed groups was observed infiltration inflammatory implanted adjacent to both cements in all cases, and it was found a strong correlation between the area of inflammatory infiltrate and the length of material exposed.

1.- INTRODUCCIÓN

Por definición, la endodoncia es la rama de la Odontología que tiene que ver con la morfología, la fisiología y la patología de la pulpa dental humana y los tejidos periápicales. Su estudio y practica abarca las ciencias básicas y clínicas, incluyendo biología de la pulpa normal y la etiología, diagnostico, prevención y tratamiento de enfermedades y lesiones de la pulpa, así como de las condiciones perirradiculares asociadas.¹

Actualmente no hay duda de la relevancia que el tratamiento de conductos ha tomado en la población. Según la Asociación Dental Americana (ADA), en Estados Unidos para el año 1969, se realizaron 6 millones de tratamientos de conductos. En 1990 se reportó un ascenso a 13,870,000 casos y aumento hasta 30 millones para el año 2000.²

Según Spangber³, Langeland afirmaba que en el siglo pasado “la mayoría de los procedimientos terapéuticos en endodoncia se basaban en consideraciones filosóficas, y lo que es peor, en opiniones personales y/o en la experiencia clínica de diferentes autores, y no en evidencia científica.”

El objetivo del tratamiento endodóntico en dientes con necrosis pulpar y lesión periapical debe ser la reparación histológica completa, teniendo siempre presente que la ausencia de dolor postoperatorio no es determinante de éxito en la terapia.³

El éxito del tratamiento endodóntico se define por la evaluación clínica y radiográfica posterior al tratamiento, así como histológicamente, al extrapolarse los resultados obtenidos mediante investigación, en general realizada en animales de experimentación,³ ya que se ha encontrado que algunos tratamientos en dientes con necrosis pulpar y lesión periapical crónica, los hallazgos microscópicos (histológicos), comparados con los radiográficos, son frecuentemente diferentes.⁴ Leonardo³ confirmó esto, pues encontró que, en muchos casos, la reacción inflamatoria crónica periapical puede persistir años después de la obturación del conducto radicular, incluso en ausencia de sintomatología clínica y alteraciones radiográficas, estando de acuerdo con Katebzadeh et al.⁵⁻⁶ y Nair et al.⁷ Rowe encontró que siempre que una radiolucencia periapical es detectada en una radiografía, histológicamente existe inflamación severa o moderada, y cuando radiográficamente se observa un ligamento periapical normal, histológicamente solo en el 55% de los casos lo está.⁸

La obturación endodóntica está directamente relacionada con el éxito del tratamiento e implica el uso de materiales adecuados a este fin. Se afirma que la obturación del conducto radicular desde el punto de vista fisicoquímico debe abarcar tres funciones principales:

- 1.- “Sepultar” las bacterias remanentes del tratamiento dentro del sistema de conductos radiculares (túbulos dentinarios, istmos, ramificaciones).

2.- Evitar la filtración de fluidos derivados de tejidos periápicales al interior del sistema de conductos radiculares, evitando que estos fluidos alcancen a las bacterias que sobreviven a la limpieza químico-mecánica.

3.- Actuar como una barrera física, evitando, por lo tanto, la reinfección del sistema de conductos radiculares a través de la cavidad oral.

Sin embargo, estos requisitos solamente son válidos si la obturación es satisfactoria y si el material obturador es biocompatible³

Un material biocompatible es aquel que tiene la propiedad de emplearse en una aplicación específica con una respuesta apropiada por parte del huésped, por lo que, un biomaterial es un material destinado a interactuar con los sistemas biológicos.⁹

Para el desarrollo y evaluación de materiales de uso odontológico son necesarias diferentes etapas que están descritas en el estándar 7405 de la International Standard Organización (ISO), que incluye tres etapas.¹⁰

La etapa uno incluye pruebas *in vitro*:

Las pruebas *in vitro* son populares para la evaluación de materiales particularmente en la investigación responsable que busca la disminución en el uso de animales de investigación. Es recomendado que estas pruebas sean realizadas previas a las pruebas *in vivo* para evaluar toxicidad aguda y citocompatibilidad.¹¹

El cultivo celular se centra en el crecimiento de células que no se organizan en tejidos, donde las células se obtienen ya sea a través de digestión enzimática o mecánicamente desde tejido nativo. Las pruebas *in vitro* dan información con respecto a la citotoxicidad, genotoxicidad, y a la proliferación y diferenciación celular. Son más fácilmente estandarizables y cuantificables que las pruebas *in vivo*.¹²⁻¹³ También son útiles para evaluar la calidad de productos en cuanto a la liberación de aditivos potencialmente nocivos, incorporados durante el proceso de fabricación.¹⁴ Sin embargo, la evaluación *in vitro* no es capaz de demostrar la respuesta del tejido a los materiales, pues esta respuesta está confinada a la respuesta de líneas de células individuales, siendo la respuesta al biomaterial distinta dependiendo de la línea celular utilizada. Además, las respuestas celulares, tales como citotoxicidad debido a la presencia de iones metálicos, pueden variar entre las líneas celulares.¹⁵

En el cultivo de tejidos se mantienen pequeños fragmentos de tejido, pero no necesariamente preservan la arquitectura y función original. Además están ausentes diversos factores sistémicos, como la falta de vascularización que limita la nutrición, el suministro de oxígeno y eliminación de desechos, por lo tanto la extrapolación de los resultados a la situación *in vivo* limita el modelo.

Las propiedades dinámicas del cultivo celular son difíciles de controlar y es difícil recrear las interacciones celulares apropiadas encontradas *in vivo*. Una de las principales limitaciones a la evaluación de biomateriales es la falta de control de carga fisiológica como la que necesita el tejido óseo para aumentar o disminuir la reabsorción.¹⁶ No es posible reproducir *in vitro* cargas fisiológicas que simulen la

situación *in vivo*. Actualmente existen los modelos *ex vivo*, pero muy pocos son capaces de acercarse a dicha carga fisiológica y por lo general sólo utilizan pequeñas muestras de tejido.¹⁷

Por estas razones las pruebas *in vivo* en modelos animales son esenciales para evaluar la biocompatibilidad con el tejido y la función mecánica de un material antes de su uso clínico en humanos.

La etapa dos evalúa toxicidad aguda sistémica ya sea por inhalación, aplicación en piel, o implantación en tejido subcutáneo del material. La tercera y última etapa incluye pruebas de uso en modelos animales, en tejidos comparables a los tejidos para los cuales se diseñaron (pulpa dental, ligamento, hueso).¹⁰

Un modelo animal tiene como atributos deseables tener similitudes con los seres humanos, en aspectos tanto fisiológicos como patológicos, así como la posibilidad de observar numerosos sujetos durante un tiempo relativamente corto.^{18, 19-20}

Estos modelos permiten la evaluación de materiales en situaciones diversas en un periodo largo y en calidades diferentes de tejido. Incluso pueden evaluarse en tejidos no vecinos al implante, lo cual es particularmente relevante para el estudio de partículas de desgaste, que se ha informado pueden viajar a diferentes órganos distantes como el hígado y el bazo.²¹ Por otro lado, los modelos animales pueden representar la situación clínica mecánica y fisiológica de los humanos, sin embargo hay que recordar que sólo son una aproximación. Cada modelo animal tiene ventajas y desventajas.²²

Hay varios factores que deben ser considerados sobre las especies animales que son utilizadas como modelo experimental. Según Schimandle y Boden²⁰, los factores de selección de animales son: el costo de adquisición y cuidado de los animales, la disponibilidad, la aceptabilidad para la sociedad, tolerancia al cautiverio, el bienestar y el alojamiento de los animales.

Las leyes de protección de animales indican el mínimo de requisitos en términos de dimensiones y características de la habitación, ambiente, iluminación, etc., que deben cumplirse al realizar un estudio en animales. Otros factores incluyen, la facilidad de manipulación, resistencia a infección y enfermedad, la uniformidad interanimal, características biológicas análogas a los seres humanos y la tolerancia a la cirugía.²⁰

En cuanto al número de animales utilizados, para la evaluación de materiales en hueso, existen normas internacionales establecidas en relación con la especies aptas para la implantación que afirman que se requiere el empleo al menos de un par de perros, ovejas, cabras o cerdos y por lo menos 4 conejos para cada tratamiento en cada periodo de implantación.²³

Es evidente que cada una de las especies posee ventajas y desventajas en términos de su adecuación como un modelo para demostrar la respuesta de tejido óseo para un material de implante. Mientras que los primates no humanos son a menudo considerados como los más apropiados. Existen claras implicaciones

éticas en el uso de estas especies para la investigación médica, así como el costo, riesgos de enfermedades zoonóticas y dificultades de manejo.²⁴⁻²⁵

De las especies mencionadas, el perro es descrito como quizás el que tiene la estructura ósea más similar a los seres humanos, pero, hay restricciones éticas del uso de los animales de compañía para la investigación médica. Mientras que las especies tales como las ovejas los cerdos y las ratas no son éticamente emotivas.²²

Los roedores son ideales para realizar investigaciones en el área biomédica, representan un excelente modelo gracias a su tamaño en comparación con otros animales utilizados para experimentación, esto facilita su manejo y control para experimentos fisiológicos y toxicológicos, además, su ciclo de vida corto, permite la obtención de resultados en un corto período de tiempo.²⁶

Desde la década de los años 30 se han propuesto métodos para evaluar la respuesta biológica a la implantación de diversos materiales de uso odontológico. En estas primeras evaluaciones de biocompatibilidad el material fue implantado directamente en tejido subcutáneo de roedores²⁷ sin embargo, esta implantación directa del material no permitía un adecuado control del mismo, sobre todo aquellos que tenían consistencias muy fluidas, pues terminaban difundándose entre los tejidos implantados; En la década de los sesentas se propuso mejorar esta metodología utilizando tubos de polietileno rellenos del material a estudiar, que también fueron implantados en tejido subcutáneo. De esta manera el material permanecía en el sitio de la implantación solucionando el problema de la difusión

del material a través de los tejidos. Además permitía el estudio de la respuesta histológica adyacente únicamente al material. Fue posible implantar distintos materiales simultáneamente en un animal y evaluar varias respuestas en un mismo sistema biológico.²⁸⁻³⁰ Actualmente esta metodología es recomendada por la ADA³¹⁻³³ y por la ISO^{10, 34-35} como prueba preliminar para evaluar *in vivo* la toxicidad de materiales cuando se dejan en contacto prolongado con tejidos subcutáneos. Este modelo sigue siendo muy popular en el mundo y actualmente se publican varios artículos al año bajo este diseño para evaluar materiales principalmente de uso endodóntico.³⁶⁻⁴³

De acuerdo a Till Dammaschke la ISO en el estándar 7405 incluyó para investigación de materiales odontológicos destinados a estar en contacto directo con dentina y pulpa, especies de mamíferos como monos, perros o puercos miniatura, los roedores no fueron incluidos para estos fines. Sin embargo, en los últimos 50 años se han publicado más de 70 investigaciones usando molares de ratas para evaluar recubrimientos pulpares, pulpotomías y respuesta de tejidos pulpares, aunque no para evaluar respuesta biológica a materiales de obturación o reparación endodóntica en tejidos afectados.⁴⁴

Los molares de rata, presentan similitudes anatómicas, histológicas, fisiológicas y pueden ser considerados como un molar humano pequeño.⁴⁴⁻⁴⁵ Las características del tejido conectivo y epitelial del periodonto de la rata son similares a las características de los tejidos periodontales humanos excepto por el epitelio del surco, que es queratinizado.⁴⁶ Dammaschke,⁴⁴ asegura que los resultados

obtenidos en investigaciones realizadas en molares de rata fueron más similares a los encontrados en molares humanos que los resultados obtenidos en estudios con perros, y en monos. A pesar de su cercanía filogenética al hombre, la respuesta biológica que presentan sus tejidos pulpaes en recubrimientos no fue similar a la mostrada por la pulpa humana y concluyo que el molar de la rata es un modelo valido para pruebas de materiales dentales, y evaluaciones preclínicas de la biocompatibilidad de los mismos. Stashenko et al.⁴⁷ mostraron también que la microbiota de los conductos radiculares de la rata es similar a la humana, más que la de perros y primates no humanos, lo que sugiere que el modelo en rata de patogénesis periapical es similar a la patogénesis periapical en primates. Adicionalmente, la respuesta biológica de las ratas progresa más rápido que la humana, correspondiendo un mes en la vida de la rata a 30 meses de vida humana.⁴⁸

Dammaschke,⁴⁴ concluyo que el estándar 7405 de la ISO debería explícitamente incluir y aprobar el modelo experimental en ratas, esto disminuiría la necesidad de experimentar con animales de laboratorio más grandes, los que podrían dejarse solo para aclarar resultados inconsistentes.

2.- ANTECEDENTES

El estudio de biomateriales específicamente de uso odontológico comienza en 1933 con Dixon y Rickert²⁷ al publicar su artículo “Tissue tolerance to foreign materials” en donde realizan implantación de materiales en tejido subcutáneo. A partir de aquí otros autores como Torneck,²⁸ Phillips²⁹ y Langeland³⁰ comenzaron a proponer y perfeccionar técnicas de implantación subcutánea de materiales y su estudio.

Aunque el modelo de implantación en tejido subcutáneo ofrece muchas ventajas, es importante destacar que los materiales de obturación o de reparación endodóntica nunca estarán en contacto con tejidos subcutáneos, como son estudiados en estos modelos, y mucho menos en tejidos sanos, por el contrario, estos materiales estarán en contacto con ligamento periodontal, dentina, cemento radicular, y muchas veces hueso alveolar (tejidos duros), en condiciones fisiopatológicas de infección e inflamación.

En 1955 Maurice y cols⁴⁹ publican un artículo titulado “Experimental cavity preparations in the molar of the rat”, con lo que comienza el desarrollo de nuevas técnicas. Berman y cols.⁵⁰ en 1958, realizan las primeras pulpotomías experimentales en molares de rata, esta técnica brinda la oportunidad y el interés de evaluar la respuesta pulpar ante el estímulo de algunos fármacos, antibióticos y antiinflamatorios. (fluoruro de sodio, hidrocortisona, corticoesteroides, tetraciclinas, formocresol, formaldehído)⁵¹⁻⁵⁸

Takehashi en 1965 publica el estudio “The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats” en donde muestra la influencia bacteriana en la patología pulpar, realizado en molares de rata.⁵⁹

A partir de 1966 se comenzó a estudiar la respuesta del tejido pulpar ante el estímulo con distintos materiales (biomateriales), tan diversos como: óxido de zinc, hidróxido de calcio, compuestos metálicos, ionómero de vidrio, hidroxiapatita, composites, adhesivos, mineral trióxido agregado, entre otros.⁶⁰⁻⁸⁶

En la década de los 90 el doctor Stashenko⁴⁷ utilizó los molares de la rata como modelo para establecer la patogénesis de una lesión periapical inducida.

En cuanto a modelos para evaluar la respuesta en tejidos periápicales en rata, los pioneros en estos modelos fueron los doctores Muruzábal y Erausquin⁸⁷⁻⁹¹ quienes desde 1963 publicaron estudios que evaluaron la respuesta periapical a la implantación de diferentes fármacos y materiales (biomateriales).⁹²⁻⁹⁶

Debido a las complicaciones técnicas que presenta el modelo en ratas para la implantación de materiales a través de los conductos radiculares, no existen muchos grupos de investigación interesados en el modelo, además se han propuesto otros modelos que buscan implantar los materiales en tejidos periápicales sin utilizar los conductos como vía de acceso, y haciendo uso de técnicas quirúrgicas, como en el caso del modelo propuesto por Mutoh y cols.⁹⁷ en donde realizaron extracciones de los molares, para ser retroobturados con distintos materiales y posteriormente reimplantados en su alveolo. Otro ejemplo es

el modelo propuesto por Maeda y cols.⁹⁸ en el cual realizaron un colgajo y ventana quirúrgica para lograr introducir los materiales en la zona periapical. Sin embargo en los últimos años, han surgido dos grupos que trabajan en estos modelos, uno dirigido por Dammaschke y cols.⁹⁹, que retoman el estudio de la respuesta de los tejidos periapicales ante el uso de algunos biomateriales vía intraconducto, y el otro a cargo de Zmener y cols.¹⁰⁰ que han comenzado a evaluar respuesta periapical a la sobreobturacion de materiales de uso endodóntico.

