



## UN MODELO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR BIOCOMPATIBILIDAD DE MATERIALES DENTALES EN TEJIDO PERIODONTAL DE RATA.

Rubén Domínguez Pérez<sup>a</sup>, Graciela María Eugenia Letechipía-Vallejo<sup>a</sup>, Manuel López Rodríguez<sup>b</sup>, José Miguel Cervantes Alfaro<sup>a</sup> y Bertha Fenton Navarro<sup>a</sup>

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

### RESUMEN.

Existen reportes que muestran que una respuesta inflamatoria periapical puede persistir durante años posterior a la finalización de un tratamiento endodóntico, sin manifestaciones clínicas, ni alteraciones radiográficas que la pongan de manifiesto, esta respuesta desfavorable está relacionada con una deficiente biocompatibilidad del material utilizado. Materiales y métodos: se utilizaron ratas Wistar a las que se indujo periodontitis apical al realizar una exposición de la pulpa de primeros molares mandibulares, seguido a esto se realizó un tratamiento endodóntico y sobreobtención con dos materiales distintos. La respuesta inflamatoria fue evaluada en cortes histológicos transversales del tejido periapical, mediante la correlación de la magnitud del infiltrado inflamatorio y la superficie de contacto del cemento y el tejido. Para evaluar el modelo se realizó un ensayo en donde el Grupo Control negativo los tejidos periapicales permanecieron sanos y normales; en el Grupo Control positivo se observaron datos característicos de tejido periodontal inflamado; en los Grupos expuestos se observó además infiltrado inflamatorio adyacente a los cementos implantados. Resultados: Se encontró correlación ( $p < 0.0001$ ) entre la magnitud del infiltrado inflamatorio y la superficie del tejido expuesto al material, así como su composición química. Conclusión: El modelo experimental permite evaluar y comparar cuantitativamente la respuesta inflamatoria inducida no solo por las características físicas y químicas del material, sino también por la cantidad expuesta.

### 1. INTRODUCCIÓN

Los molares de rata, presentan similitudes anatómicas, histológicas, fisiológicas y pueden ser considerados como un molar humano pequeño.[1] las características del tejido conectivo y epitelial del periodonto de la rata son similares a las características de los tejidos periodontales humanos.[2] el molar de la rata puede ser utilizado como un modelo válido para pruebas de materiales dentales y evaluaciones preclínicas de biocompatibilidad.[1] Stashenko y cols.[3],[4] mostraron que la microbiota de los conductos radiculares de la rata se asemeja 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 humanos. Adicionalmente, la respuesta biológica de las ratas progresa más rápido que la humana.[5]

**2.-OBJETIVO:** El propósito de este trabajo fue investigar la reproducibilidad y funcionalidad del modelo experimental desarrollado en molares mandibulares de rata para la evaluación de materiales de uso endodóntico.



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

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*.

