

# Evaluación de un modelo experimental en molares de rata para pruebas de biocompatibilidad

Assessing an experimental model in rat molar teeth for biocompatibility testing.

**M. en C.E.E. Rubén Abraham Domínguez Pérez**

Laboratorio de Neurociencias, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", UMSNH

**C.D.E.E. Anja Arroyo Campos**

Facultad de Odontología, UMSNH-CUEPI

**M. en C. Manuel López Rodríguez**

Laboratorio de Histopatología, USAD, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UMSNH

**C.D.E.E. Edgar Hugo Trujillo Torres**

Escuela de Odontología, ULA. Morelia Michoacán, México.

**C.D.E.E. Adriana Lucia Arenas Perez**

Facultad de Odontología, UMSNH-CUEPI.

**D. en C. Graciela Letechipia Vallejo**

Laboratorio de Neurociencias, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Ciencias Médicas y Biológicas "Dr. Ignacio Chávez", UMSNH, Morelia Michoacán, México.

## Resumen

**Introducción:** El modelo más adecuado para la evaluación de la respuesta frente al uso de cementos endodónticos es aquel que simule un proceso patológico y la posible reparación dependiente de las propiedades del material. Es importante la similitud anatómica y fisiológica de los tejidos utilizados, así como la forma en cómo se llevan a estos. **Objetivos:** Desarrollar, estandarizar y evaluar un modelo experimental en molares de rata para pruebas de biocompatibilidad de materiales endodónticos. **Materiales y Métodos:** Se utilizaron molares mandibulares de ratas Wistar a las que se provocaron diversos tipos de lesión, para posteriormente colocar en esas zonas diferentes cementos endodónticos. La respuesta de los tejidos ante el estímulo con los materiales fue evaluada radiográfica e histológicamente con diferentes tinciones. **Resultados:** Se desarrolló el modelo y se realizaron 3 ensayos experimentales distintos con lo que se comprobó una alta funcionalidad y reproducibilidad del modelo. **Conclusiones:** El presente modelo permite evaluar en forma comparativa la respuesta del periodonto expuesto a diferentes cementos endodónticos.

**Palabras clave:** *Pruebas a materiales, Ratas, Endodoncia*

## Abstract

**Introduction:** The best experimental model to evaluate endodontic cements is one that simulates a pathological process and the consequent repair depended of material properties; also it is important anatomical and physiological similarities to the human tissue and the technique used to implant the material. **Objectives:** To develop, standardize and evaluate an experimental model in rat molar teeth for biocompatibility testing. **Materials and Methods:** Different types of injury were induced in Wistar rat molar teeth, in the affected tissues were implanted different endodontic cements. The response was evaluated radiographically and histologically. **Results:** The model was developed and 3 different experimental tests were applied. It was found that high functionality and reproducibility of the model were performed. **Conclusions:** This model allows comparatively evaluating the response of periodontal tissues exposed to different endodontic cements.

**Key words:** *Materials testing, Rats, Endodontics.*

## Introducción

**P**ara el desarrollo y evaluación de materiales de uso odontológico son necesarias tres diferentes etapas que están descritas en el estándar 7405 de la International Standard Organization (ISO) (1). La etapa uno incluye pruebas *in vitro*: estas se utilizan para la evaluación de materiales particularmente en la investigación responsable que busca la disminución en el uso de animales de investigación. Sin embargo, las pruebas *in vitro* no son capaces de mostrar la respuesta del tejido al ser estimulado con diversos materiales, pues está limitada a la respuesta de células individuales, siendo distinta dependiendo incluso de la línea celular utilizada (2). Aunado a esto, están ausentes también 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. Por estas razones las pruebas *in vivo* utilizando modelos animales son esenciales para evaluar la biocompatibilidad con los tejidos y la función mecánica de un material antes de su uso clínico en humanos.

