



## RESPUESTA ÓSEA A MATERIALES ENDODONTICOS COMBINADOS CON FLUORURO DE SODIO EN UN MODELO EXPERIMENTAL EN RATA

Anja Arroyo Campos<sup>a</sup>, Rubén Abraham Domínguez Pérez<sup>a</sup>, Manuel López Rodríguez<sup>b</sup>, Graciela María Eugenia Letechipía Vallejo<sup>a</sup> y Adriana Lucía Arenas Pérez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas “Dr. Ignacio Chávez”, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, UMSNH, Morelia Michoacán, [rpdominguez1984@hotmail.com](mailto:rpdominguez1984@hotmail.com), [odontocalidad@gmail.com](mailto:odontocalidad@gmail.com), [gletechipia@yahoo.com.mx](mailto:gletechipia@yahoo.com.mx)

<sup>b</sup>Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH, Morelia, Michoacán, [mvmmanuellopez@hotmail.com](mailto:mvmmanuellopez@hotmail.com). <sup>c</sup>Facultad de Odontología, UMSNH, Morelia, Michoacán, [arenas\\_endo@hotmail.com](mailto:arenas_endo@hotmail.com).

### RESUMEN.

Diversos investigadores han modificado la composición química del material endodóntico MTA para mejorar sus propiedades, se ha propuesto recientemente al fluoruro de sodio como un aditivo. Objetivos: Evaluar en un modelo experimental en rata la respuesta biológica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca selladas con MTA adicionado con fluoruro de sodio (MTA-F) y compararla con la mostrada por el MTA y ZOE. Material y Métodos: Se utilizaron ratas Wistar a las que se les realizó una perforación en la furca de los primeros molares y se reparó con MTA, MTA-F y ZOE. Se evaluó la respuesta biológica del tejido óseo en cortes histológicos teñidos con las técnicas H&E y TRAP en donde se cuantificaron los osteoclastos a 1 día de exposición y se calculó el porcentaje de la densidad ósea a los 15 días. Resultados: existieron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.01$ ) entre la densidad ósea de los grupos expuestos a MTA y los intactos; también entre los expuestos a MTA y el expuesto a ZOE ( $p < 0.01$ ) tanto en los resultados a 1 día como a los 15 días. No existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) en la densidad ósea entre los grupos MTA y MTA-F a 1 y 15 días. Existió una correlación ( $R^2 = 0.9869$ ) entre la actividad osteoclástica a 1 día de exposición y el porcentaje de densidad ósea a los 15 días. Conclusión: La adición de fluoruro de sodio a MTA no represento mejoría significativa en el comportamiento biológico de los tejidos expuestos.

### 1. INTRODUCCIÓN.

En el campo de la Endodoncia y de los tratamientos restaurativos, las perforaciones son complicaciones que se definen como comunicaciones patológicas entre el espacio del conducto radicular y el aparato de sostén del diente. Independientemente de la causa, una perforación constituye una invasión de los tejidos periodontales que, si bien inicialmente provoca tan solo la aparición de inflamación con pérdida de la inserción epitelial, finalmente puede poner en peligro la vida del diente (Silveira et al., 2008). El avance científico de la Odontología Clínica; ha favorecido el empleo de nuevos materiales que surgen día a día en concordancia con nuevas técnicas y procedimientos terapéuticos y, si antes eran simplemente evaluados en humanos para observar si eran biocompatibles, desde hace algún tiempo, los nuevos materiales deben ser sometidos a una serie de pruebas antes de que se pueda justificar su empleo en seres humanos (Anusavice, 2004; Ochoa, 2006). Como recomendación de la Asociación Americana de Endodoncia, el uso de nuevos materiales y métodos terapéuticos debe estar basado en estudios de laboratorio, biológicos y clínicos (Parirokh y Torabinejad, 2010). Gangler en el año 2005 propuso un modelo de tres etapas para evaluar materiales dentales con el objetivo de probar su biocompatibilidad (Gangler, 2005). La



primera etapa son las pruebas in vitro; Se realizan con el material o un extracto de este que se pone en contacto con algún sistema biológico (Costa y Hebling, 1997).