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El modelo más adecuado para la evaluación de respuesta biológica frente al uso de materiales de obturación o reparación endodóntica será aquel que simule condiciones y reproduzca primeramente un proceso patológico (infección - inflamación) para después estimular a la reparación dependiente del tratamiento y de las propiedades del material de obturación. Siendo importante la similitud anatómica y fisiológica de los tejidos en donde se implantarán y la forma en cómo se llevan a estos tejidos, pues debe ser la misma como se hace en la clínica.

4.- JUSTIFICACIÓN

No existe un modelo experimental en ratas que permita el estudio de respuesta inflamatoria periapical como resultado del uso de materiales de obturación endodóntica que sea comparable a las condiciones en las que se utilizan, se llevan a la zona y son evaluados radiográficamente.

Por lo tanto, es de suma importancia el desarrollo de un modelo que sea realmente extrapolable a las condiciones en las que se utiliza y se lleva a la zona el material de obturación, en los tejidos adecuados; que pueda cumplir al 100% con el protocolo endodóntico, y no solo con el potencial de ser un modelo para evaluar materiales de obturación, sino con las posibilidades de poder evaluar soluciones irrigantes, medicamentos intraconducto y hasta fármacos, siendo este modelo la base para muchas posibilidades de investigación endodóntica.

5.- HIPÓTESIS.

El modelo propuesto permitirá implantar materiales en tejidos periapicales e identificar respuestas inflamatorias distintas dependiendo de la composición del material de obturación endodóntica utilizado

6.- OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un modelo experimental que permita evaluar el proceso inflamatorio periapical en respuesta a la implantación de materiales de uso endodóntico.

6.1.- OBJETIVOS PARTICULARES

- Desarrollar un modelo experimental en rata para la implantación de materiales de uso endodóntico.
- Evaluar la respuesta inflamatoria periapical mediante técnicas histológicas.
- Medir el tamaño de la lesión periapical inducida experimentalmente sobre Imágenes radiográficas digitales a corto y largo plazo.
- Evaluar el modelo al utilizarlo para comparar dos cementos selladores de características químicas distintas que se encuentran actualmente en el mercado

7.- MATERIAL Y MÉTODOS

Los procedimientos experimentales se realizaron de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana (NOM 062-ZOO-1999) de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la guía de los institutos de salud de Norteamérica (NIH) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (publicación NIH No. 80-23, 1996) Teniendo siempre presente reducir al mínimo el dolor y sufrimiento de los animales.

El protocolo fue puesto a consideración por el Comité de Ética e Investigación de la Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, UMSNH.

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 300 y 600g, las cuales se mantuvieron en cajas de acrílico bajo condiciones controladas de luz-oscuridad (12h/12h), temperatura constante de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ y suministro de agua y alimento *ad libitum*. Los anestésicos utilizados fueron: clorhidrato de ketamina al 10% marca Anesket y clorhidrato de xilacina al 2% marca Xilapet, ambas de uso veterinario.

Método

El proyecto de investigación se dividió en dos etapas, la primera llamada “Desarrollo del modelo” y la segunda, llamada “Evaluación del modelo” la cual consistió en iniciar la validación del mismo al utilizarlo para comparar la respuesta a dos cementos de uso endodóntico que ya se encuentran en el mercado.

Desarrollo del modelo (primera etapa)

Se divido en tres fases:

- a) Procedimientos en los animales
- b) Procedimientos en las hemimandibulas
- c) Procedimientos Histológicos

a) Procedimientos en los animales.

1.- Técnica anestésica

Se aplicó una combinación de ketamina (50mg/kg, i.p.) y xylacina (5mg/kg, i.p.).

(Vea recomendaciones; A)

2.- Posición de trabajo

Se fabricó un dispositivo para la colocación ergonómica del animal y del operador durante los procedimientos operatorios. El animal se posicionó sobre una camilla de 25cm x 10 cm fija a una barra metálica de donde a su vez emergen dos barras paralelas unidas entre sí. Todo unido a un soporte metálico fijo a la mesa de trabajo. Sobre esta, el animal se colocó decúbito dorsal con una marcada inclinación de manera que la cabeza quedó más alta que la cola. El microscopio estereoscópico quirúrgico (Carl Zeiss 26516, Germany) se colocó sobre la mesa de trabajo justo por arriba de la cabeza del animal y de frente al operador. Esta posición de trabajo se utilizó en todos los procedimientos operatorios en el animal.

(Fig. 1)

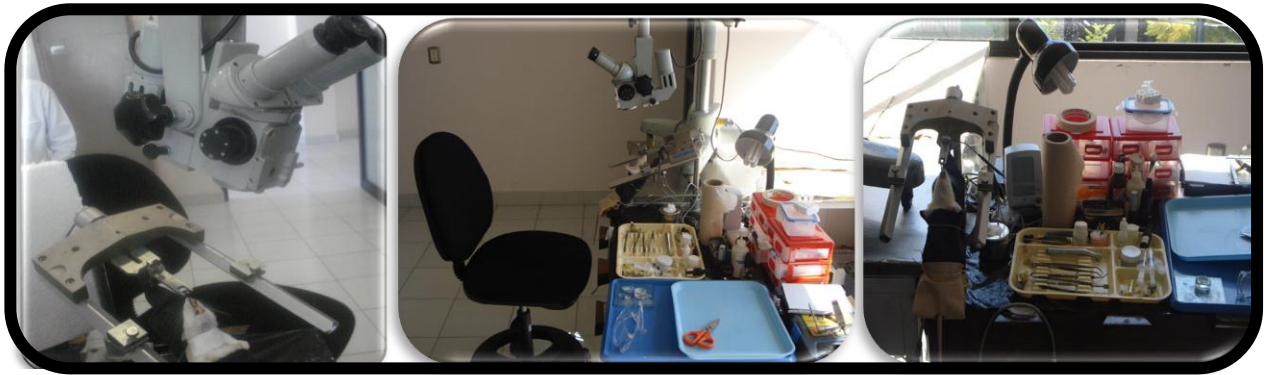


Figura 1.

3.- Aislamiento absoluto de la zona operatoria

Se diseñó y modeló un aditamento en acrílico auto curable que permitió mantener la boca de la rata en máxima apertura. A este aditamento se le hizo una perforación en la zona de primeros molares, lo que permitió el aislamiento absoluto del campo operatorio, esta cavidad ajustó en todos los animales de la misma talla. Sin embargo para asegurar un aislamiento perfecto, se utilizó resina fluida fotocurable azul, misma que se colocó entre las paredes del molar y los bordes de la cavidad en el aditamento. (Fig.2) (Vea recomendaciones; B)

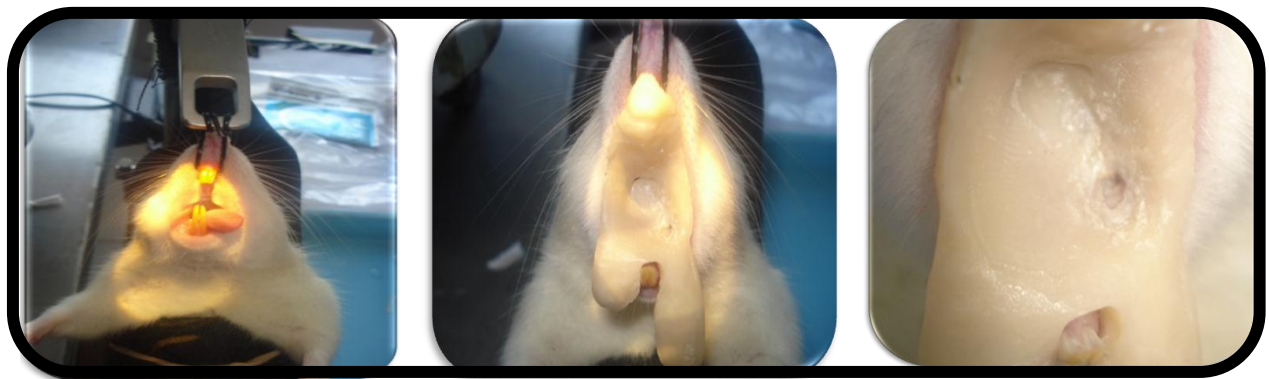


Figura 2.

4.- Inducción de lesión periapical

Se empleo la metodología propuesta por Stachenko.^{47, 101} Se realizo el tallado de dos cavidades en la superficie oclusal de primeros molares inferiores derecho e izquierdo, una sobre la fosa mesial y la otra sobre la fosa distal. (Vea recomendaciones; C) Se utilizo una fresa de carburo con forma de bola del numero ¼ montada en una pieza de alta velocidad, estas cavidades se profundizaron hasta traspasar el techo de la cámara pulpar y observar sangrado, teniendo cuidado de no tocar el piso y sobre todo evitar una perforación en furca. (Fig.3) Posteriormente se permearon ambos conductos mesial y distal introduciendo 3 milímetros de una lima calibre ISO 0.6 nueva para cada caso. Se realizo una ligera irrigación con solución salina a presión de jeringa de 5ml y aguja de 13 mm 30G, para asegurar que el acceso a los conductos fuera permeable y la eliminación de la mayor cantidad de pulpa cameral para evitar en lo máximo posible el dolor posoperatorio pulpar. Estas cavidades se dejaron expuestas al medio bucal de la rata durante 21 días.



Figura 3.

5.- Procedimiento endodóntico y extrusión del material

Una vez anestesiado y colocado el animal en la posición de trabajo, con una fresa de carburo con forma de bola de tamaño $\frac{1}{4}$ se unieron ambas cavidades para de esta manera realizar el acceso coronario y exposición de la entrada a los conductos. Se comenzó la irrigación con hipoclorito de sodio al 2.5% con una jeringa de 5ml y una aguja 30G de 13mm, con lo que se retiraron restos de alimento. Se comenzó la instrumentación de los conductos con una lima calibre ISO 0.6 introduciéndola 6mm, medida que se utilizó de manera estándar para todos los conductos como medida de longitud total. Posteriormente se llevaron a esa longitud también las limas calibre ISO 0.8 y 1.0 realizando irrigación continua entre cada recambio de instrumento. Posteriormente se llevaron las limas calibre ISO 1.5 y 2.0 a una longitud de 5.5mm repitiendo constantemente la irrigación. La instrumentación se concluyó con una lima calibre ISO 2.5 a una longitud de 4mm. (Fig.4) Se realizó una irrigación final y se secaron los conductos con puntas de papel calibre ISO 1.5. Se preparó para algunos casos cemento sellador AH Plus (Dentsply) y para otros cemento sellador Silco (Productos endodónticos especializados) siguiendo las instrucciones de cada fabricante. Con limas calibre ISO 1.0 y 1.5 se llevaron los cementos a los conductos en donde con movimientos de entrada y salida junto con movimientos de rotación inversa se introdujo el material a los conductos. Posteriormente con una punta de gutapercha calibre ISO 1.5 se llevó más cemento al conducto para finalizar el procedimiento dejando la gutapercha dentro del mismo. Se eliminó el resto de la gutapercha con un

instrumento caliente y se compacto en la entrada del conducto. Se elimino el exceso de cemento sellador de la cámara pulpar con pequeñas torundas de papel. Se lavó la cavidad, se secó y se impregnaron sus paredes con adhesivo para resina, posteriormente se obturó con resina fluida y se polimerizó. Se revisó que la restauración tuviera un nivel adecuado y no presentara sobre- obturación que causara trauma de oclusión. (Fig.5)



Figura 4.



Figura 5.

6.- Procedimientos de eutanasia

Los animales se recibieron una sobredosis inhalada de éter y se procedió a la disección de la mandíbula una vez que se verifico la perdida total de signos vitales.

b) Procedimientos en las hemimandibulas

1.-Limpieza y fijación de las hemimandibulas:

Ambas hemimandibulas (derecha e izquierda) se lavaron en agua corriente, se

eliminaron restos de tejidos blandos y se sumergieron en 50ml de solución de formalina para su fijación por mínimo 48 horas. (Vea recomendaciones; D)

2.- Obtención de radiografía digital estandarizada

Durante el periodo de fijación se obtuvieron las imágenes radiográficas. Se fabricó un dispositivo que permitió que todas las exposiciones fueran en la misma posición y a la misma distancia, este dispositivo consistió de un anillo de metal que se sujetó al cono radiográfico del aparato de rayos x (Corix 70 plus, Coramex) (Fig.6). De este anillo emerge una barra que sujeta la base en donde fueron colocadas todas las hemimandibulas, debajo de estas (Fig.7) el sensor del radiovisiografo (Brío T10, Brío Basic Radiography Series), encima del sensor se colocó una lamina de acero de 4mm de longitud. Esta base posee una lámina delgada de silicona con una impresión previa de una hemimandibula, de manera que permitió que cualquier hemimandibula se mantuviera en la misma posición siguiendo referencias anatómicas marcadas en la silicona. (Fig.8) El tiempo de exposición utilizado fue de 0.16 milisegundos en todos los casos. Las imágenes radiográficas digitales sirvieron para clasificar las muestras y además para obtener información acerca del desarrollo de la lesión periapical. Las imágenes fueron exportadas al programa Image Pro-plus (Media Cybernetics) que fue calibrado en milímetros utilizando la imagen de la lámina de acero. Con la herramienta de trazado de áreas se marco manualmente el área radiolucida circunscrita al ápice de cada raíz por separado. Esto se realizo por triplicado en diferentes tiempos por el mismo operador. Los valores numéricos de área de lesión medidos en

milímetros cuadrados de cada hemimandíbula fueron exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft office) para su procesamiento.



Figura 6.

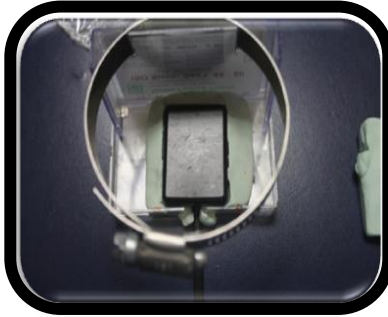


Figura 7.



Figura 8.

3.- Sección de las hemimandíbulas

Para facilitar el proceso de deshidratación se obtuvo un bloque de cada hemimandíbula que incluyera únicamente el espacio de los tres molares, descartando el tercio donde emergen los incisivos y el tercio donde se encuentra el cóndilo y la apófisis coronoides. (Fig.9)

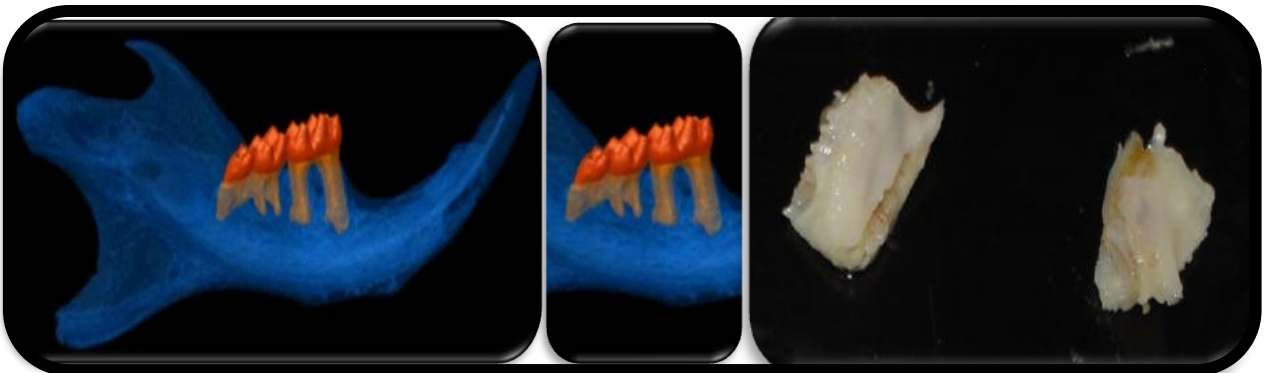


Figura 9.

c).- Procedimientos histológicos

1.-Descalcificación

Por tratarse de tejidos calcificados (hueso, dentina, esmalte), los bloques de tejido

se descalcificaron durante 30 días en 30ml de una solución de EDTA al 10% pH 7 con recambio de solución a los 15 días.