La etapa dos *in vivo*, evalúa principalmente la toxicidad aguda sistémica ya sea por inhalación, aplicación en piel, o implantación en tejido subcutáneo. La tercera y última etapa incluye pruebas de uso en animales, en tejidos comparables a los tejidos para los cuales se diseñaron los materiales (pulpa dental, ligamento, hueso) (1).

Un modelo animal, como atributo debe poseer características similares con los seres humanos, en aspectos tanto fisiológicos como patológicos, así como brindar la posibilidad de observar numerosos sujetos durante un tiempo relativamente corto.(3-5)

Estos modelos permiten la evaluación de materiales en situaciones diversas en un

periodo largo y en condiciones distintas en cada tejido. 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 a esta situación. Cada modelo animal tiene ventajas y desventajas. (6)

Los primates no humanos como modelos experimentales son a menudo considerados como los más apropiados, sin embargo, 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. (7,8) Otra especie que ha sido utilizada es el perro, sin embargo cada vez existen más restricciones éticas en el uso de animales de compañía para la investigación. Mientras que especies como ovejas, cerdos o roedores son actualmente más aceptadas. (6)

Como modelo experimental 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 corto, permite la obtención de resultados en un corto período. (9)

Los molares de rata, presentan similitudes anatómicas, histológicas, fisiológicas y pueden ser considerados como un molar humano pequeño.(10) Las características del tejido conectivo y epitelial del periodonto de la rata son similares a las características de los tejidos periodontales humanos. (11) El molar de la rata puede ser utilizado como un modelo válido para pruebas de materiales dentales y evaluaciones preclínicas de biocompatibilidad. (10) Stashenko y cols. (12,13) 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. (14)

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.

### **Material y método**

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.

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.

#### **Diseño del estudio**

El proyecto se desarrolló en 2 etapas:

**Primera Etapa:** “Desarrollo y estandarización del modelo experimental”

Durante esta etapa se realizaron todas las pruebas y ajustes pertinentes a cada procedimiento hasta lograr su estandarización.

A continuación se describen los procedimientos:

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 acondicionó 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. (Fig. 1) 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. (Fig. 2)

Después de establecer las condiciones iniciales del protocolo se continuó con uno de los tres diferentes procedimientos que se describen a continuación:

#### **A.- Inducción experimental de lesión periapical radiográficamente detectable**

Con base en la metodología desarrollada por Stachenko.(12,15) 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 un periodo de tiempo, lo que indujo la formación de una lesión periapical.

#### **B.- Extrusión de cementos selladores**

Se realizó una cavidad en la cara oclusal a través de la cual se hizo el acceso coronario, posterior a esto la instrumentación e irrigación con hipoclorito de sodio al 2.5%. y limas calibre ISO 0.6 introduciéndolas 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. 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 colocó ionómero de vidrio tipo II como restauración final.

### C.- Perforación en furca y sellado con cementos reparadores.

Se procedió a realizar el acceso coronario y ubicación del conducto distal, posteriormente se realizó una perforación en su pared mesial utilizando una fresa de diamante montada en una pieza de ultrasonido (Varios 350®, Nsk), este procedimiento incluyó abundante irrigación con solución salina. Se llevó a cabo el secado del interior de los conductos con puntas de papel y la preparación del cemento "reparador" (MTA) siguiendo las indicaciones del fabricante, se llevó el material a la zona de la perforación compactándolo con puntas de papel, y finalizando con la obturación de la cámara pulpar y la cavidad de acceso con ionómero de vidrio tipo II.

Una vez que se concluyó alguno de los 3 procedimientos descritos (A, B o C) se continuó de la siguiente manera: Cada rata recibió una sobredosis anestésica como procedimiento de eutanasia y se disecaron las dos hemimandíbulas después de verificar la pérdida total de signos vitales. Las dos hemimandíbulas se lavaron con agua co-

rriente, eliminando restos de tejidos blandos y se sumergieron en 50 ml de formalina para su fijación por un mínimo de 48 horas. Durante el período de fijación se obtuvieron las imágenes radiográficas utilizando un dispositivo que permitió que todas las exposiciones fueran en la misma posición y a la misma distancia con un aparato de rayos X (Corix 70 plus®, Coramex) y un sensor del radiovisiografo (Brío T10®, Brío Basic Radiography Series) con un tiempo de exposición de 0.16 milisegundos en todos los casos.