En estas pruebas se puede determinar la muerte, crecimiento, y función celular, así como, evaluar la integridad del material genético de la célula (Kawahara et al., 1968; Anusavice, 2004). Resultan muy útiles para la evaluación de los efectos biológicos de los biomateriales y tienen como ventajas que no requieren el uso de animales de experimentación, la rapidez con que se realizan los estudios y su relación costo-efectividad. Sin embargo, las respuestas in vitro no siempre son indicadoras de reacciones in vivo ya que las condiciones que pueden reproducirse in vitro son limitadas (Ríos et al., 2001). Es aceptado que las pruebas in vitro sean utilizadas como una primera etapa para evaluar la toxicidad y citocompatibilidad, de modo que, se evite el uso innecesario de los animales al realizar pruebas de materiales citológicamente inapropiados (Pearce et al., 2007; Richards et al., 2001). La segunda etapa son las pruebas in vivo. Por lo anterior, sabemos que los modelos animales son esenciales para evaluar la biocompatibilidad, la respuesta tisular y la función mecánica de un material dental antes de su uso clínico en humanos (Urban et al., 2000). La tercera etapa son las pruebas de uso, primeramente en animales en donde se colocan en tejidos comparables a los tejidos humanos para los cuales se diseñaron los materiales (pulpa dental, ligamento periodontal, hueso alveolar). Históricamente los animales seleccionados como modelos experimentales para pruebas de uso de materiales dentales han sido el simio, el perro y la rata. Sin embargo cada vez existen más complicaciones éticas para el uso de simios y perros, dejando como alternativa a la rata. La rata es ideal para realizar investigaciones en el área biomédica, representa un excelente modelo gracias a su tamaño en comparación con otras especies utilizadas para experimentación, esto facilita su manejo y el control de variables en experimentos en las áreas de fisiología y toxicología, además, su ciclo de vida breve, permite la obtención de resultados en un corto período. (Hedrich et al., 2003). Otra ventaja que presenta la rata como modelo experimental, es que sus molares, presentan similitudes anatómicas, histológicas y fisiológicas con los molares humanos por lo que son considerados como un molar humano pequeño. (Dammachke et al., 2010) Asimismo, las características del tejido conectivo y epitelial del periodonto de la rata son similares a las características de los tejidos periodontales humanos. (Weinberg et al., 1999) El molar de la rata puede ser utilizado como un modelo válido para pruebas de materiales dentales y evaluaciones preclínicas de biocompatibilidad. Sin embargo este modelo no ha sido explotado debido a las complejidades técnicas que representa su manejo. (Dammachke et al., 2010).

## **2. OBJETIVOS.**

Desarrollar un modelo experimental en rata que permita evaluar de forma cuantitativa a través de técnicas histológicas e histoquímicas la respuesta biológica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca de los primeros molares mandibulares selladas con distintos materiales de uso dental.

## **3. 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 Nacional (NIH) para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, publicación N01-OD-4-2139, 2011, teniendo siempre presente reducir al mínimo el dolor y sufrimiento de los animales. Se utilizaron 21 ratas macho de la cepa Wistar con un peso entre 300 y 450g, 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. Se dividieron al azar las ratas en 4 grupos, dos grupos control (intactos y control positivo) y 2 grupos a los que se les colocaron materiales distintos que ya son utilizados en el mercado (MTA Y MTAF) (Fig.1).

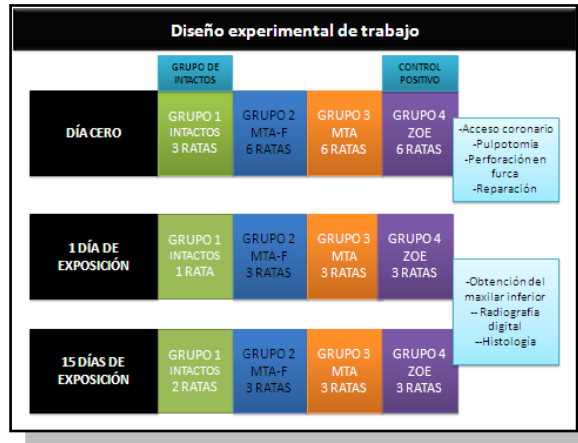


Fig. 1. Diseño experimental.