2.- Deshidratación

Se utilizó un procesador de tejidos Microm STP120-1 (Microm International), en donde se colocaron en la canastilla los casetes con dos hemimandíbulas cada uno. (Fig.10). El programa utilizado se muestra en la tabla 1. (Vea recomendaciones; E)

Tabla1. Secuencia de deshidratación

Solución	Tiempo h	Solución	Tiempo h
Formol Buferado	1	Alcohol Abso	2
Alcohol 50%	1	Acetona	1
Alcohol 70%	1	Xilol	4
Alcohol 80%	1	Parafina	4
Alcohol 96%	1	Parafina	4
Alcohol 96%	2	Parafina	4
Alcohol Absoluto	2		

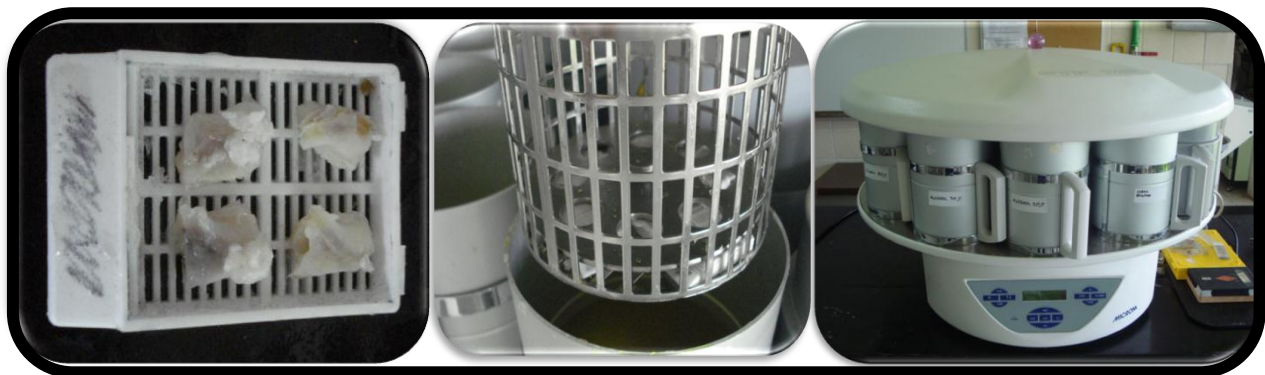


Figura 10.

3.- Fabricación de los bloques de parafina

En el fondo de un molde de acrílico se colocó el bloque de tejido deshidratado de forma que las caras oclusales quedaran hacia la parte de arriba. Los tejidos se fijaron al molde con cianoacrilato previo al vaciado de la parafina. Se dejaron enfriar a temperatura ambiente y fueron almacenados en refrigeración. (Vea recomendaciones; F)

4.- Corte en micrótopo

Se obtuvieron cortes de 7 micrómetros de espesor en un micrótopo de rotación (Microm HM 325, Microm International). De cada hemimandíbula se desecharon aproximadamente los primeros 50 cortes, posterior a esto, todos los cortes se recolectaron de forma seriada hasta acumular 15 laminillas con 5 o 6 cortes cada una. (Vea recomendaciones; G)

5.- Tinción de las muestras

Los cortes se tiñeron por el método de hematoxilina – eosina y se fijaron con resina para su posterior observación.

6.- Evaluación Histopatológica

Los cortes fueron observados en microscopio, obteniendo 3 microfotografías a 40X de cada raíz (mesial y distal) con el programa de captura de imágenes Leica Application Suit. De cada imagen se realizaron 2 mediciones: área de infiltrado inflamatorio en micrómetros cuadrados y la longitud de la superficie del material en

contacto con tejido blando en micrómetros. Todas las mediciones sobre las microfotografías se realizaron dos veces en ciego, los datos obtenidos como promedio de ambos fueron utilizados para los análisis.

Las áreas de infiltrado inflamatorio se clasificaron en tres, infiltrado inflamatorio leve, moderado y severo. Para realizar la clasificación de los datos se ordenaron de mínimo (6.2 mm^2) a máximo (133.2 mm^2) y a partir de estos datos se definieron los criterios de clasificación expuestos en la siguiente tabla. (Tabla 2.)

Tabla 2. Criterios de clasificación de la extensión del infiltrado inflamatorio

Leve	$< 48.6 \text{ mm}^2$
Moderado	$> 48.7 < 100 \text{ mm}^2$
Severo	$> 100 \text{ mm}^2$

Evaluación del modelo (etapa dos)

Durante esta etapa se realizaron 2 ensayos experimentales para evaluar la funcionalidad del modelo propuesto y desarrollado. El primero fue la evaluación del modelo de inducción experimental de lesión periapical radiográficamente detectable (fig.11) en donde se asignaron al azar 12 ratas a los siguientes grupos.

Grupo 1: Inducción de 21 días (n=5), Grupo 2: inducción de 36 días (n=5) Grupo 3: Intacto (n=2). Una vez sacrificados los animales, se obtuvieron las radiografías estandarizadas y se realizaron los procedimientos de Análisis.

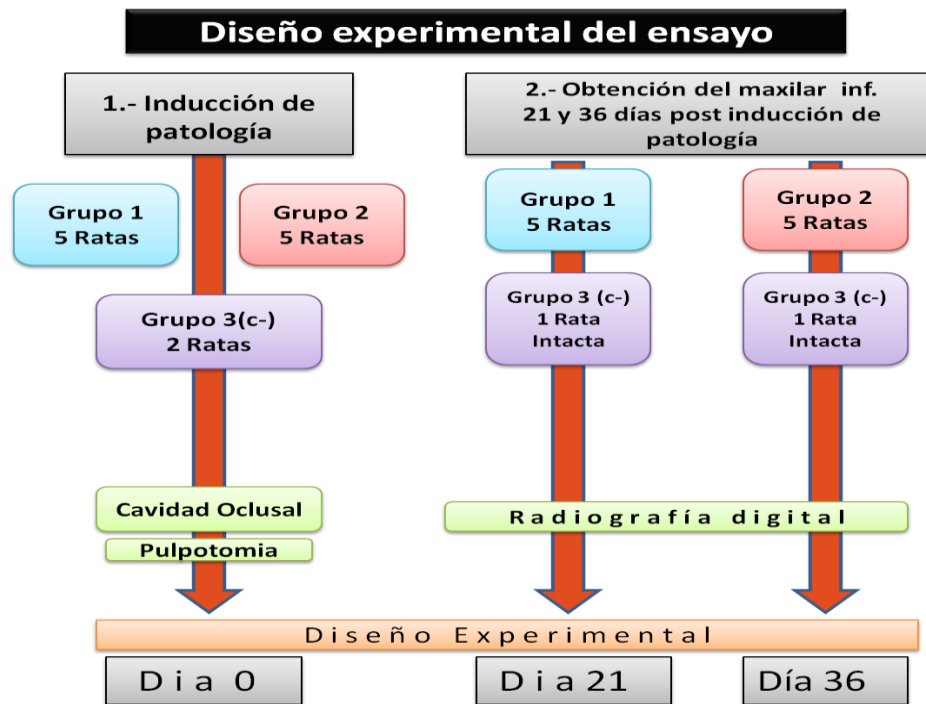


Figura 11.

El segundo ensayo fue la evaluación histológica del modelo empleando dos cementos endodónticos que ya se encuentran en el mercado, en donde se asignaron al azar los siguientes grupos. Grupo 1: patología + AH Plus (Dentsply) (n=10), animales a los que se les indujo la patología periapical durante 21 días y a los que se les realizó tratamiento de conductos e implantación con cemento sellador AH Plus (Dentsply). Grupo 2: patología + Silco (Productos endodónticos

especializados) (n=10) animales a los que se les indujo la patología periapical durante 21 días y a los que se les realizó tratamiento de conductos e implantación con cemento sellador Silco (Productos endodónticos especializados). Grupo 3: Control negativo (n=4) Grupo 4: Control positivo (n=4), animales sometidos a procedimientos anestésicos y al tratamiento de conductos sin la implantación de materiales. Todos los grupos se dividieron en 2 de manera que la mitad de animales de cada grupo se sacrificó 24 horas posteriores a la sobreobtención y la otra mitad a los 15 días. Una vez sacrificados los animales, se procesaron histológicamente las hemimandíbulas y se analizaron los resultados (Fig. 12).

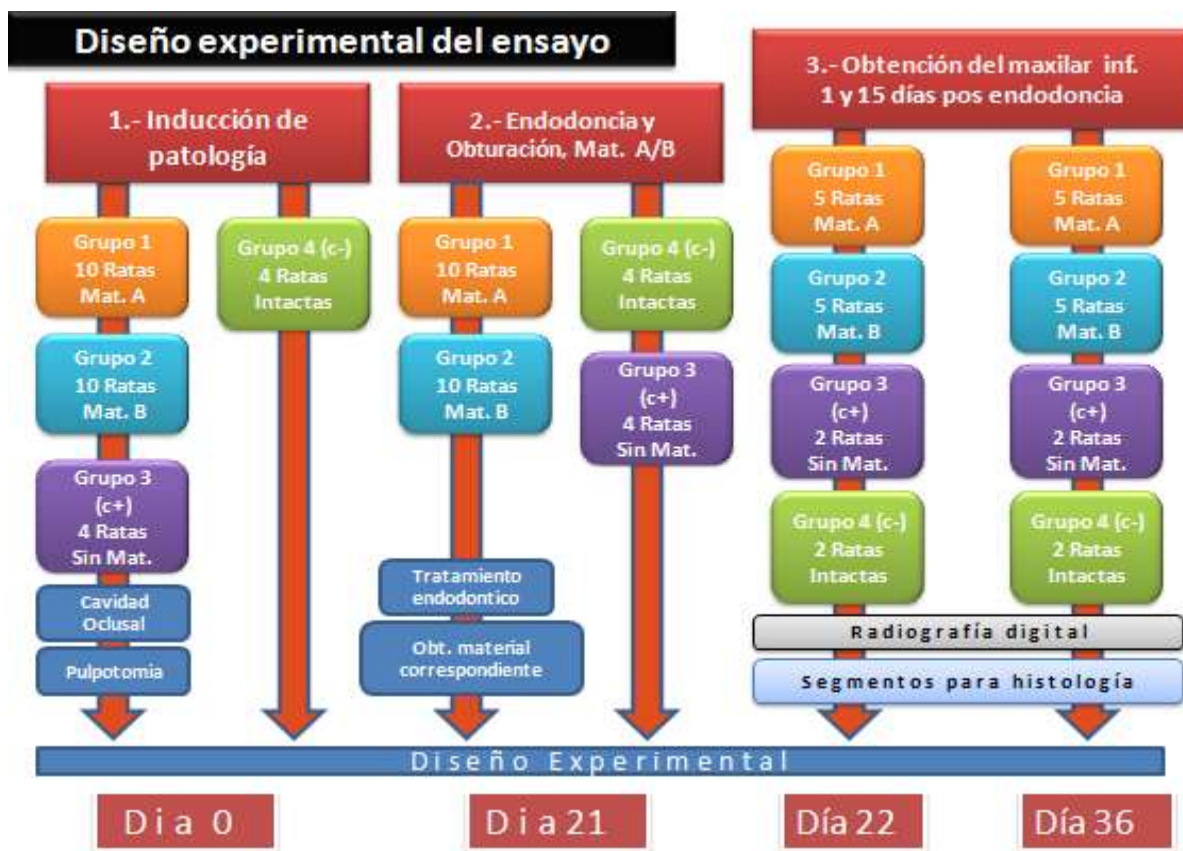


Figura 12.

8.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las áreas de lesión radiográfica registradas en milímetros cuadrados fueron analizadas con ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey, estableciendo el nivel de significancia en $P < 0.05$

Las áreas de lesión radiográfica en milímetros cuadrados agrupadas en 2 (inducidos 21 días Vs inducidos 36 días) se sometieron a la prueba t de student no pareada con corrección de Welch, estableciendo el nivel de significancia en $P < 0.05$

El área de infiltrado inflamatorio y la longitud de material expuesto fueron analizadas con la prueba correlación de Pearson, estableciendo el nivel de significancia en $P < 0.05$.

9.-RESULTADOS.

El modelo desarrollado y propuesto permitió la implantación de distintos materiales en tejidos periápicales vía conducto radicular, y la evaluación de la respuesta inflamatoria inducida por estos en los tejidos, con lo que se cumplió el objetivo principal del trabajo de investigación.

Los resultados de la evaluación del modelo de inducción experimental de lesión periapical radiográficamente detectable mostraron que la exposición pulpar al medio bucal de la rata durante 21 y 36 días fue suficiente para inducir la lesión, con un mayor desarrollo de lesión radiográfica en tejidos inducidos durante más tiempo (36 días). Por otra parte, el grupo control no presentó desarrollo de lesión periapical radiográficamente detectable.

Al comparar: Lesiones radiográficas en raíces derechas distales (Media =1.559 ± EE=0.0765), lesiones radiográficas en raíces derechas mesiales (1.313 ± 0.0685), lesiones radiográficas en raíces izquierdas distales (1.390 ± 0.0668) y lesiones radiográficas en raíces izquierdas mesiales (1.373 ± 0.0909) todos inducidos durante 21 días, no existió diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos. (Fig. 13).

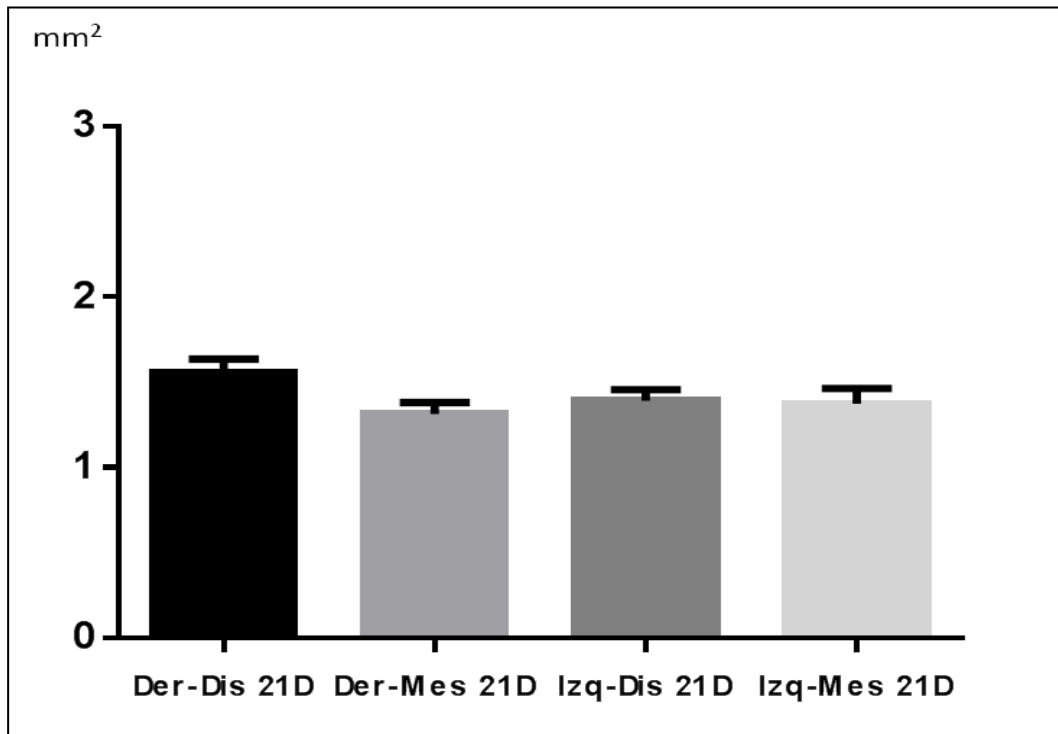


Figura 13. Medias y errores estándar de las áreas de lesión periapical radiográficamente detectables inducidas por la exposición de los conductos distales de hemimandibulas derechas expuestas al medio bucal de la rata 21 días. Ordenada: Área de lesión periapical radiográficamente detectable en milímetros cuadrados (mm²). Abscisa: raíces expuestas (Der-Dis: Derecha Distal, Der-Mes: Derecha Mesial, Izq-Dis: Izquierda Distal, Izq-Mes: Izquierda mesial.)

Al comparar: Lesiones radiográficas en raíces derechas distales (Media=1.768 ± EE= 0.1583), lesiones radiográficas en raíces derechas mesiales (1.883 ± 0.1522), lesiones radiográficas en raíces izquierdas distales (1.905 ± 0.1554) y lesiones radiográficas en raíces izquierdas mesiales (1.761 ± 0.1251) todos expuestos durante 36 días, no existió diferencia estadísticamente significativa entre ninguno de los grupos. (Fig. 14).