Para el procesamiento histológico, las hemimandíbulas se descalcificaron durante 30 días en 30ml de una solución de EDTA al 10% pH 7 con recambio de solución a los 15 días. Se utilizó un procesador (Microm STP120-1®, Microm International), para el proceso de deshidratación de los tejidos. Se incluyeron en parafina y se fabricaron bloques. Cada bloque fue cortado en un micrótopo de rotación (Microm HM 325®, Microm International). Todos los cortes se recolectaron de forma seriada hasta acumular 15 laminillas con 5 o 6 cortes cada una. Los cortes se tiñeron mediante el método de hematoxilina – eosina (H&E) y con la técnica histoquímica de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). Para su conservación y posterior observación se aplicó resina de montaje a cada laminilla.

**Segunda Etapa:** "Evaluación de la funcionalidad y reproducibilidad del modelo experimental"

A continuación se muestran los diseños experimentales utilizados durante la evaluación y los resultados obtenidos en la aplicación de cada variante propuesta (A, B o C) dentro del modelo experimental:

#### 1.- Evaluación del modelo de inducción experimental de lesión periapical radiográficamente detectable.

Cada rata se sometió a la inducción experimental de lesión periapical siguiendo el

procedimiento descrito en “A”.

Se asignaron al azar 12 ratas a los siguientes grupos:

*Grupo 1:* Lesión Periapical de 21 días (n=5).

*Grupo 2:* Lesión Periapical de 36 días (n=5).

*Grupo 3:* Control Negativo “animales intactos” (n=2).

Una vez sacrificados los animales, se obtuvieron las imágenes radiográficas de las hemimandíbulas. Las imágenes fueron exportadas al programa Image Pro-plus (Media Cybernetics) en donde se midieron las áreas radiolúcidas circunscritas a los ápices de cada raíz por separado, esto se realizó en ciego y por triplicado en diferentes tiempos por el mismo operador. Los valores numéricos del área de lesión de cada hemimandíbula fueron exportados a una hoja de cálculo de Microsoft Excel (Microsoft office) para su procesamiento.

Los resultados mostraron que la exposición pulpar al medio bucal de la rata durante 21 y 36 días fue suficiente para inducir la formación de lesión radiográfica, con un mayor desarrollo en tejidos inducidos durante más tiempo (36 días). Por otra parte, el grupo control negativo “animales intactos” no presentó desarrollo de lesión periapical radiográficamente detectable. (Fig.3 a, b, c)

Al comparar las áreas de lesión de los grupos 1 y 2, se encontró diferencia estadísticamente significativa. El grupo 1 con una media de  $1.409 \pm 0.1071 \text{ mm}^2$  en el área de lesión radiográficamente detectable y de  $1.865 \pm 0.0727 \text{ mm}^2$  para el grupo 2. (Fig. 4)

## 2.- Evaluación del modelo de extrusión de cementos selladores, posterior a inducción de lesión periapical.

Cada rata se sometió a la inducción experimental de lesión periapical seguido de la extrusión de cementos selladores de



Figura 1. Fotografía que muestra la relación entre el microscopio estereoscópico, la posición de la rata y del operador



Figura 2. Fotografías que muestran el aditamento de acrílico diseñado y montado en la rata.



Figura 3. Radiografías representativas de cada grupo. **a:** Grupo control negativo “animales intactos”, **b:** Grupo 1: Lesión periapical de 21 días y **c:** Grupo 2: Lesión periapical de 36 días.