Los animales se pesaron y se les aplicó vía intraperitoneal una combinación de anestésicos: ketamina (50mg/kg) y xilacina (5mg/kg). Se fabricó un dispositivo para la colocación ergonómica del animal y del operador durante los procedimientos operatorios, el animal se colocó decúbito dorsal con una marcada inclinación de manera que la cabeza quedó más alta que la cola. Un 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. Se diseñó y modeló un aditamento en acrílico autocurable 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. Se procedió a realizar el acceso coronario en los primeros molares inferiores derecho e izquierdo con una fresa de carburo con forma de bola de tamaño ¼ hasta encontrar el acceso a los conductos radiculares, seguido de una perforación en la pared mesial del conducto distal utilizando una fresa de diamante montada en un dispositivo ultrasónico Varios 350 (Nsk), este procedimiento se realizó con abundante irrigación con solución salina. Posteriormente se llevó a cabo el secado del interior de los conductos con puntas de papel finas y se prepararon los materiales de acuerdo a las indicaciones de los fabricantes, los cuales se llevaron a la zona de la perforación con ayuda de un explorador modificado en su punta, se compactó el material con puntas de papel y se obturó la cámara pulpar y la cavidad de acceso con ionómero de vidrio tipo II. Cada rata fue colocada en una caja limpia sobre una cama térmica hasta su completo restablecimiento. En cuanto cumplieron el tiempo experimental según su grupo, recibieron una sobredosis anestésica como método de eutanasia y se procedió a la disección de la mandíbula una vez que se verificó la pérdida total de signos vitales. Ambas hemimandíbulas (derecha e izquierda) se lavaron en agua corriente, se eliminaron restos de tejidos blandos y se sumergieron en 50ml de solución amortiguadora con formol 10% para su fijación por mínimo 48 horas. Durante el periodo de fijación se obtuvieron imágenes radiográficas digitales de cada una de las hemimandíbulas que permitieron la selección de las muestras a ser procesadas histológicamente, descartando las muestras en donde no se logró la perforación, no se logró una buena obturación de la perforación o en las que se presentó fractura. Se llevaron a cabo dos tipos de tinciones: tinción de hematoxilina y eosina convencional en tejidos expuestos a 1 y 15 días a los



biomateriales y la tinción histoquímica TRAP (fosfatasa ácida tartrato-resistente) para teñir osteoclastos de rojo y cuantificarlos en los tejidos expuestos a 1 día. Se obtuvieron micrografías a 4X, 10X y 40X de los cortes histológicos de ambas tinciones con el programa de captura de imágenes Leica Application Suit mismo que despliega una barra de escala en cada una de las micrografías y a partir de la cual se realizó la calibración del programa Image-Pro plus con el que se realizaron todas las mediciones. La respuesta biológica fue evaluada mediante el conteo de osteoclastos a 1 día de exposición, (Fig. 2) la medición de densidad ósea a 15 días (Fig. 3) y la correlación de ambas (Fig.4).

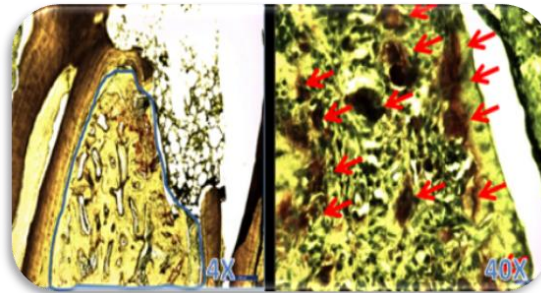


Fig. 2. Micrografías de cortes histológicos (TRAP). Se observan las características morfológicas del tejido en la zona de la furca. La imagen izquierda muestra un corte longitudinal a 4X representativo de los grupos expuestos, en azul el área medida. La imagen derecha muestra un acercamiento (40X) que posibilita el conteo de osteoclastos en el área.

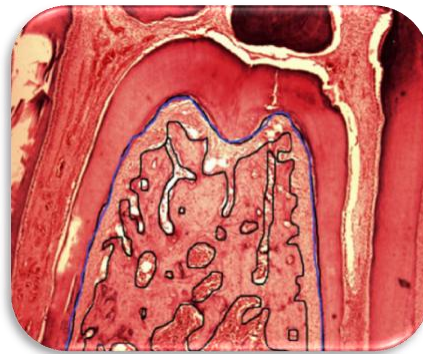
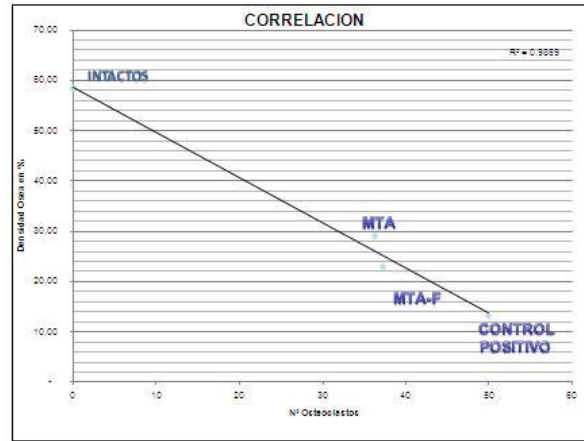