De acuerdo al peso de cada animal se aplicó como anestésico una combinación de Ketamina (50mg/kg, i.p.) y Xylacina (5mg/kg, i.p.). Se acondiciono un espacio de trabajo que permitió establecer una adecuada relación entre la boca de la rata, el operador y el microscopio estereoscópico quirúrgico (Carl Zeiss 26516, Germany), esta posición de trabajo se utilizó en todos los procedimientos operatorios con la rata. Se diseñó y modeló un aditamento en acrílico autocurable que permitió mantener la boca de la rata en máxima apertura, lograr el aislamiento absoluto, proteger los tejidos blandos y mejorar el acceso y visibilidad a la zona operatoria. Se indujo la formación de una lesión periapical radiográficamente detectable en base a la metodología desarrollada por Stachenko.[3],[6] Se realizaron dos cavidades en la superficie oclusal de los primeros molares inferiores derecho e izquierdo, una sobre la fosa mesial y la otra sobre la fosa distal. Las 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. Se permearon los conductos mesial y distal introduciendo 3 milímetros de una lima calibre ISO 0.6 nueva para cada caso. Se realizó irrigación con solución salina para asegurar que el acceso a los conductos fuera permeable y la eliminación de la mayor cantidad de pulpa cameral. Estas cavidades se dejaron expuestas al medio bucal de la rata durante 21 días, lo que indujo la formación de una lesión periapical, una vez transcurrido ese tiempo se procedió a la extrusión intencional de los cementos a estudiar, para esto se unieron las dos cavidades talladas previamente y a través de esta se realizó una instrumentación mecánica e irrigación con hipoclorito de sodio al 2.5%, utilizando limas calibre ISO 0.6 introduciéndolas hasta 6 mm, 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. Las limas calibre ISO 1.5 y 2.0 a una longitud de 5.5 mm. La instrumentación concluyó con una lima calibre ISO 2.5 a una longitud de 4 mm, irrigación final y secado de los conductos con puntas de papel calibre ISO 1.5. Se preparó cemento sellador siguiendo las instrucciones del fabricante, se llevó a los conductos con limas ISO 1.5 haciendo movimientos de entrada y salida hasta una longitud de 6 mm extruyendo intencionalmente los materiales a través del foramen apical. Los conductos se obturaron con gutapercha calibre ISO 1.5 y se eliminó el exceso de cemento sellador de la cámara pulpar. Se lavó, secó y coloco ionómero de vidrio tipo II como restauración final. Para evaluar la funcionalidad y reproducibilidad del modelo experimental se realizó un ensayo en donde se utilizaron dos cementos selladores que se encuentran en el mercado uno a base de oxido de zinc y eugenol y otro a base de resina.

Se asignaron al azar 28 ratas a los siguientes grupos.

- Grupo 1: Lesión periapical de 21días + Cemento sellador 1 (n=10).
- Grupo 2: Lesión periapical de 21días + Cemento sellador 2 (n=10).
- Grupo 3: Control negativo "animales intactos" (n=4).
- Grupo 4: Control positivo (n=4) (lesión periapical de 21 días sin extrusión de cementos selladores).

La mitad de los animales de cada grupo se sacrificó 24 horas posteriores a la extrusión intencional y la otra mitad a los 15 días. Una vez sacrificados los animales, se obtuvieron radiografías. Posteriormente se procesaron histológicamente las hemimandíbulas y se tiñeron con H&E los cortes histológicos para su observación y análisis al microscopio.



#### 4. RESULTADOS

**Grupo Control Negativo “animales intactos”:** Los tejidos periapicales permanecieron sanos en todas las muestras, no se observaron infiltrados de células inflamatorias y la morfología histológica de la zona se mostró normal. (Fig.1 A)

**Grupo Control Positivo:** En los tejidos periapicales con lesión de 21 días se observaron, células inflamatorias distribuidas en todo el ligamento, destrucción del trabeculado óseo con lo que el espacio del ligamento periodontal se incrementó sin afectar hueso cortical. (Fig.1 B)

**Grupos 1 y 2:** Los tejidos expuestos a los cementos mostraron las características descritas en el grupo control positivo. Adicionalmente se observó un infiltrado de células inflamatorias adyacente a ambos cementos implantados en todos los casos, mismo que se evaluó cuantitativa o cualitativamente, lo que permitió diferenciar entre la respuesta inflamatoria inducida por uno u otro cemento. (Fig.1 C)

Se realizó el análisis histomorfométrico obteniendo 3 micrografías a 40X de cada raíz (mesial y distal) con el programa de captura de imágenes Leica Application Suit (Leica Microsystems AG). Cada imagen fue exportada al programa Image Pro-plus (Media Cybernetics), con la herramienta de trazado de áreas se marcó manualmente el área de infiltrado inflamatorio adyacente a los cementos selladores, y la longitud de la superficie de contacto del material. esto se realizó en ciego y por triplicado en diferentes tiempos por el mismo operador. Los valores numéricos de cada imagen fueron exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft Office) para su procesamiento.

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 pero no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar la respuesta inflamatoria inducida por ambos cementos en el mismo periodo experimental, lo que sugiere que ambos materiales inducen respuestas similares, mientras que en las dos respuestas inducidas por el mismo cemento en los dos diferentes periodos experimentales (1 y 15 días) si se observó que la respuesta inducida es mayor a 1 día comparada con la de 15 días.