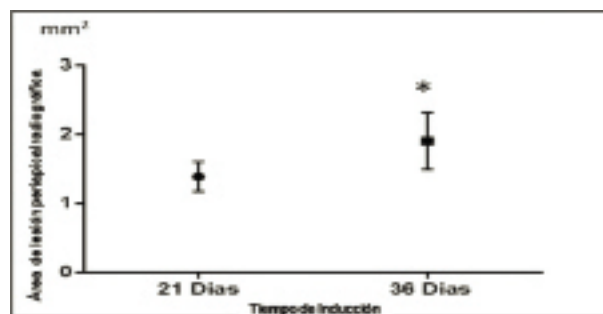


Figura 4. Representación grafica de las áreas de lesión periapical radiográfica de ambos grupos. \*Existe diferencia estadísticamente significativa entre la inducción de 21 días comparada con la de 35 días. (t de student, nivel de significancia  $P < 0.0001$ )

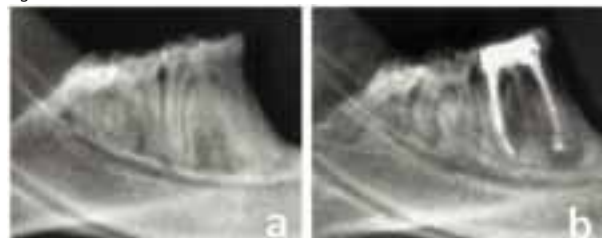


Figura 5. Radiografías representativas de, **a:** Grupo control negativo “animales intactos”, **b:** Grupo 1 o 2 Lesión periapical de 21 días + cemento sellador 1 o 2.

acuerdo a los procedimientos descritos en “A y B “. Se utilizaron dos cementos selladores que se encuentran disponibles en el mercado y de los cuales no revelaremos los nombres comerciales (no es nuestro objetivo comparar materiales, sino evaluar el modelo), se asignaron al azar 28 ratas a los siguientes grupos.

**Grupo 1:** Lesión periapical de 21 días + Cemento sellador 1 (n=10).

**Grupo 2:** Lesión periapical de 21 días + 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 sobreobturación y la otra mitad a los 15 días. Una vez sacrificados los animales, se obtuvieron las radiografías. (Fig. 5 a, b) Posteriormente se procesaron histológicamente las hemimandíbulas y se tiñeron con H&E, (Fig. 6) cada una se observó en el microscopio.

A continuación se describen los 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.6 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.6 B)



Figura 6. Micrografías de cortes histológicos transversales al mismo nivel aproximado (H&E-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.

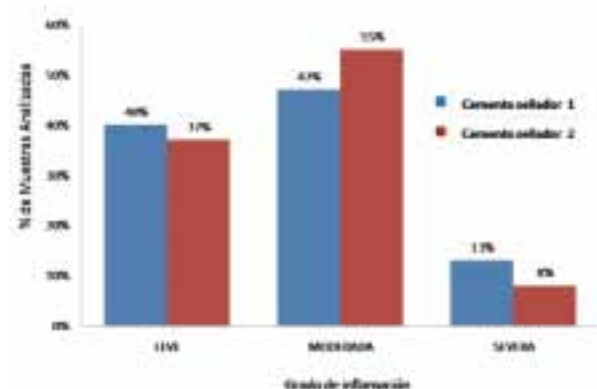


Figura 7. Gráfica que representa el % de muestras clasificado para cada grado de inflamación a 1 día de exposición. No existen diferencias estadísticamente significativas (t de student, nivel de significancia en  $P < 0.05$ )

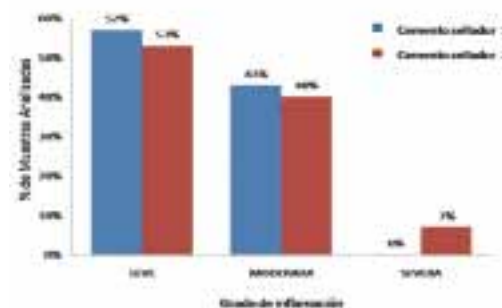


Figura 8. Gráfica que representa el % de muestras clasificado para cada grado de inflamación a 15 días de exposición. No existen diferencias estadísticamente significativas (t de student, nivel de significancia en  $P < 0.05$ )