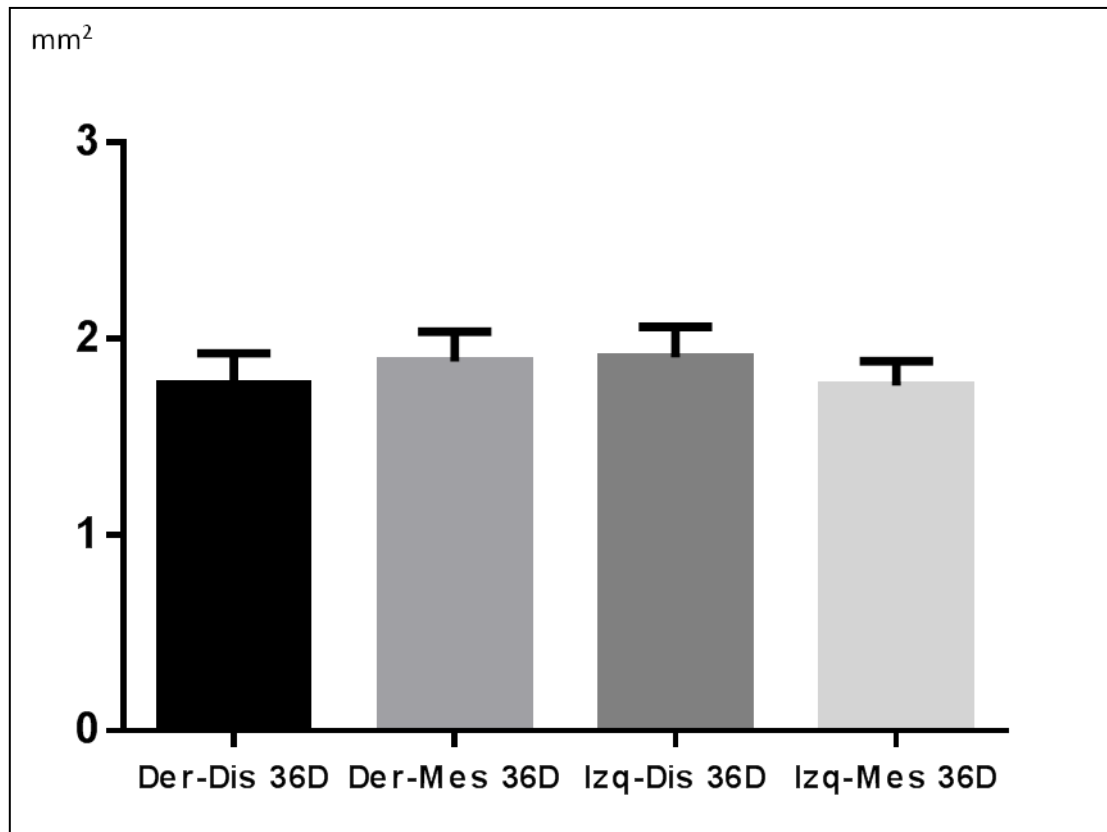


Figura 14. Medias y errores estándar de las áreas de lesión periapical radiográficamente detectables inducidas por la exposición de los conductos mesiales de hemimandibulas derechas expuestas al medio bucal de la rata 36 días. Ordenada: Área de lesión periapical radiográficamente detectable en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisa: raíces expuestas (Der-Dis: Derecha Distal, Der-Mes: Derecha Mesial, Izq-Dis: Izquierda Distal, Izq-Mes: Izquierda mesial.)

Al no existir diferencias estadísticamente significativas en todos los grupos separados por tiempos de exposición se comparó: Lesiones radiográficas en raíces mesiales derechas e izquierdas (Media=1.343 \pm EE=0.0558) expuestas 21 días, lesiones radiográficas en raíces distales derechas e izquierdas (1.475 \pm 0.0531) expuestas 21 días, lesiones radiográficas en raíces mesiales derechas e

Izquierdas (1.822 ± 0.0961) expuestas 36 días y lesiones radiográficas distales derechas e izquierdas (1.837 ± 0.1082) expuestas 36 días. Encontrando que las áreas de lesión radiográfica son significativamente mayores tanto en mesiales como distales de 36 días de inducción, en comparación con las áreas de lesión radiográfica mesiales y distales de 21 días de inducción con una $P < 0.05$. (Fig. 15).

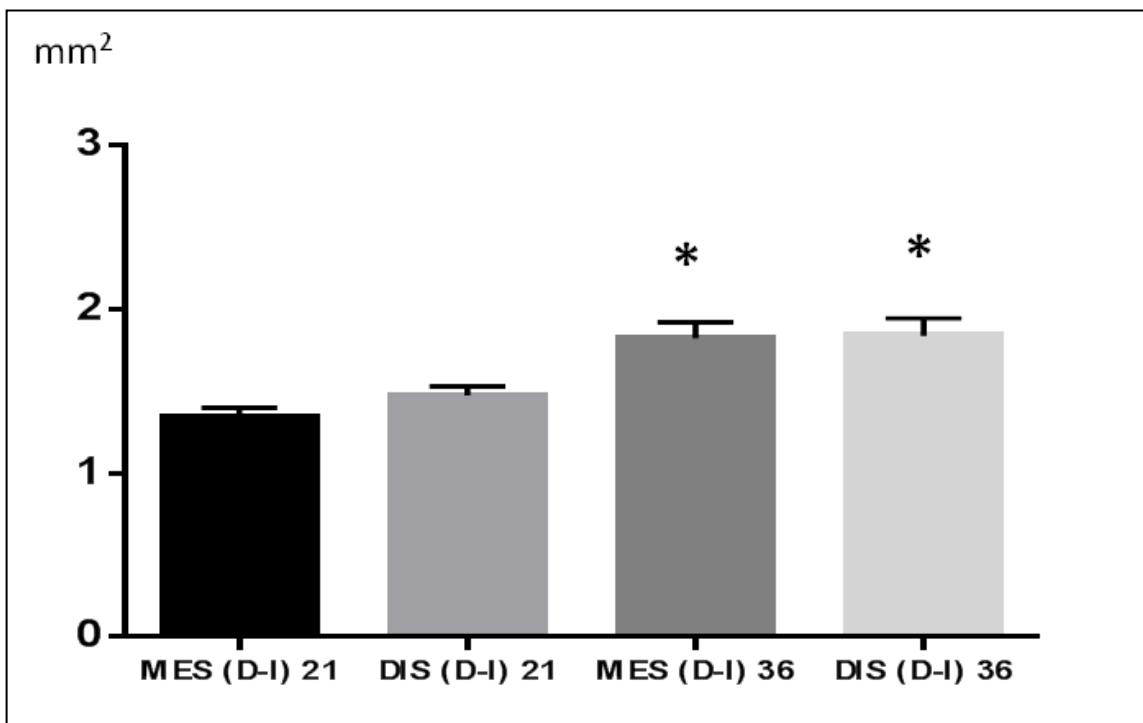


Figura 15. Medias y errores estándar de las áreas de lesión periapical radiográficamente detectables inducidas por la exposición de los conductos mesiales (derechos e izquierdos) y distales (derechos e izquierdos) al medio bucal de la rata 21 días y mesiales (derechos e izquierdos) y distales (derechos e izquierdos) inducidos por 36 días. Ordenada: Área de lesión periapical radiográficamente detectable en milímetros cuadrados (mm²). Abscisa: raíces expuestas agrupadas en distales y mesiales a 21 y 36 días de exposición.

Al agrupar todos los inducidos durante 21 días y compararlos con todos los inducidos de 36 días, obtenemos una media de $1.409 \pm 0.1071 \text{ mm}^2$ en el área de lesión radiográficamente detectable a los 21 días de exposición y de $1.865 \pm 0.0727 \text{ mm}^2$ a los 36 días de exposición siendo significativamente mayor que los de 21 días de inducción con una $P < 0.0001$. (Fig. 16).

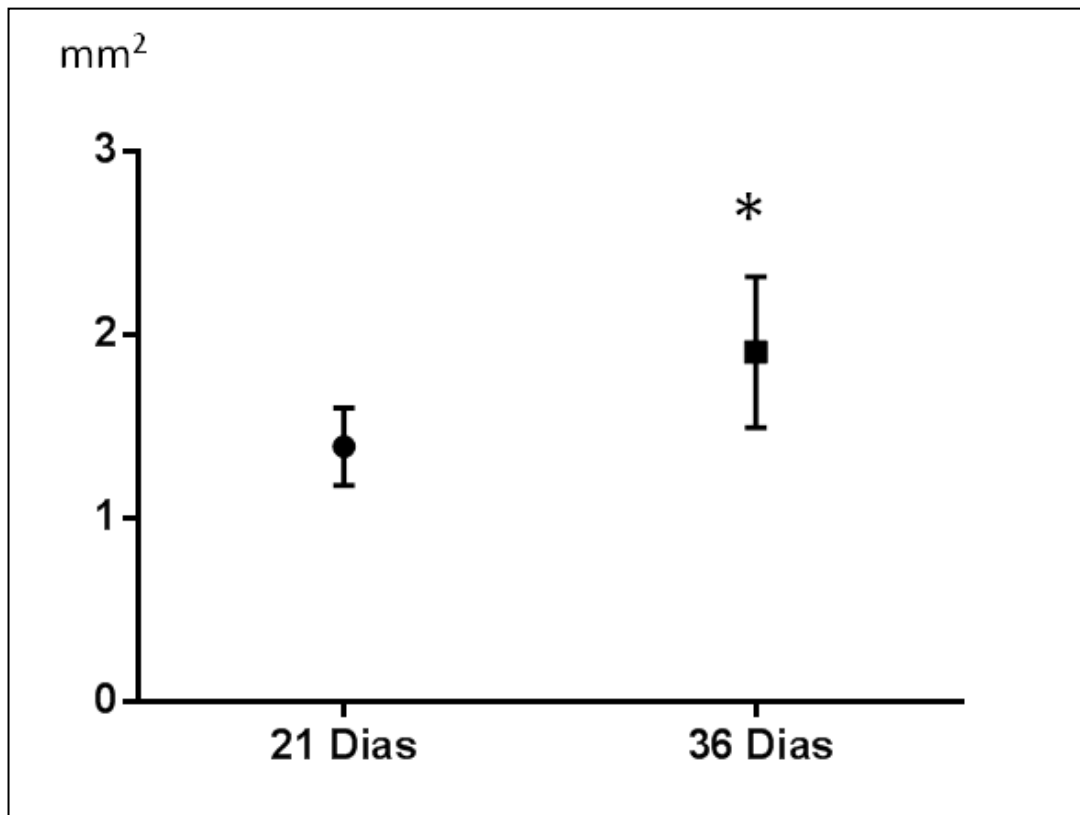


Figura 16. Medias y desviaciones estándar de las áreas de lesión periapical radiográficamente detectable inducidas por la exposición de los conductos radiculares al medio bucal de la rata durante 21 y 36 días. Ordenada: Área de lesión periapical radiográficamente detectable en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisa: tiempos de inducción.

Resultados Histológicos

Los datos obtenidos de la evaluación histológica del modelo experimental propuesto y desarrollado fueron los siguientes:

Grupo Control Negativo:

Los tejidos periápicales permanecieron sanos en todas las muestras, no se observan infiltrados de células inflamatorias y la morfología histológica de la zona se muestra normal. (Fig. 17.a)

Grupo Control Positivo:

En los tejidos periápicales inducidos durante 20 días (lesión periapical inducida experimentalmente) se observaron los datos característicos de un tejido periodontal inflamado, células inflamatorias distribuidas en todo el ligamento, destrucción del trabeculado óseo con lo que el espacio del ligamento periodontal se incremento sin afectar hueso cortical. (Fig. 17.b)

Grupos expuestos:

Los tejidos expuestos a los cementos se mostraron distintos a los observados en los grupos control, pues claramente se observo un infiltrado inflamatorio adyacente a ambos cementos implantados en todos los casos además de los datos observados y descritos en el grupo control positivo (Fig. 17.c)

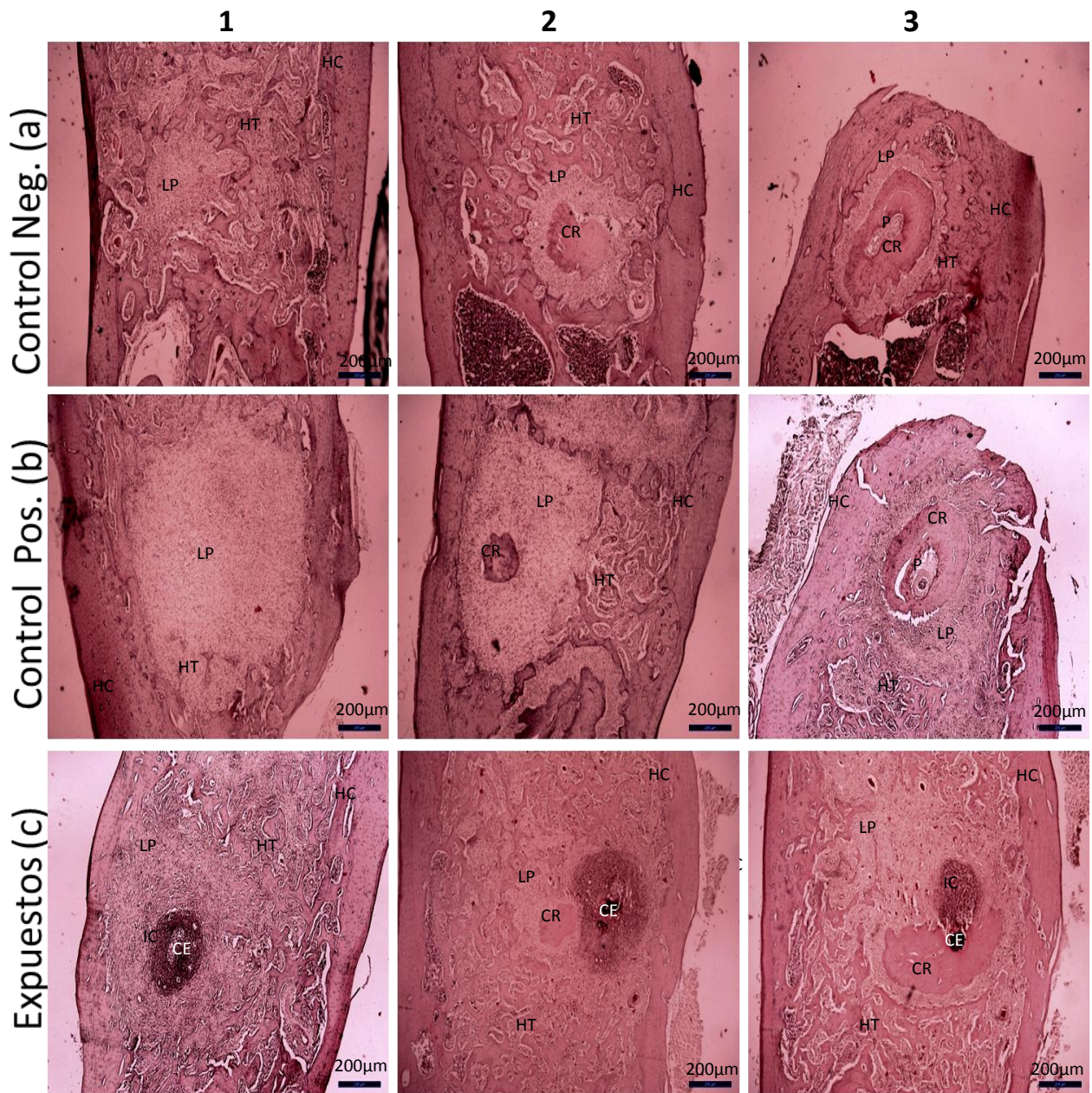


Figura 17. Microfotografías de cortes histológicos (H&E-40X) donde se observan las características morfológicas del tejido periapical de los diferentes grupos. Las imágenes en columnas muestran cortes histológicos representativos realizados transversalmente al mismo nivel. Como se muestra en la figura 18. HC: Hueso Cortical, HT: Hueso Trabecular, LP: Ligamento Periodontal, CR: Cemento Radicular, P: Pulpa, CE: Cemento Endodóntico (material implantado), IC: Infiltrado Celular Inflamatorio. Nótese en fila Control positivo, la destrucción del trabeculado óseo y con esto el ensanchamiento del ligamento periodontal.