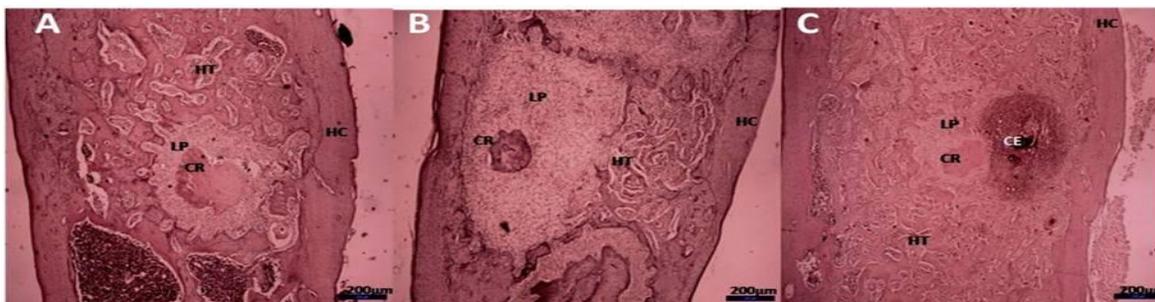


Figura 1. Micrografías de cortes histológicos transversales al mismo nivel aproximado (40X), representativos de cada grupo. Nótese en A: la normalidad de todos los tejidos, en B: la destrucción del trabeculado óseo y con esto el ensanchamiento del ligamento periodontal y en C: el infiltrado inflamatorio adyacente al material implantado. HC: Hueso Cortical, HT: Hueso Trabecular, LP: Ligamento Periodontal, CR: Cemento Radicular, P: Pulpa, CE: Cemento Endodóntico (material implantado), IC: Infiltrado Celular Inflamatorio.



## 5. DISCUSIÓN

En el área odontológica son pocos los modelos experimentales desarrollados para la evaluación de biocompatibilidad principalmente de materiales de uso endodóntico y los existentes no son adecuados ya que: 1.-Evalúan los materiales en tejidos distintos para donde son diseñados.[5], [7], [8], 2.-Son realizados en animales con características anatómicas, histológicas y fisiológicas distintas al humano.[1], [9], [10], 3.- Se emplean especies animales en donde la experimentación ya no es aceptada por razones éticas. [11], [12], 4.- Utilizan procedimientos quirúrgicos diferentes para implantar los materiales, lo que aleja al modelo de los procedimientos quirúrgicos empleados en la práctica clínica. [15],[16],5.-Son realizados en tejidos completamente sanos donde la respuesta puede ser favorable.[5], [7], [8]. El modelo aquí descrito utiliza a la rata como modelo experimental para evaluar cementos de uso endodóntico. Este modelo representa una buena alternativa debido a que las características de los tejidos dentales y periodontales son semejantes a los del humano. Es aceptado su uso como modelo experimental y se tiene suficiente información acerca de sus características.[2], [15], [16] Sin embargo para las pruebas de uso de materiales odontológicos la rata no ha sido muy utilizada debido a las complicaciones técnicas que representa trabajar dentro de su pequeña cavidad oral y a las limitaciones para cumplir con todo el protocolo de asepsia. La propuesta aquí descrita logró un aspecto fundamental para los procedimientos endodónticos, el aislamiento absoluto de la zona operatoria, algo que se ha mencionado como imposible por otros autores[17]. Con esto se evitó la contaminación por microorganismos y se cumplió con uno de los puntos más importantes al realizar procedimientos endodónticos, también se logró que los materiales fueran evaluados en tejidos en donde previamente se indujo un daño al tejido de forma experimental y los procedimientos utilizados para colocar los materiales en las zonas de interés fueron similares a como se hace en la clínica. Todo esto hace al modelo más próximo a la realidad.

## 6.CONCLUSIÓN

El modelo experimental desarrollado, estandarizado y evaluado, utilizando molares mandibulares de rata permite evaluar de forma radiográfica e histológica diversos materiales de uso endodóntico en tejidos periodontales lesionados, es reproducible y funcional.