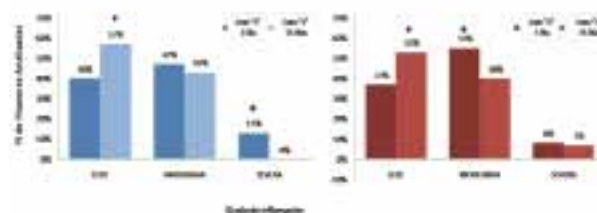


Figura 9. Gráficas que representa el % de muestras clasificado para cada grado de inflamación estimulada por el mismo cemento a 1 día y 15 días de exposición. \*Existe diferencia estadísticamente significativa al comparar la respuesta al mismo en los dos tiempos experimentales (t de student  $P < 0.05$ ).

## 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 puede ser evaluado cuantitativa o cualitativamente, dependiendo del interés del investigador lo que permite diferenciar entre la respuesta inflamatoria inducida por uno u otro cemento. (Fig.6 C)

Para finalizar 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, 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.

Las áreas de infiltrado inflamatorio se clasificaron en tres, infiltrado inflamatorio leve, moderado y severo. Para realizar la clasificación de los datos se ordenaron desde la mínima área registrada hasta la máxima y a partir de estos datos se distribuyeron en los tres grupos.

La exposición a los cementos selladores durante 1 día mostró en ambos casos predominantemente un área de infiltrado inflamatorio moderado tendiendo a leve. (Fig. 7)

Los grupos 1 y 2 expuestos durante 15 días mostraron una tendencia de infiltrado inflamatorio leve tendiendo a moderado. (Fig. 8) Nótese que en el caso de la exposición al cemento 1 ningún tejido presentó infiltrado inflamatorio severo mientras que en la ex-

posición al cemento 2 sólo el 7% lo mostró.

El no encontrar diferencia estadísticamente significativa al comparar la respuesta inflamatoria inducida por ambos cementos en el mismo periodo experimental sugiere que ambos materiales inducen respuestas similares.

En las dos respuestas inducidas por el mismo cemento en los dos diferentes periodos experimentales (1 y 15 días) se observó que la respuesta inducida es mayor a 1 día. A los 15 días esta ya ha disminuido, posiblemente porque los cementos ya han dejado de liberar algunos compuestos citotóxicos tal como ha sido reportado para varios materiales, (16,17) además de que el sistema inmune ya ha tenido tiempo de mediar el proceso. (Fig. 9)

### 3.- Evaluación del modelo de perforación de furca y sellado con cementos reparadores.

Cada rata se sometió a la perforación de furca y sellado con cementos reparadores siguiendo el procedimiento descrito en "C".

Empleando dos cementos reparadores que ya se encuentran en el mercado y de los cuales tampoco revelaremos los nombres comerciales, se asignaron al azar 24 ratas a los siguientes grupos.

*Grupo 1:* Perforación en furca + Cemento reparador 1 (n=10).

*Grupo 2:* Perforación en furca + Cemento reparador 2 (n=10).

*Grupo 3:* Control negativo "animales intactos" (n=4).

La mitad de los animales de cada grupo se sacrificó 1 día posterior al procedimiento y la otra mitad a los 15 días. Una vez sacrificados los animales, se obtuvieron imágenes radiográficas, (Fig. 10) se procesaron histológicamente las hemimandíbulas y se tiñeron con H&E (Fig. 11) y TRAP. (Fig. 12)

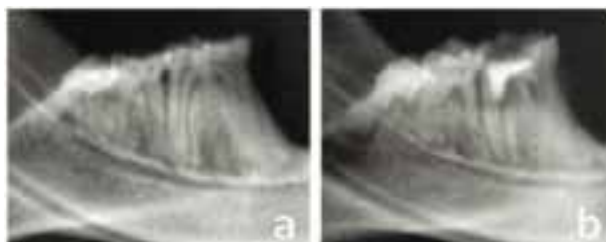


Figura 10. Radiografías representativas de, **a**: Grupo control negativo “animales intactos”, **b**: Grupo 1 o 2 perforación en furca + cemento reparador 1 o 2.