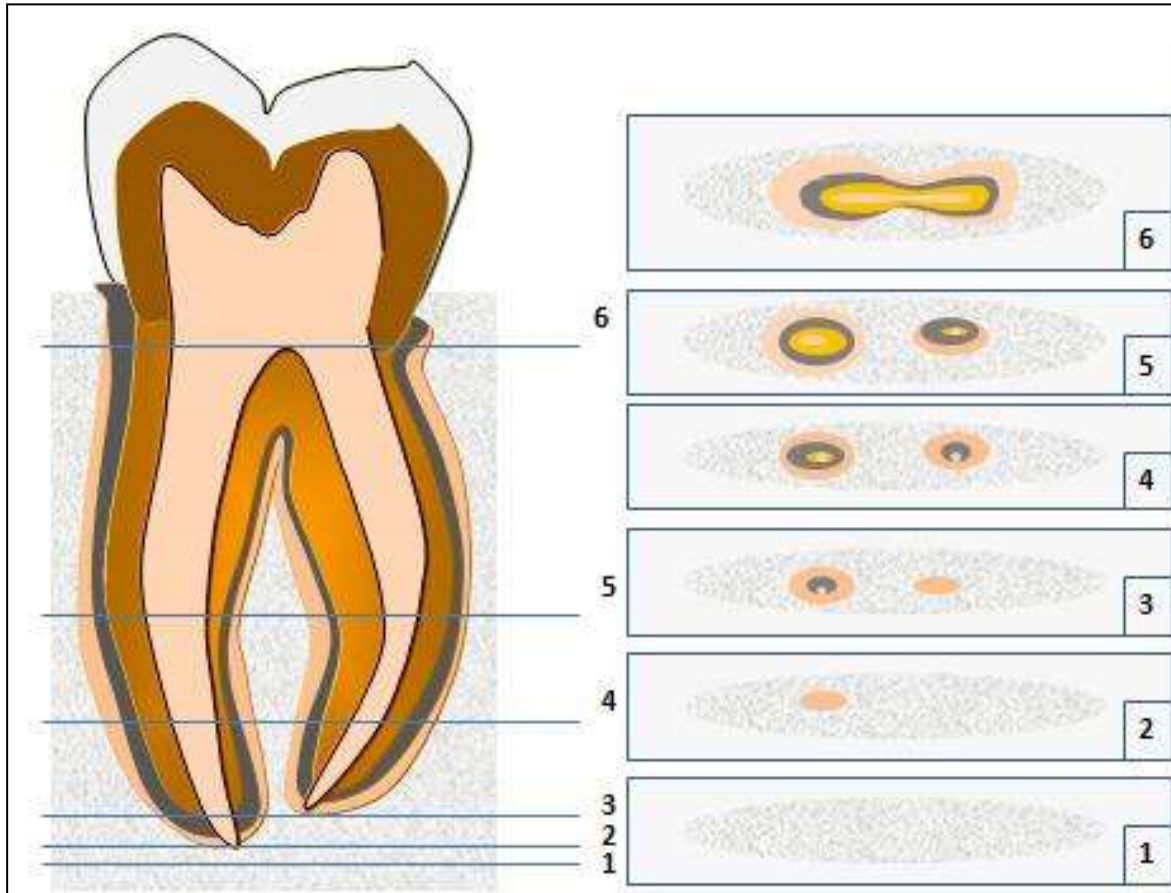


Figura 18. Zonas en donde se realizaron los cortes histológicos en dirección transversal. En la figura 17, la columna 1 muestra cortes a nivel 1, columna 2 muestra cortes a nivel 2, columna 3 muestra cortes a nivel 3.

Los grupos expuestos a los cementos Silco (Productos endodonticos especializados) y AH Plus (Dentsply) durante 1 día categorizados según los criterios de clasificación de la extensión del infiltrado inflamatorio, ambos grupos presentaron un área de infiltrado inflamatorio moderado tendiendo a leve. (Fig. 19)

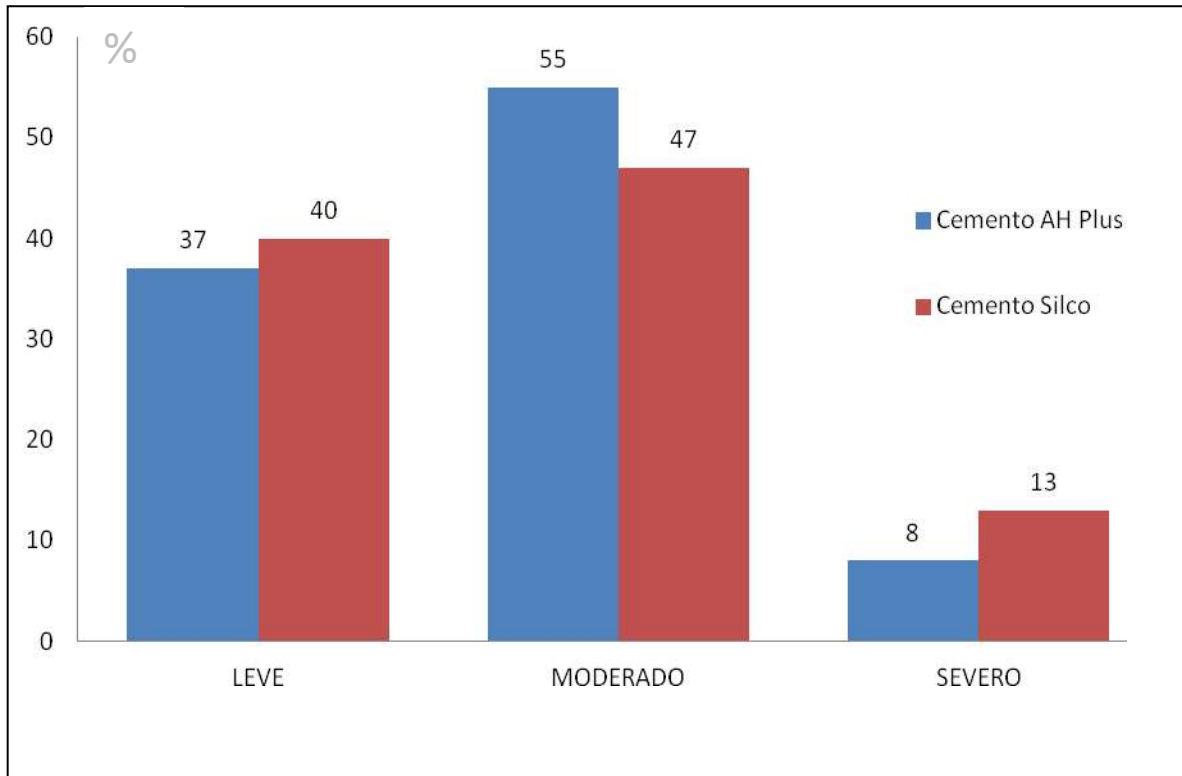


Figura 19. Magnitud de inflamación inducida por exposición a cementos Silco (Productos endodónticos especializados) y AH Plus (Dentsply) durante 1 día de exposición. Ordenada: % de muestras histológicas (60) analizadas donde se identificaron las diferentes categorías de inflamación. Abscisa: Categorías de inflamación.

Los grupos expuestos durante 15 días mostraron una tendencia de infiltrado inflamatorio leve tendiendo a moderado. Cabe destacar que en el caso de la exposición al cemento Silco (Productos endodónticos especializados) ningún corte histológico presentó infiltrado inflamatorio severo, por otro lado en el caso de la exposición al cemento AH Plus (Dentsply) solo el 7% de los cortes histológicos presentaron infiltrado inflamatorio severo. (Fig.20)

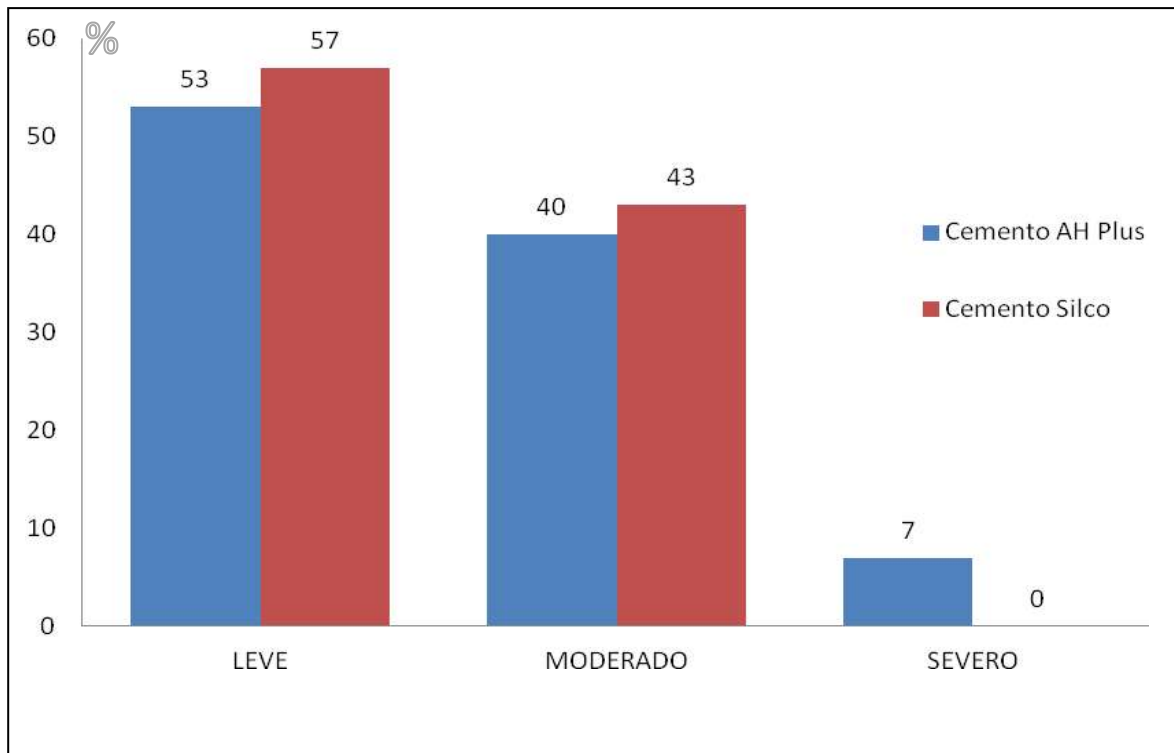


Figura 20. Magnitud de inflamación inducida por exposición a cementos Silco (Productos endodónticos especializados) y AH Plus (Dentsply) durante 15 días de exposición. Ordenada: % de muestras histológicas (30) analizadas donde se identificaron las diferentes categorías de inflamación. Abscisa: Categorías de inflamación.

Con respecto al área de infiltrado inflamatorio y la longitud del material implantado que estuvo en contacto con el tejido se obtuvo una correlación y regresión lineal. Al realizar un análisis de correlación de los datos, se encontró una correlación estadísticamente significativa ($P < 0.05$) entre el área de infiltrado inflamatorio y la cantidad de cemento expuesto en todos los grupos a corto y largo plazo. (Fig.21-24)

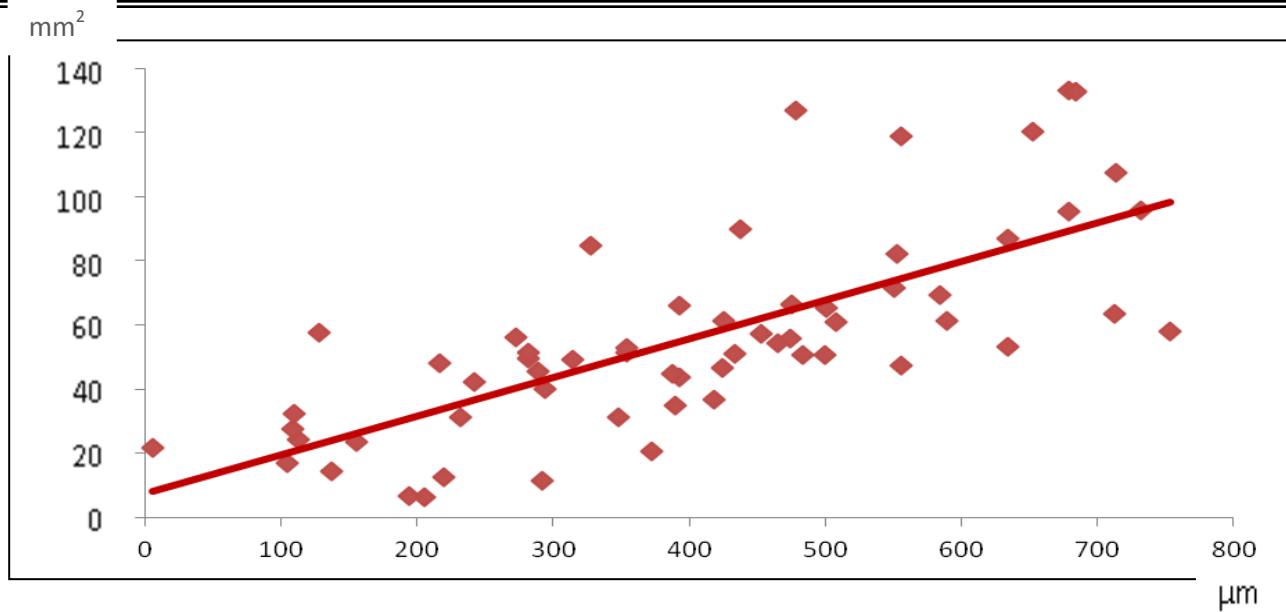


Figura 21. Correlación y recta de regresión lineal entre cantidad de cemento Silco (Productos endodonticos especializados) expuesto 1 día y área de infiltrado inflamatorio observada. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisas: micrómetros (μm) de cemento expuesto. $r = 0.7280$, $P = < 0.0001$

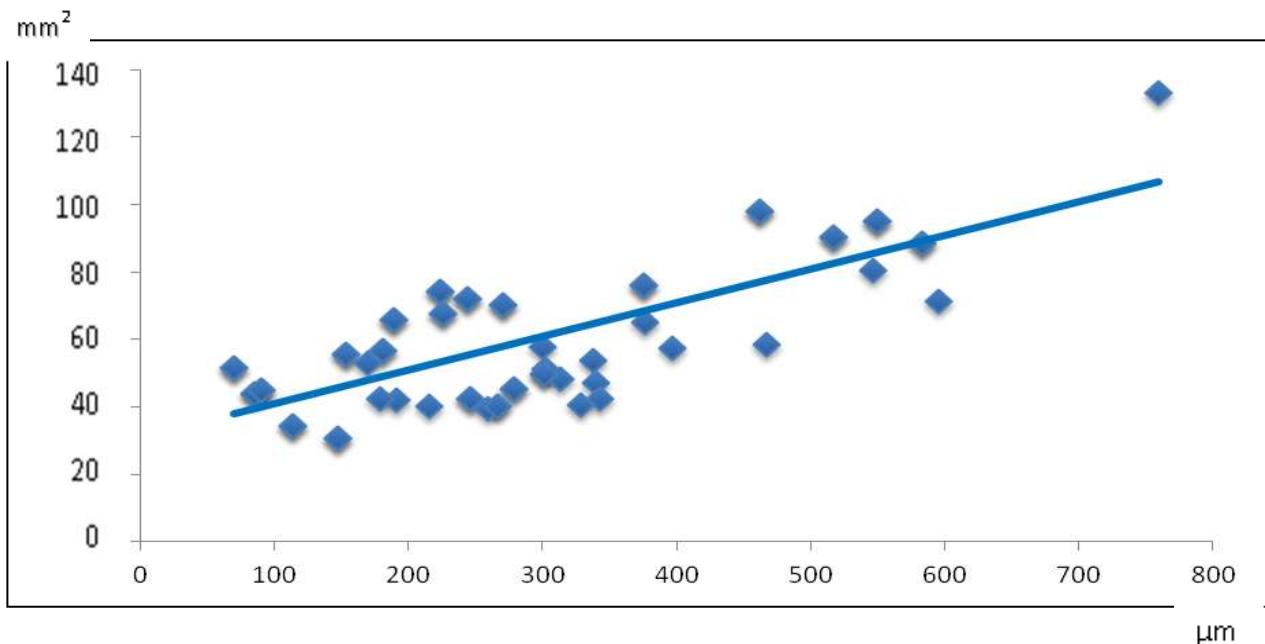


Figura 22. Correlación y recta de regresión lineal entre cantidad de cemento AH Plus (Dentsply) expuesto 1 día y área de infiltrado inflamatorio observada. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisas: micrómetros (μm) de cemento expuesto. $r = 0.7539$, $P = < 0.0001$