Fig. 3 Micrografía de corte histológico longitudinal 4X (H&E). Se observan las características morfológicas del tejido periapical. En azul: área total, en negro: área tejido mineralizado. Ambas áreas se emplearon para calcular el porcentaje de densidad ósea.

#### 4. RESULTADOS.

Se encontró diferencia estadística significativa ( $P < 0.01.$ ) entre el porcentaje de densidad ósea de los grupos expuestos y de los grupos control (positivo e intactos), y no existió diferencia estadística significativa entre los resultados mostrados por los grupos expuestos entre sí. Existió una correlación ( $R^2 = 0.9869$ ) entre la cantidad de los osteoclastos presentes a 1 día de exposición y el porcentaje de la densidad ósea a los 15 días (Fig.4). Lo que muestra que el modelo permite identificar diferencias entre grupos expuestos y los controles.



**Fig. 4.** Correlación y recta de regresión lineal entre el número de osteoclastos presentes a 1 día de exposición y el porcentaje de densidad ósea a 15 días de exposición.  
 $R^2 = 0.9926$ .

## 5. CONCLUSIÓN.

El modelo experimental de perforación intencional de furca y reparación con cementos, permite conocer la influencia de los materiales directamente sobre el tejido óseo. Este modelo experimental propone una forma indirecta de evaluar la respuesta inflamatoria y por lo tanto la biocompatibilidad de cada uno de los materiales. Aun cuando parte de esta respuesta es debida al estímulo mecánico y físico causado durante la perforación, la diferencia entre grupos es debida en gran parte a la composición química de los materiales.

## BIBLIOGRAFIA.

1. Anusavice. "Ciencia de los materiales dentales". 11 edn, (2004).
2. C.A. Costa. J.T.M. "Hebling. Estudio preliminar da compatibilidade biologicados adesivos dentinarios all-bond 2 e scotchbond mp. Avalicao: avalicao histologica de implantes subcutaneos em ratos". Rev Odontol Univ São Paulo. pp. 11-18 ( 1997).
3. Gängler. "The controversy: restoration technique – should there be exclusively adhesive restorations?" . *Dtsch Zahnärztl Z.* Vol 60, 2005, pp.11-14
4. H. Hedrich. "History, strains and models. In: Krinke GJ, The laboratory rat, Academic Press", 2003, pp. 3-16.
5. H. Kawahara, A. Yamagami, M. Nakamura Jr. "Biological testing of dental materials by means of tissue culture". *Int Dent J.* Vol. 18, 1968, pp. 443-467.
6. M. Weinberg. "Laboratory animal models in periodontology". *J Clin Periodontol.* Vol. , 1999, pp.335–40.
7. C. P. E. Ochoa, K. Rueda K. *Cementos en endodoncia.* Vol.30, 2006.
8. M. Parirokh, M. Torabinejad. "Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action". *J Endod.* Vol. 36, 2010, pp. 400-413.
9. A. I. Pearce, R. G. Richards, S. Milz, E. Schneider, S. G. Pearce. "Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater.*" Vol.13, 2007, pp. 1-10.



10. R. G. Richards. "Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy". *Cell Biol Int*. Vol. 25, 2001, pp.1237-1249.
11. M. C. J. Ríos, N. Davidenko, R. Krael, A. González, K. Pérez. JL. Bello. "Evaluación toxicológica in vitro de materiales poliméricos de restauración dental compuestos por BIS-GMA". *Anuario Toxicología*. 2001, pp. 65-72.
12. C. M. Silveira, A. Sanchez-Ayala, M. O. Lagravere, G. L. Pilatti, O. M. Gomes. "Repair of furcal perforation with mineral trioxide aggregate: long-term follow-up of 2 cases". *J Can Dent Assoc*. Vol.74, 2008, pp.729-733.
13. T. Dammaschke. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim*. Vol. 44, 2010, pp.1-6.
14. R. M. Urban. "Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement". *J Bone Joint Surg Am*. Vol. 82, 2000, pp. 457-476.