Figura 11. Micrografías de cortes histológicos (H&E) donde se observan las características morfológicas del tejido periapical de los diferentes grupos. La imagen **A** muestra un corte longitudinal a 4X representativo de los grupos intactos, la imagen **B** muestra un corte longitudinal a 4X representativo de los grupos expuestos a 1 día, la imagen **C** muestra un corte longitudinal a 4X representativo de los grupos expuestos a 15 días. *CO*: Cresta Ósea, *Rd*: Raíz distal, *Rm*: Raíz mesial, *MAT*: Material (cemento utilizado), *PO*: Pérdida Ósea.



Figura 12. Micrografías de cortes histológicos (TRAP) donde se observan las características morfológicas del tejido periapical de los diferentes grupos. La imagen **A** muestra un corte longitudinal a 4X representativo de los grupos intactos, la imagen **B** muestra un corte longitudinal a 4X representativo de los grupos expuestos a 1 día, la imagen **C** muestra un acercamiento de la imagen B. *CO*: Cresta Ósea, *Rd*: Raíz distal, *Rm*: Raíz mesial, *MAT*: Material (cemento utilizado), La flecha roja muestra células teñidas de rojo (osteoclastos activos).

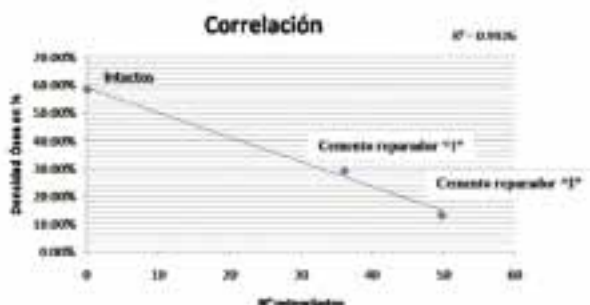


Figura 13. Correlación y recta de regresión lineal entre el número de osteoclastos presentes a 1 día de exposición y el porcentaje de densidad ósea a 15 días de exposición.  $R^2= 0.9926$

Se obtuvieron tres micrografías a 4X y tres a 10X de cada primer molar inferior en la zona de la bifurcación a nivel distal con el programa de captura de imágenes Leica Application Suit (Leica Microsystems AG).

A continuación se describen los resultados:

### Grupo Control negativo “animales intactos”

La morfología de los tejidos se mostró integra, (Fig. 11 A, 12 A) se observaron fibroblastos en el ligamento periodontal así como fibras de colágeno. Con la tinción histoquímica (TRAP) no se encontraron células teñidas de rojo (osteoclastos) en ninguna de las muestras. (Fig. 12 A)

### Grupos 1 Día de exposición

En los tejidos expuestos a ambos materiales y teñidos con H&E, no se observó ensanchamiento del ligamento periodontal, la morfología y densidad ósea se mantuvo normal e igual a la del grupo control, se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación. (Fig. 11 B)

Con la tinción histoquímica (TRAP) se observó diferente número de células osteoclasticas en el tejido óseo por debajo de la cresta, dependiendo del material utilizado para el sellado de la perforación. (Fig. 12 B, C)

### Grupos de 15 días de exposición

Se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación. La morfología y densidad ósea se encontraron alteradas independientemente del cemento utilizado. (Fig. 11 C)

Para la histomorfometría, cada micrografía se exportó al programa Image Pro-plus (Media Cybernetics). Con la herramienta de trazado de áreas se realizaron en ciego 3 mediciones del área total de la cresta ósea por debajo de la furca y del área total de tejido duro mineralizado.