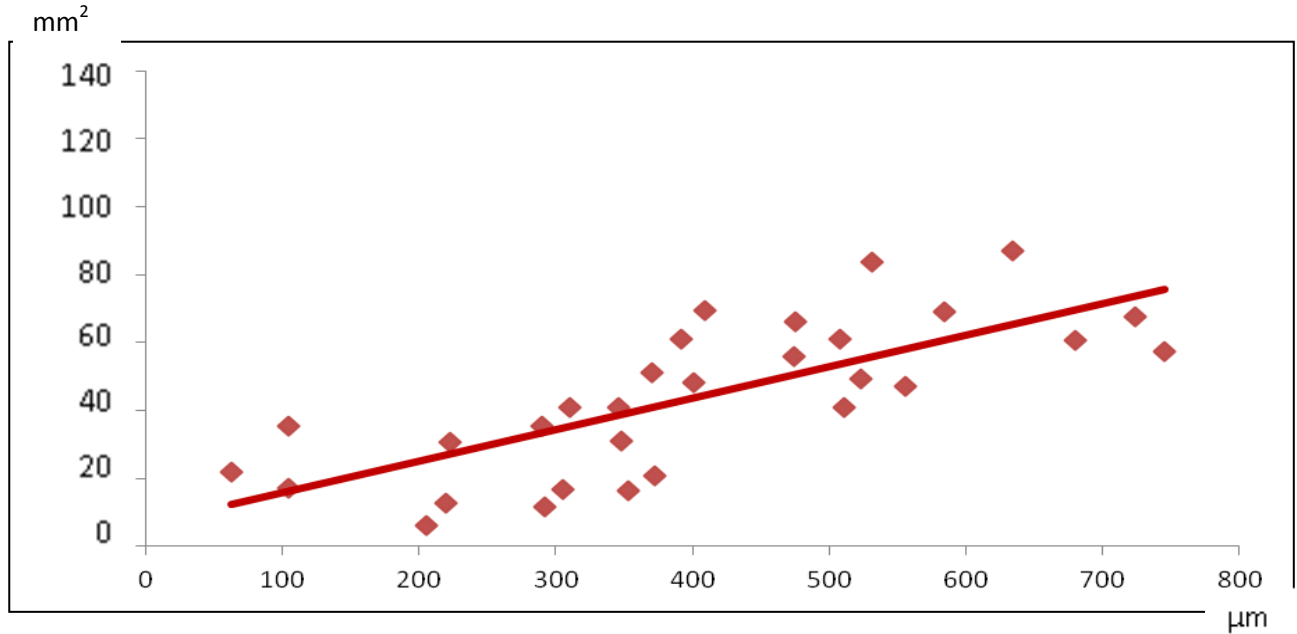


Figura 23. Correlación y recta de regresión lineal entre cantidad de cemento Silco (Productos endodonticos especializados) expuesto 15 días y área de infiltrado inflamatorio observada. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisas: micrómetros (μm) de cemento expuesto. $r= 0.7434$, $P= < 0.0001$

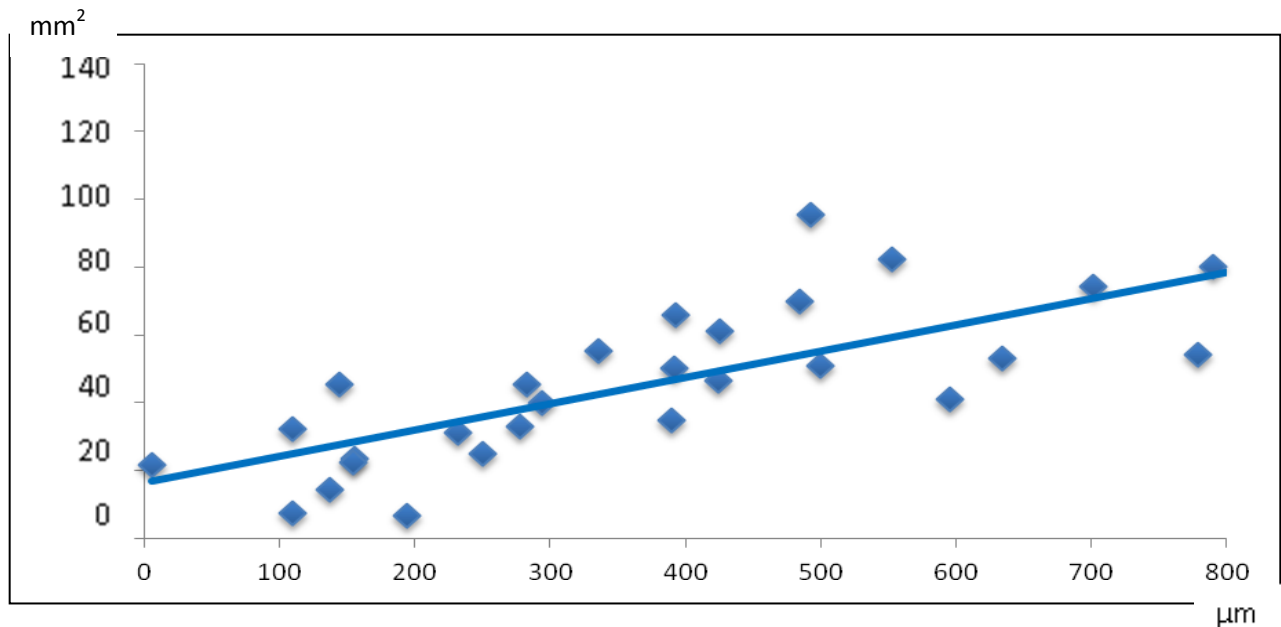


Figura 24. Correlación y recta de regresión lineal entre cantidad de cemento AH Plus (Dentsply) expuesto 15 días y área de infiltrado inflamatorio observada. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisas: micrómetros (μm) de cemento expuesto. $r= 0.7673$, $P= < 0.0001$

Al realizar una sobre posición de los puntos de correlación y las líneas de regresión para las muestras expuestas a los cementos AH Plus (Dentsply) y a Silco (Productos endodonticos especializados) durante 1 día (Fig. 25), podemos observar que el cemento AH Plus (Dentsply) muestra niveles mas elevados de inducción de infiltrado inflamatorio y de forma más uniforme comparado con la inducción mas irregular mostrada por cemento Silco (Productos endodonticos especializados), además de su menor inducción de infiltrado inflamatorio.

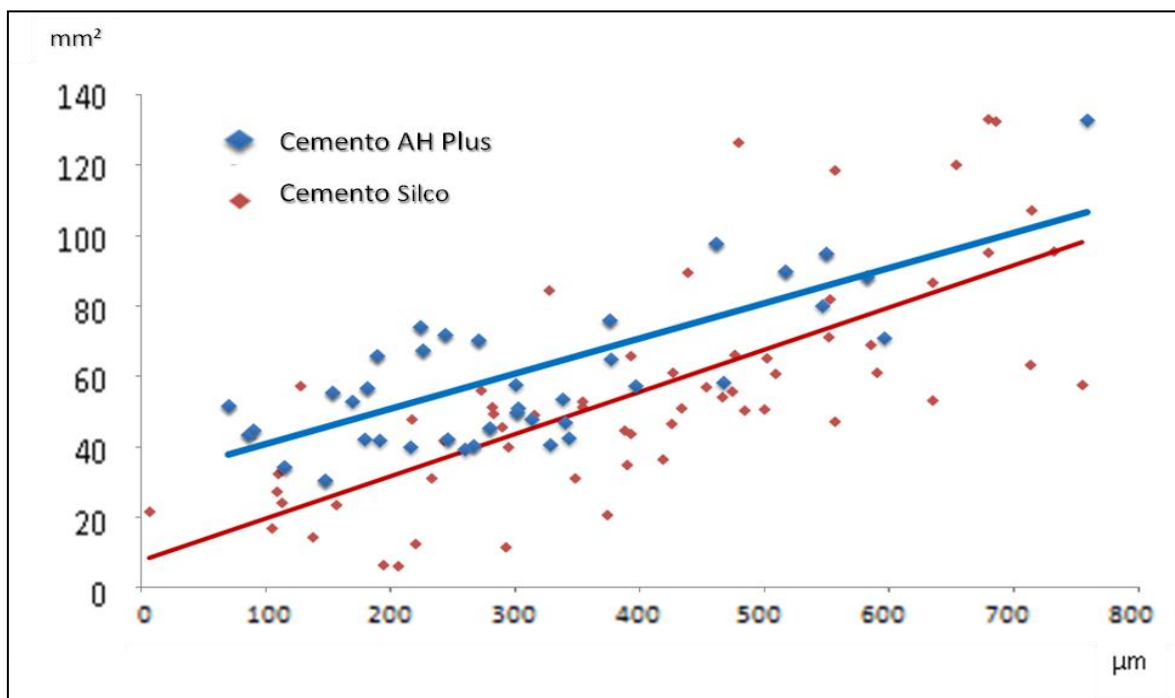


Figura 25. Sobre posición de correlación y rectas de regresión lineal entre cantidades de cementos AH Plus (Dentsply) y Silco (Productos endodonticos especializados) expuestos 1 día y sus respectivas áreas de infiltrado inflamatorio observadas. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm²). Abscisas: micrómetros (µm) de cemento expuesto.

Al realizar una sobre posición de los puntos de correlación y las líneas de regresión para las muestras expuestas a los cementos AH Plus (Dentsply) y a Silco (Productos endodonticos especializados) durante 15 días (Fig.26), podemos observar que ambos cementos inducen un infiltrado inflamatorio similar (la respuesta inicial inducida por cemento AH Plus ha disminuido notablemente) y de forma más uniforme para los dos casos.

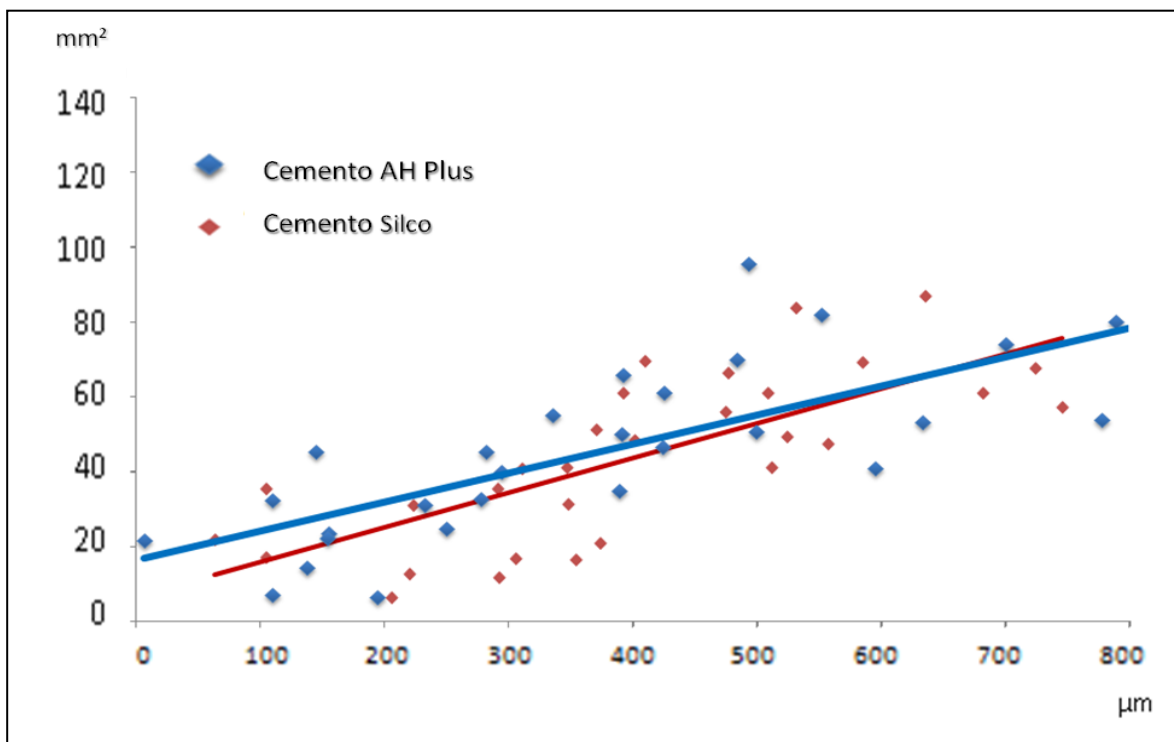


Figura 26. Sobre posición de correlación y rectas de regresión lineal entre cantidades de cementos AH Plus (Dentsply) y Silco (Productos endodonticos especializados) expuestos 15 días y sus respectivas áreas de infiltrado inflamatorio observadas. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisas: micrómetros (μm) de cemento expuesto

Al realizar una sobre posición de los puntos de correlación y las líneas de regresión para las muestras expuestas al mismo cemento (AH Plus) durante 1 y 15 días (Fig. 27), podemos observar que a 1 día de exposición la respuesta inflamatoria inducida es mayor que la mostrada a los 15 días de exposición, con respuestas más uniformes para ambos casos.

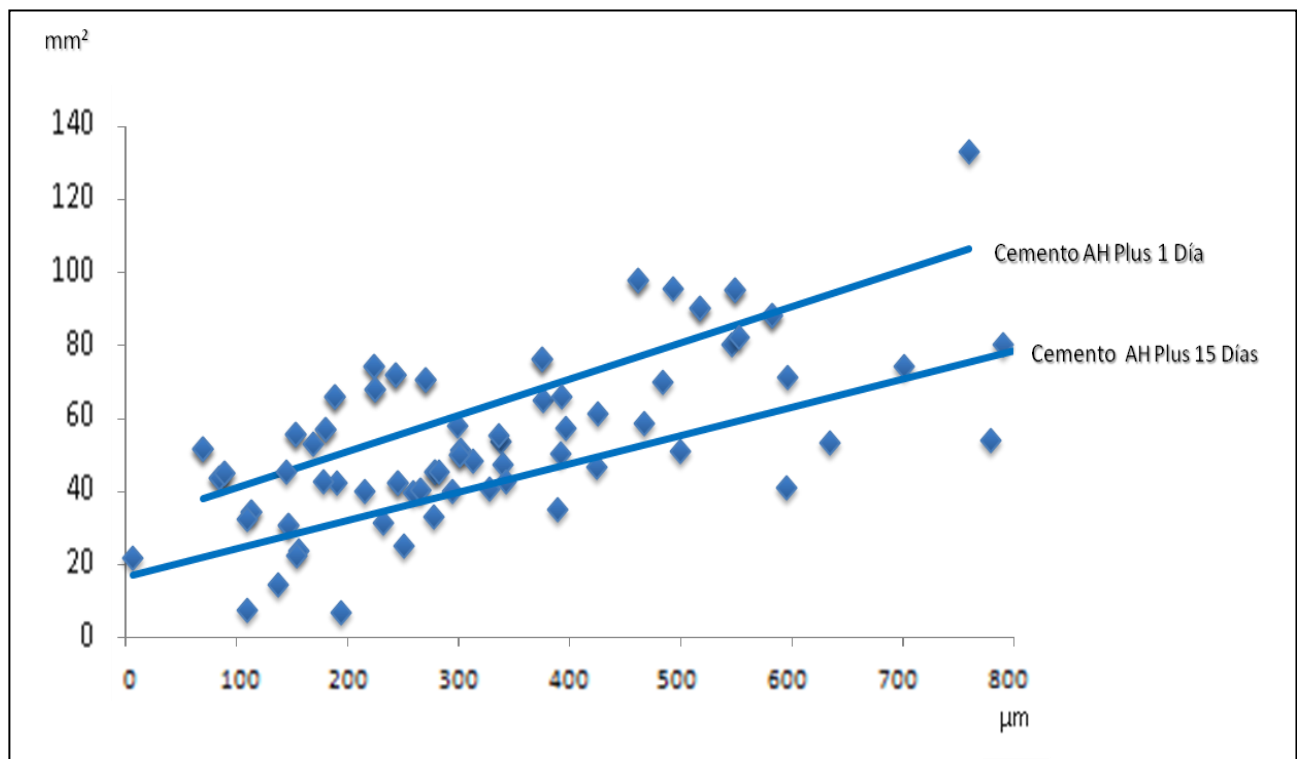


Figura 27. Sobre posición de correlación y rectas de regresión lineal entre cantidades de cementos AH Plus (Dentsply) expuestos 1 y 15 días y sus respectivas áreas de infiltrado inflamatorio observadas. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisas: micrómetros (μm) de cemento expuesto.

Al realizar una sobre posición de los puntos de correlación y las líneas de regresión para las muestras expuestas al mismo cemento (Silco) durante 1 y 15 días (Fig. 28), podemos observar que a 1 día de exposición la respuesta inducida es mayor que la mostrada por la exposición durante 15 días.