## BIBLIOGRAFÍA

- [1] T. Dammaschke, "Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry.," *Lab. Anim.*, vol. 44, pp. 1–6, 2010.
- [2] M. A. Weinberg and M. Bral, "Laboratory animal models in periodontology," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 26, no. 6, pp. 335–340, 1999.
- [3] P. Stashenko, C.-Y. Wang, N. Tani-Ishii, and S. M. Yu, "Pathogenesis of induced rat periapical lesions," *Oral surgery, oral Med. oral Pathol.*, vol. 78, no. 4, pp. 494–502, 1994.
- [4] P. Stashenko and S. M. Yu, "T Helper and T Suppressor Cell Reversal During the Development of Induced Rat Periapical Lesions," *J. Dent. Res.* , vol. 68 , no. 5 , pp. 830–834, May 1989.
- [5] T. R. Moretton, C. E. Brown, J. J. Legan, and A. H. Kafrawy, "Tissue reactions after subcutaneous and intraosseous implantation of mineral trioxide aggregate and ethoxybenzoic acid cement," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 52, no. 3, pp. 528–533, 2000.
- [6] P. Stashenko, S. M. Yu, and C.-Y. Wang, "Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections," *J. Endod.*, vol. 18, no. 9, pp. 422–426, 1992.



- [7] M. M. D. de Campos-Pinto, D. A. de Oliveira, M. A. Versiani, Y. T. C. Silva-Sousa, M. D. de Sousa-Neto, and D. E. da Cruz Perez, "Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues," *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology*, vol. 105, no. 5, pp. e77–e81, 2008.
- [8] L. da F. R. Garcia, A. A. F. Marques, L. de M. R. Roselino, F. de C. P. Pires-de-Souza, and S. Consani, "Biocompatibility Evaluation of Epiphany/Resilon Root Canal Filling System in Subcutaneous Tissue of Rats," *J. Endod.*, vol. 36, no. 1, pp. 110–114, Jan. 2010.
- [9] M. R. Leonardo, D. S. H. Flores, F. W. G. de Paula e Silva, R. de Toledo Leonardo, and L. A. B. da Silva, "A Comparison Study of Periapical Repair in Dogs' Teeth Using RoekoSeal and AH Plus Root Canal Sealers: A Histopathological Evaluation," *J. Endod.*, vol. 34, no. 7, pp. 822–825, Jul. 2008.
- [10] J. Sela, I. Tamari, Z. Hirschfeld, and I. Bab, "Transmission electron microscopy of reparative dentin in rat molar pulps," *Cells Tissues Organs*, vol. 109, no. 3, pp. 247–251, 1981.
- [11] D. Ørstavik and I. A. Mjör, "Usage test of four endodontic sealers in Macaca fascicularis monkeys," *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol.*, vol. 73, no. 3, pp. 337–344, Mar. 1992.
- [12] R. Holland, V. de Souza, M. J. Nery, J. A. Otoboni Filho, P. F. E. Bernabé, and E. Dezan Jr, "Reaction of dogs' teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer," *J. Endod.*, vol. 25, no. 11, pp. 728–730, 1999.
- [13] N. MUTOH and N. TANI-ISHII, "A biocompatible model for evaluation of the responses of rat periapical tissue to a new zinc oxide-eugenol sealer," *Dent. Mater. J.*, vol. 30, no. 2, pp. 176–182, 2011.
- [14] H. Maeda, I. Hashiguchi, H. Nakamuta, Y. Toriya, N. Wada, and A. Akamine, "Histological study of periapical tissue healing in the rat molar after retrofilling with various materials," *J. Endod.*, vol. 25, no. 1, pp. 38–42, Jan. 1999.
- [15] A. Rigalli and V. Di Loreto, *Experimental surgical models in the laboratory rat*. CRC Press, 2010.
- [16] M. A. Suckow, S. H. Weisbroth, and C. L. Franklin, *The Laboratory Rat*. Elsevier Science, 2005.
- [17] T. Dammaschke, U. Schneider, U. Stratmann, J.-M. Yoo, and E. Schäfer, "Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue.," *Acta Odontol. Scand.*, vol. 63, pp. 143–152, 2005.