Los resultados se reportan en porcentaje de densidad ósea obteniendo los siguientes resultados. (Tabla. 1)

Tabla 1. Porcentaje de densidad ósea en cada grupo a los dos tiempos expuestos (medias y desviaciones estándar)

Densidad ósea	Intactos	Cemento "Reparador 1"	Cemento "Reparador 2"
1 día	54.1% ± 5.3%	51.3% ± 3.8%	57.8% ± 4.6%
15 días	58.3% ± 4.9%	29.0% ± 4.2%*	13.2% ± 7.5%*

\*Existe diferencia estadísticamente significativa al comparar la densidad ósea de los tejidos expuestos a los cementos durante 15 días tanto con los controles "intactos" como entre ellos mismos a 1 día (t de student, nivel de significancia P 0.05)

En las micrografías teñidas con TRAP se identificó y contó el número de osteoclastos presentes dentro de un área previamente medida. (Tabla. 2)

Tabla 2. Área total de cresta ósea y número total de osteoclastos presente por cada 25,000 um<sup>2</sup>. (Medias y desviaciones estándar)

Trap	Área total en micrometros	Nº Osteoclastos en le área total	Nº Osteoclastos en 25,000 um <sup>2</sup>
Intactos	668,601 ± 69,321	0	0
Cemento "1"	716,693 ± 71,334	36.16 ± 7.01	1.259 ± 0.2067
Cemento "2"	639,563 ± 49,303	49.83 ± 3.71	1.958 ± 0.2130

Se correlacionaron el número de osteoclastos presentes a 1 día de exposición y la densidad ósea a 15 días. Los resultados mostraron una menor densidad ósea cuando la cantidad de osteoclastos fue mayor. (Fig. 13)

## Discusión

En el área odontológica son pocos los modelos experimentales desarrollados para la evaluación de biocompatibilidad de materiales de uso endodóntico.

*El propósito del presente trabajo fue:* desarrollar, estandarizar y evaluar un modelo experimental para el estudio de cementos

endodónticos, debido a que los modelos experimentales existentes no son adecuados pues:

1.- Evalúan los materiales en tejidos distintos para donde son diseñados.(14,18,19)

2.- Son realizados en animales con características anatómicas, histológicas y fisiológicas distintas al humano.(10,20,21)

3.- Son realizados en animales en donde la experimentación ya no es bien vista (implicaciones éticas). (22,23)

4.- Utilizan procedimientos quirúrgicos para implantar los materiales lo que aleja al modelo de la realidad clínica. (24,25)

5.- Son realizados en tejidos completamente sanos donde la respuesta puede ser favorable.(14,18,19)

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 las del humano. Se acepta su uso como modelo experimental y existe suficiente información acerca de sus características. (11,26,27) 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 cavidad bucal, 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 ha sido mencionado como imposible por otros autores (28). 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 expe-

rimental 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.

Los tejidos utilizados pueden ser analizados de diferentes formas y con diferentes métodos, los aquí mostrados son funcionales y permiten evaluar diferentes respuestas dependiendo de la composición química de los materiales y en el caso de los cementos selladores también dependiendo de la cantidad implantada.

Durante los ensayos para evaluar el comportamiento del modelo se utilizaron tiempos experimentales muy cortos, 1 y 15 días de exposición a los materiales, sin embargo es necesario el estudio de la respuesta a largo plazo, este modelo es factible, por lo que ya se están realizando en períodos más prolongados.

## **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.

## **Agradecimientos**

---

A la Unidad de Servicios Auxiliares para el Diagnostico (USAD) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UMSNH, a su Coordinador el MVZ Adrián Sánchez Orozco y al MVZ Martin Bravo García. Por las facilidades y experiencias brindadas durante la realización de este trabajo.