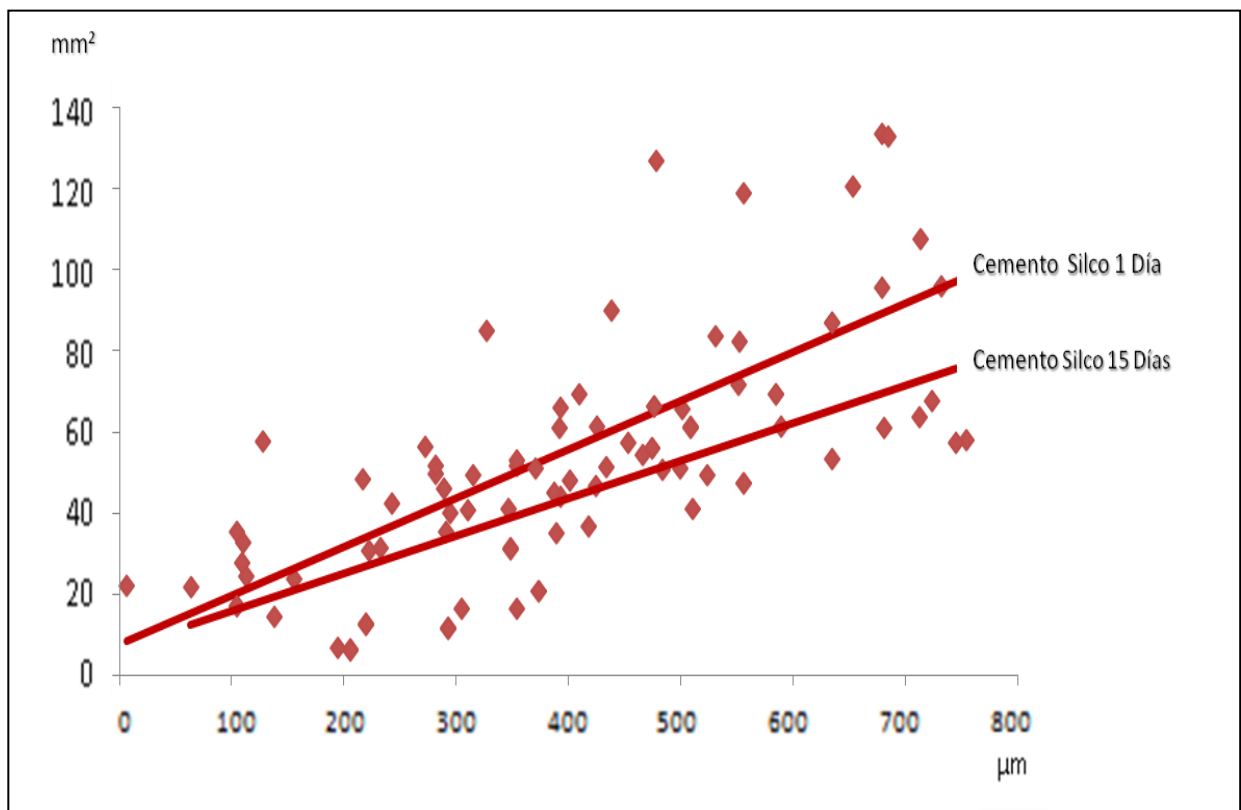


Figura 28. Sobre posición de correlación y rectas de regresión lineal entre cantidades de cements Silco (Productos endodonticos especializados) expuestos 1 y 15 días y sus respectivas áreas de infiltrado inflamatorio observadas. Ordenadas: área de infiltrado inflamatorio en milímetros cuadrados (mm^2). Abscisas: micrómetros (μm) de cemento expuesto

10.- DISCUSIÓN.

El éxito de un tratamiento endodóntico depende de varios factores, uno de los más importantes es la obturación como etapa final del tratamiento, el material utilizado para esta obturación debe tener la capacidad de crear un ambiente adecuado que promueva la reparación de los tejidos periapicales, capacidad relacionada con su biocompatibilidad.¹⁰²

Numerosos estudios con diferentes metodologías y materiales han sido realizados para evaluar biocompatibilidad. Los métodos más populares son pruebas *in vitro* de citotoxicidad, o pruebas de biocompatibilidad *in vivo* por medio de implantaciones subcutáneas u óseas en diferentes modelos animales.¹⁰³

Los estudios *in vitro* están limitados a reportar la citotoxicidad de una línea celular utilizada,¹⁵ estarán ausentes diversos factores sistémicos como el aporte nutricional, de oxígeno y la eliminación de desechos,¹⁶ además de que no se puede estudiar su efecto en tejidos a distancia.²¹

Las pruebas que se realizan para analizar biocompatibilidad por implantación permiten obtener más información, sin embargo no son los más adecuados debido a que, 1.- Evalúan los materiales en tejidos distintos para los que son diseñados, 2.- Son realizados en animales con características morfológicas distintas al humano, 3.- son realizados en animales en donde la experimentación ya no es bien vista (implicaciones éticas), 4.- utilizan procedimientos quirúrgicos para implantar los materiales, lo que aleja al modelo de la realidad clínica.

El propósito del presente trabajo, fue desarrollar un modelo experimental en rata que permita la evaluación de cementos endodónticos, bajo las mismas condiciones clínicas en que se utilizan.

Se planteó desarrollar un modelo en rata debido a su preferencia de uso como modelo experimental y a toda la información existente acerca de sus características generales.

Antes de comenzar con el desarrollo del modelo se buscó información previa sobre la utilización de los molares de rata en investigación científica, encontrando cuatro grupos, dos de estos en Argentina, uno a cargo de los Doctores J. Erausquin y Margarita Muruzábal del Laboratorio de Histología de la Facultad de Odontología en la Universidad de Buenos Aires, Argentina. El otro a cargo del Doctor Osvaldo Zmener del Departamento de Endodoncia de la misma Facultad en Argentina, otro en Estados Unidos a cargo del Doctor Philip Stashenko del Departamento de Biología Oral del instituto Harvard Forsyth, y el último en Alemania a cargo del Doctor Till Dammascke del Departamento de Operatoria Dental de la Universidad de Westphalian Wilhelms, del que personalmente recibimos información y asesoría sobre su experiencia con estos modelos. A partir de esto, comenzamos a trabajar en el protocolo del proyecto.

Durante el desarrollo de nuestro modelo encontramos diversas dificultades que fueron solucionadas una a una, sin embargo la estandarización de la cantidad y la zona de implantación fue imposible a pesar de utilizar diferentes métodos y formas, lo que nos hace cuestionarnos acerca de la veracidad de los resultados

que se muestran en el trabajo de Zmener.¹⁰⁰ (Osvaldo Zmener es un autor que forma parte de uno de los cuatro grupos que tienen experiencia con molares de rata y que en 2012 publicó en la revista de la Asociación Odontológica Argentina un trabajo en donde sobreobturaron dos distintos materiales de obturación endodóntica en tejidos periápicales de rata de la misma manera propuesta en nuestro protocolo, con la diferencia de que fue realizado en tejidos periápicales sanos, pues no indujeron periodontitis apical previa, como nosotros lo hicimos.)

Al mismo tiempo, estas dificultades nos permitieron proponer nuevas formas de evaluar los hallazgos histológicos y demostrar que así como las características físicas y químicas de los cementos tienen influencia en la respuesta que provocaran en los tejidos, también la cantidad implantada de material tendrá influencia directa sobre la respuesta que va a presentar el mismo, cuando una mayor cantidad está en contacto con el tejido mayor es la estimulación.

Durante el desarrollo de nuestro modelo, utilizamos tanto los conductos mesiales como los distales de primeros molares inferiores, Muruzabal y Erausquin⁹⁰⁻⁹² trabajaron únicamente con los conductos mesiales del primer molar inferior, mientras que Zmener y cols¹⁰⁰ utilizaron únicamente los conductos distales de molares inferiores, por su parte Dammaschke y cols.⁹⁹ utilizaron el primer molar maxilar y principalmente el conducto palatino por ser el más grande. Todas estas variaciones están en función de la posición en la que cada investigador coloca a la rata para realizar los procedimientos, en nuestro modelo quisimos trabajar con molares inferiores pues los superiores se encuentran muy cercanos a la órbita en donde un procedimiento mal realizado podría tener repercusiones en las

estructuras oculares. Además por la posición que utilizamos, pudimos tener una mejor visibilidad y una mejor posición para el animal. Trabajamos ambos conductos, sin embargo coincidimos con Zmener¹⁰⁰ cuando menciona que el conducto distal es más fácil de acceder y trabajar con los instrumentos endodónticos y los procedimientos de irrigación y obturación, sin embargo aun con las complicaciones técnicas que presenta el trabajo del conducto mesial, se pueden lograr también buenos resultados. Zmener¹⁰⁰ menciona lograr el aislamiento absoluto de la zona operatoria (etapa esencial y necesaria en cualquier procedimiento intradentario), sin embargo no da detalles de cómo lo hizo. Otros investigadores que han trabajado en conductos radiculares de rata no lo han logrado, justificándose en el pequeño tamaño de las estructuras bucales de la rata y las complejidades técnicas para realizarlo. Con el diseño y fabricación del aditamento en acrílico en este estudio se logró un resultado exitoso en el aislamiento absoluto de la zona operatoria, además de permitirnos una adecuada abertura bucal.

La toma de radiografías durante el tratamiento endodóntico es indispensable, pues permiten determinar la longitud de trabajo, además de la calidad y longitud de la obturación,¹⁰⁴ sin embargo la toma de radiografías intraorales durante los procedimientos operatorios en la rata resulta muy difícil de realizar, debido al tamaño tan reducido de sus estructuras, es posible obtener radiografías al recortar películas radiográficas e introducir un pequeño fragmento de estas en la cavidad bucal, sin embargo la imagen obtenida es muy pequeña para ser analizada y

determinante de la longitud a la que se está trabajando o de la calidad de la obturación, por lo que no se obtuvieron estas imágenes transoperatorias, la longitud de trabajo y la calidad de obturación se observó una vez que se sacrificaron los animales y se obtuvieron imágenes radiográficas digitales de las hemimandíbulas ya disecadas. La longitud de trabajo se calculó a partir de varias mediciones realizadas antes de comenzar el trabajo experimental en cadáveres de rata (datos no mostrados).

Para desarrollar un modelo comparable a la clínica, primeramente debíamos inducir una patología para aplicar un tratamiento. Al igual que Stashenko¹⁰¹ utilizamos la propuesta de Kakehashi para inducir lesiones periápicales el tallar una cavidad en molares y dejar los conductos expuestos, pero a diferencia de Dammascke⁹⁹ que dejó los conductos expuestos 14 días y de Stashenko que los dejó 15 días, nosotros elegimos dejarlos expuestos durante 21 días, después de que nuestro ensayo evaluando el desarrollo de las lesiones a 21 y 36 días mostró la formación de la lesión en ambos casos, pero según Stashenko hasta los 15 días se podría considerar una lesión aguda y a partir de los 20 días se detiene el crecimiento de la lesión y se establece por lo que la considera crónica, nosotros quisimos darle a nuestra lesión esta característica de cronicidad por eso intentamos incluso más tiempo de exposición, 36 días, sin embargo no utilizamos este tiempo debido a que muchas piezas debilitadas por la cavidad sufrían fractura de alguna de las paredes, con lo que dificultaba los siguientes procedimientos

además de aumentar la variabilidad. A 21 días de exposición las fracturas fueron mínimas.

En cuanto a la evaluación de la respuesta de los tejidos periapicales histologicamente, se realizaron cortes longitudinales de los tejidos, sin embargo el infiltrado celular quedaba oculto pues dependiendo de la zona en donde coincide el corte puede observarse un área de infiltrado grande o pequeña, sin significar esto que la respuesta fue mayor o menor. Esta problemática se eliminó al realizar los cortes de manera transversal, además esta orientación permite obtener un mayor número de cortes (300 cortes de 7 micrómetros cada uno), respecto a una disposición de cortes longitudinales (42 cortes de 7 micrómetros cada uno). Esta gran diferencia nos permite tener más material para analizar.

Al poner a prueba nuestra propuesta de modelo al utilizarlo para comparar dos materiales selladores que ya se encuentran en el mercado, demostramos que el modelo funciona adecuadamente y que se puede utilizar para evaluar distintos materiales.

Para evaluar los hallazgos histológicos, al contrario de todos los métodos propuestos y utilizados, nosotros no utilizamos únicamente escalas subjetivas de evaluación, nuestros resultados se fundamentan en las mediciones de áreas y longitudes. Al encontrar una correlación entre la longitud de la superficie de cemento endodóntico expuesto al tejido y el tamaño del área de infiltrado inflamatorio inducido, mostramos que si existe una relación directamente proporcional entre la cantidad de material implantado y la respuesta inflamatoria, y

que no solo influyen las características químicas o físicas de los materiales, como se estudian en todas partes. Al comparar las líneas de regresión de cada grupo expuesto podemos evaluar el comportamiento que presenta el tejido dependiendo no solo de las características del material sino también de la cantidad expuesta, nosotros observamos en nuestro ensayo, que a 1 día de exposición la respuesta de los tejidos es mayor, en ambos cementos debido probablemente a la liberación de sustancias durante el endurecimiento, para el caso del cemento Silco (Productos endodónticos especializados) a base de óxido de zinc y eugenol puede deberse a la liberación de eugenol, se sabe que los cementos a base de óxido de zinc y eugenol son materiales irritantes y que provocan una reacción inflamatoria en contacto con tejidos conectivos.¹⁰⁵ Briseno y Willershausen¹⁰⁶ evaluaron un sellador a base de óxido de zinc y eugenol que mostró potencial citotóxico moderado inicial y una recuperación notable del tejido posterior a 13 días de aplicación. Maeda y cols.⁹⁸ notaron una reacción inflamatoria severa después de una semana de exposición al cemento a base de óxido de zinc y eugenol, que desapareció después de 2 semanas, estos resultados fueron similares a los mostrados por Olsen y cols.¹⁰⁷ Por otro lado Bouillaguet y cols.¹⁰⁸ evaluaron la citotoxicidad de varios cementos endodónticos, entre ellos el AH Plus (Dentsply), encontrando que todos tenían citotoxicidad severa, igualmente, Lodine y cols.¹⁰⁹ evaluaron la citotoxicidad de AH Plus (Dentsply), encontrando que recién mezclado y colocado es severamente tóxico, ya en estudios *in vivo*, se ha visto que la respuesta a AH Plus (Dentsply) es moderada a severa pero que disminuye a través del tiempo. Se cree que esta citotoxicidad inicial se debe a la liberación de

trazas de formaldehído durante su polimerización.⁹⁸ estos hallazgos coinciden con los nuestros, pues la exposición a ambos cementos mostro en los tejidos una respuesta por infiltrado inflamatorio inicial de moderada a leve después de un día de exposición, disminuyendo notablemente en ambos casos a leve tendiendo a moderada después de 15 días de exposición.

11.- CONCLUSIONES.

En conclusión, el modelo desarrollado presenta numerosas dificultades técnicas, muchas de estas previamente descritas y muchas otras no (lo que pone en duda muchos de los resultados mostrados en algunos artículos) sin embargo una vez que se tienen las herramientas y el diseño del mismo, puede utilizarse como un modelo adecuado para evaluar materiales de usos endodóntico bajo condiciones muy similares a las encontradas en la clínica. Como todo modelo tiene sus limitantes por involucrar la variabilidad biológica a la que está expuesto cualquier modelo.

Al encontrar en la literatura mayor porcentaje de artículos en donde utilizan modelos de implantación en animales más grandes (perros o simios, por ejemplo) nos damos cuenta de que son más sencillos, sin embargo por las tendencias que se observan en la investigación con animales, poco a poco desaparecerán esos modelos y la única alternativa a corto plazo serán los modelos con roedores, por lo que resulta importante comenzar a trabajar y perfeccionar estas técnicas.

11.1 Perspectivas.

Aunque el desarrollo del modelo, objetivo principal de este trabajo ha sido concluido, aun quedan aspectos que no fueron estudiados y que ofrecen la posibilidad de realizar nuevos trabajos como lo son:

-Estudios anatómicos de las estructuras dentales y periodontales de la rata, que permitan tener un profundo conocimiento de la anatomía normal de sus estructuras, bajo distintas condiciones de edad y sexo

-Evaluaciones histológicas de los tejidos implantados y su correlación con algunos biomarcadores de respuesta inflamatoria en sangre periférica (interleucinas, factores de necrosis tumoral, proteína C reactiva)

-Evaluaciones histológicas sobre cortes sometidos a técnicas histoquímicas, ejemplo “TRAP tartrate-resistant acid phosphatase reaction” (usada como marcador de osteoclastos)

-Pruebas biomecánicas de flexión, para evaluar la calidad del hueso adyacente a los materiales implantados.

-Cuantificación de algunos biomarcadores relacionados con la osteoporosis (Fosfatasas alcalinas óseas, Osteocalcina, Calcio, Fosfatasas ácidas) y su interacción con el material implantado.

-Buscar y evaluar en algunos órganos a distancia (hígado o riñón) diferencias por presencia de minerales o productos de metabolismo que pudieran tener implicaciones patológicas.

12. - BIBLIOGRAFÍA

1. American-Association-of-Endodontists. Glossary of Endodontic Terms. 2012;Eighth Edition:19.
2. Ingle JI, Bakland, L.k., Beveridge, E.E., Glick, D.H. and Hoskinson A.E. Modern endodontic therapy. In: Inc. BD, editor. Endodontics. 5 ed. Hamilton; 2002. p. 2-5.
3. Leonardo MR, Leonardo RT. ENDODONCIA: Conceptos Biológicos y Recursos Tecnológicos. Sao Paulo; 2009.
4. Barthel CR, Zimmer S, Trope M. Relationship of radiologic and histologic signs of inflammation in human root-filled teeth. J Endod 2004;30(2):75-9.
5. Katebzadeh N, Sigurdsson A, Trope M. Radiographic evaluation of periapical healing after obturation of infected root canals: an in vivo study. Int Endod J 2000;33(1):60-6.
6. Katebzadeh N, Hupp J, Trope M. Histological periapical repair after obturation of infected root canals in dogs. J Endod 1999;25(5):364-8.
7. Nair PN, Henry S, Cano V, Vera J. Microbial status of apical root canal system of human mandibular first molars with primary apical periodontitis after "one-visit" endodontic treatment. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod 2005;99(2):231-52.
8. Rowe AHR BWH. Correlation between radiological and histological changes following root canal treatment. J Br Endod Soc 1974;7:57-63.
9. Buddy D. Ratner ASH, Frederick J. Schoen, Jack Lemons. Biomaterials Science: A Multidisciplinary Endeavor. In: Inc. E, editor. BIOMATERIALS SCIENCE. 2ND EDITION ed; 2004. p. 1,2.
10. Standardization IOF. ISO. 7405: dentistry –preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry – test methods for dental materials. Geneva. ISO 1997.
11. Richards RG, Stiffanic M, Owen GR, Riehle M, Ap Gwynn I, Curtis AS. Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. Cell Biol Int 2001;25(12):1237-49.
12. Hanks CT, Wataha JC, Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review. Dent Mater 1996;12(3):186-93.
13. Nahid M, Bottenberg P. [Importance of cell cultures in biocompatible dental materials research]. Rev Belge Med Dent (1984) 2003;58(3):189-96.
14. Pizzoferrato A, Ciapetti G, Stea S, Cenni E, Arciola CR, Granchi D, et al. Cell culture methods for testing biocompatibility. Clin Mater 1994;15(3):173-90.
15. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. Dent Mater 1994;10(3):156-61.
16. Vico L, Chappard D, Alexandre C, Palle S, Minaire P, Riffat G, et al. Effects of a 120 day period of bed-rest on bone mass and bone cell activities in man: attempts at countermeasure. Bone Miner 1987;2(5):383-94.
17. Davies CM, Jones DB, Stoddart MJ, Koller K, Smith E, Archer CW, et al. Mechanically loaded ex vivo bone culture system 'Zetos': systems and culture preparation. Eur Cell Mater 2006;11:57-75; discussion 75.
18. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. Osteoporos Int 2005;16 Suppl 2:S129-38.

19. Liebschner MA. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials* 2004;25(9):1697-714.
20. Schimandle JH, Boden SD. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* 1994;19(17):1998-2006.
21. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peoc'h M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Joint Surg Am* 2000;82(4):457-76.
22. Pearce AI, Richards RG, Milz S, Schneider E, Pearce SG. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* 2007;13:1-10.
23. International. Standard ISO 10993-6 Biological evaluation of medical devices - Part 6. 1-11. 1994.
24. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng* 1998;8(1):1-9.
25. Turner AS. Animal models of osteoporosis--necessity and limitations. *Eur Cell Mater* 2001;1:66-81.
26. Hedrich HJ. History Strains and Models. In: Krinke GJ, THE LABORATORY RAT. LONDON: ACADEMIC PRESS; 2000.
27. Dixon CM, Rickert UG. Tissue tolerance to foreign materials. *Arch Oral Biol* 1933;20(8):1458-72.
28. Torneck CD. Reaction of rat connective tissue to polyethylene tube implants. *Oral Surg* 1966;21(3):379-87.
29. Phillips JM. Rat connective tissue response to hollow polyethylene tube implants. *J Can Dent Assoc (Tor)* 1967;33(2):59-64.
30. Langeland K. Methods in the study of biologic responses to endodontic materials. *Oral Surg* 1969;27(4):522-42.
31. Association AD. Council on dental materials and devices of the American Dental Association. *J Am Dent Assoc* 1972;84:375-95.
32. American National Standards Institute/American Dental Association Document no. 41 for Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. Council on Dental Materials and Devices. *J Am Dent Assoc* 1979;99(4):697-8.
33. Stanley HR. Biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1992;42(1):37-46.
34. Stanley HR. Toxicity testing of dental materials. Florida, CRC Press 1985.
35. Stanford J. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *International Endodontic Journal* 1980;30(2):140-88.
36. Sousa CJ, Loyola AM, Versiani MA, Biffi JC, Oliveira RP, Pascon EA. A comparative histological evaluation of the biocompatibility of materials used in apical surgery. *Int Endod J* 2004;37(11):738-48.
37. Onay EO, Ungor M, Ozdemir BH. In vivo evaluation of the biocompatibility of a new resin-based obturation system. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104(3):e60-6.
38. de Campos-Pinto MM, de Oliveira DA, Versiani MA, Silva-Sousa YT, de Sousa-Neto MD, da Cruz Perez DE. Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;105(5):e77-81.

39. Scarparo RK, Grecca FS, Fachin EV. Analysis of tissue reactions to methacrylate resin-based, epoxy resin-based, and zinc oxide-eugenol endodontic sealers. *J Endod* 2009;35(2):229-32.
40. Farhad AR, Hasheminia S, Razavi S, Feizi M. Histopathologic evaluation of subcutaneous tissue response to three endodontic sealers in rats. *J Oral Sci* 2011;53(1):15-21.
41. Sumer M, Muglali M, Bodrumlu E, Guvenc T. Reactions of connective tissue to amalgam, intermediate restorative material, mineral trioxide aggregate, and mineral trioxide aggregate mixed with chlorhexidine. *J Endod* 2006;32(11):1094-6.
42. Yaltirik M, Ozbas H, Bilgic B, Issever H. Reactions of connective tissue to mineral trioxide aggregate and amalgam. *J Endod* 2004;30(2):95-9.
43. Costa CA, Teixeira HM, do Nascimento AB, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod* 2000;26(9):512-6.
44. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* 2010;44(1):1-6.
45. Schour I, Massler M. *The Teeth: In The Rat in the Laboratory Investigation* Second Edition ed. USA; 1949.
46. Weinberg MA. Laboratory animal models in Periodontology. *J Clin Periodontol* 1999;26:335-40.
47. Stashenko P, Wang CY, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994;78(4):494-502.
48. Moretton TR BC, Legan JJ, Kafrawy AH. Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement. *J Biomed Mater Res* 2000;52:528-33.
49. Maurice CG, Schour I. Experimental cavity preparations in the molar of the rat. *J Dent Res* 1955;34(3):429-34.
50. Berman DS, Massler M. Experimental pulpotomies in rat molars. *J Dent Res* 1958;37(2):229-42.
51. Maurice CG, Schour I. Effects of sodium fluoride upon the pulp of the rat molar. *J Dent Res* 1956;35(1):69-82.
52. Kiryati AA. The effect of hydrocortisone plus polyantibiotics upon the damaged and infected dental pulp of rat molars. *J Dent Res* 1958;37(5):886-901.
53. Kozlov M, Massler M. Histologic effects of various drugs on amputated pulps of rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1960;13:455-69.
54. Paterson RC. Corticosteroids and the exposed pulp. *Br Dent J* 1976;140(5):174-7.
55. Ranly DM, Fulton R. An autoradiographic study of the response of rat molar pulp to formocresol using 3H-thymidine. *Pediatr Dent* 1983;5(1):20-4.
56. Smith HS, Soni NN. Histologic study of pulp capping in rat molars using calcitonin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1982;53(3):311-7.
57. Ranly DM, Fulton R. Reaction of rat molar pulp tissue to Formocresol, formaldehyde, and cresol. *J Endod* 1976;2(6):176-81.
58. 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(11):744-51.
59. Kakehashi S, Stanley HR, Fitzgerald RJ. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965;20:340-9.

60. Harris R, Bull AW. The healing of the traumatized dental pulp following capping. *Aust Dent J* 1966;11(4):236-47.
61. Rowe AH. Reaction of the rat molar pulp to various materials. *Br Dent J* 1967;122(7):291-300.
62. Harris R. Further observations on pulp reactions to a tetracycline compound. *Aust Dent J* 1968;13(1):82-6.
63. Sela J, Ulmanky M. Reaction of normal and inflamed dental pulp to Calxyl and zinc oxide and eugenol in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;30(3):425-30.
64. Hirschfeld Z, Sela J, Ulmanky M. Hydrex and its effect on the pulp. Preliminary findings on the rat molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1972;34(2):364-71.
65. Sela J, Hirschfeld Z, Ulmanky M. Reaction of the rat molar pulp to direct capping with the separate components of Hydrex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1973;35(1):118-22.
66. Paterson RC. The reaction of the rat molar pulp to various materials. *Br Dent J* 1976;140(3):93-6.
67. Watts A, Paterson RC. Simple metallic compounds as pulp-capping agents. A pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1977;44(2):285-92.
68. Gangler P, Hoyer I, Krehan F. [Biological testing of pulp-preserving agents on the pulp of rat molars]. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* 1977;65(8):851-8.
69. Negm MM, Combe EC, Grant AA. Reaction of the exposed pulps to new cements containing calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981;51(2):190-204.
70. Paterson RC, Watts A. The response of the rat molar pulp to a glass ionomer cement. *Br Dent J* 1981;151(7):228-30.
71. Paterson RC, Radford JR, Watts A. The response of the rat molar pulp of two proprietary calcium hydroxide preparations. *Br Dent J* 1981;151(6):184-6.
72. Hirschfeld Z, Bab I, Tamari I, Sela J. Primary mineralization of dentin in rats after pulp capping with calcium-hydroxide. *J Oral Pathol* 1982;11(6):426-33.
73. Watts A, Paterson RC. Bacterial contamination and the "toxicity" of materials to the exposed pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1983;56(5):542-8.
74. Watts A, Paterson RC. Pulp-capping studies with Analar calcium hydroxide and zinc oxide-eugenol. *Int Endod J* 1987;20(4):169-76.
75. Watts A, Paterson RC. Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;64(4):466-74.
76. Heling I, Zalkind M, Sela J. Pulp capping with hydroxyapatite ceramic in rat molars. *Isr J Dent Sci* 1989;2(3):128-32.
77. Zalkind M, Heling I, Sela J. Response of the dental pulp to capping with a composite resin-bonded ceramic and dental adhesive in rat molars. *Isr J Dent Sci* 1989;2(3):133-6.
78. Watts A, Paterson RC, Cohen BD, Combe EC. Pulp response to a novel adhesive calcium hydroxide based cement. *Eur J Prosthodont Restor Dent* 1994;3(1):27-32.
79. Tsuneda Y, Hayakawa T, Yamamoto H, Ikemi T, Nemoto K. A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oper Dent* 1995;20(6):223-9.
80. Costa CA, Mesas AN, Hebling J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000;13(2):81-7.
81. Dammaschke T, Wolff P, Sagheri D, Stratmann U, Schafer E. Mineral trioxide aggregate for direct pulp capping: a histologic comparison with calcium hydroxide in rat molars. *Quintessence Int* 2010;41(2):e20-30.

82. Dammaschke T, Stratmann U, Wolff P, Sagheri D, Schafer E. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: an immunohistologic comparison with calcium hydroxide in rodents. *J Endod* 2010;36(5):814-9.
83. Dammaschke T, Stratmann U, Fischer RJ, Sagheri D, Schafer E. Proliferation of rat molar pulp cells after direct pulp capping with dentine adhesive and calcium hydroxide. *Clin Oral Investig* 2011;15(4):577-87.
84. Dammaschke T, Stratmann U, Fischer RJ, Sagheri D, Schafer E. A histologic investigation of direct pulp capping in rodents with dentin adhesives and calcium hydroxide. *Quintessence Int* 2010;41(4):e62-71.
85. Dammaschke T, Stratmann U, Danesh G, Schafer E, Ott KH. Reaction of rat pulp tissue to Carisolv 'new gel'--a histocytological evaluation. *Aust Dent J* 2006;51(1):57-63.
86. Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J* 2003;36(12):831-9.
87. Muruzabal M, Erausquin J. [Experimental periodontal polyp in the root canal of the rat molar]. *Rev Asoc Odontol Argent* 1965;53(10):337-44.
88. Muruzabal M, Erausquin J. Discussion of: methods and criteria in evaluation of periapical response. *Int Dent J* 1970;20(3):539-54.
89. Muruzabal M, Erausquin J. The process of healing following endodontic treatment in the molar of the rat. *Trans Int Conf Endod* 1973;5(0):126-54.
90. Erausquin J, Muruzabal M, Devoto FC, Rikles A. Necrosis of the periodontal ligament in root canal overfillings. *J Dent Res* 1966;45(4):1084-92.
91. Erausquin J, Muruzabal M. A method for root canal treatment in the molar of the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967;24(4):540-6.
92. Muruzabal M, Erausquin J. Response of periapical tissues in the rat molar to root canal fillings with Diaket and AH-26. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966;21(6):786-804.
93. Erausquin J, Muruzabal M. Tissue reaction to root canal fillings with plastic cements. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970;29(1):91-101.
94. Erausquin J, Muruzabal M. Tissue reaction to root canal fillings with absorbable pastes. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1969;28(4):567-78.
95. Erausquin J, Muruzabal M. Tissue reaction to root canal cements in the rat molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1968;26(3):360-73.
96. Erausquin J, Muruzabal M. Root canal fillings with zinc oxide-eugenol cement in the rat molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1967;24(4):547-58.
97. Mutoh N, Tani-Ishii N. A biocompatible model for evaluation of the responses of rat periapical tissue to a new zinc oxide-eugenol sealer. *Dent Mater J* 2011;30(2):176-82.
98. Maeda H, Hashiguchi I, Nakamuta H, Toriya Y, Wada N, Akamine A. Histological study of periapical tissue healing in the rat molar after retrofilling with various materials. *J Endod* 1999;25(1):38-42.
99. Dammaschke T, Schneider U, Stratmann U, Yoo JM, Schafer E. Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue. *Acta Odontol Scand* 2005;63(3):143-52.
100. Zmener O MLR, Pameijer CH, Chaves C, Kokubu GA, Grana DR. Respuesta del tejido periapical de la rata a la sobreobtención intencional de conos de Resilon y conos de gutapercha recubiertos con resina. *Rev Asoc Odontol Argent* 2012;100:5-12.
101. Stashenko P, Yu SM, Wang CY. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod* 1992;18(9):422-6.

102. Ranade MP, Kamra, A.L. A comparative tissue toxicity evaluation of four endodontics materials. *Endodontology* 2003;15:7-13.
103. O'Brien BJ. Biocompatibility test. In: Kimberly Drive IQPC, editor. *Dental Materials and their selection*. 3rd ed; 2002. p. 391-92.
104. Aziz Zaca. A practical model for endodontic radiographic teaching. . *Annal Dent Univ Malaya* 2008;15(2):67-70.
105. Holland R, Otoboni Filho JA, Bernabe PF, de Souza V, Nery MJ. Healing process of dogs' pulpless teeth after apicoectomy and root canal filling at different levels. *Endod Dent Traumatol* 1993;9(1):8-12.
106. Briseno BM, Willershausen B. Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. 1. Zinc oxide-eugenol-based sealers. *J Endod* 1990;16(8):383-6.
107. Olsen FK, Austin BP, Walia H. Osseous reaction to implanted ZOE retrograde filling materials in the tibia of rats. *J Endod* 1994;20(8):389-94.
108. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial in vitro biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod* 2006;32(10):989-92.
109. Lodiene G, Morisbak E, Bruzell E, Orstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers in vitro. *Int Endod J* 2008;41(1):72-7.