## Referencias bibliográficas

1. International Standard Organisation. ISO 7405 Dentistry - Preclinical Evaluation of Biocompatibility of Medical Devices Used in Dentistry - Test Methods for Dental Material. Geneva: International Standard Organisation; 1997.
2. Wataha JC, Hanks CT, Sun Z. Effect of cell line on *in vitro* metal ion cytotoxicity. *Dent Mater*.1994;10:156-61.
3. Schimandle JH, Boden SD. Spine update the use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*.1994;19:1998-2006.
4. Liebschner MAK. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone. *Biomaterials*. 2004;25:1697-714.
5. Egermann M, Goldhahn J, Schneider E. Animal models for fracture treatment in osteoporosis. *Osteoporos Int*.2005;16:129-138.
6. 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.
7. Wang X, Mabrey JD, Agrawal CM. An interspecies comparison of bone fracture properties. *Biomed Mater Eng*. 1998;8:1-9.
8. Turner AS. Animal models of osteoporosis—necessity and limitations. *Eur Cell Mater*.2001;1:66-81.
9. Hedrich HJ. History, strains and modelas. In: Krinke GJ, The laboratory rat, Academic Press, 2000:3-16.
10. Dammaschke T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim*. 2010;44:1-6.
11. Weinberg MA, Bral M. Laboratory animal models in periodontology. *J Clin Periodontol*.1999;26:335-40.
12. Stashenko P, Wang C-Y, Tani-Ishii N, Yu SM. Pathogenesis of induced rat periapical lesions. *Oral surgery, oral Med oral Pathol*. 1994;78:494-502.
13. Stashenko P, Yu SM. T Helper and T Suppressor Cell Reversal During the Development of Induced Rat Periapical Lesions. *J Dent Res*.1989;1;68:830-4.
14. Moretton TR, Brown CE, 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.
15. Stashenko P, Yu SM, Wang C-Y. Kinetics of immune cell and bone resorptive responses to endodontic infections. *J Endod*.1992;18:422-6.
16. Bouillaguet S, Wataha JC, Tay FR, Brackett MG, Lockwood PE. Initial *in vitro* biological response to contemporary endodontic sealers. *J Endod*. 2006;32:989-92.
17. Lodien G, Morisbak E, Bruzell E, Ørstavik D. Toxicity evaluation of root canal sealers *in vitro*. *Int Endod J*. 2008;41:72-7.
18. De Campos-Pinto MMD, de Oliveira DA, Versiani MA, Silva-Sousa YTC, de Sousa-Neto MD, da Cruz Perez DE. Assessment of the biocompatibility of Epiphany root canal sealer in rat subcutaneous tissues. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2008;105:77-81.
19. Garcia L da FR, Marques AAF, Roselino L de MR, Pires-de-Souza F de CP, Conzani S. Biocompatibility Evaluation of Epiphany/Resilon Root Canal Filling System in Subcutaneous Tissue of Rats. *J Endod*. 2010;36:110-4.
20. Leonardo MR, Flores DSH, de Paula e Silva FWG, de Toledo Leonardo R, da Silva LAB. A Comparison Study of Periapical Repair in Dogs' Teeth Using RoekoSeal and AH Plus Root Canal Sealers: A Histopathological Evaluation. *J Endod*.2008;34:822-5.
21. Sela J, Tamari I, Hirschfeld Z, Bab I. Transmission electron microscopy of reparative dentin in rat molar pulps. *Cells Tissues Organs*.1981;109:247-51.
22. Ørstavik D, Mjör IA. Usage test of four endodontic sealers in Macaca fascicularis monkeys. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*.1992 ;73:337-44.
23. Holland R, de Souza V, Nery MJ, Otoboni Filho JA, Bernabé PFE, Dezan Jr E. Reaction of dogs teeth to root canal filling with mineral trioxide aggregate or a glass ionomer sealer. *J Endod*. 1999;25:728-30.
24. 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;30:176-82.
25. 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;25:38-42.
26. Rigalli A, Di Loreto V. Experimental surgical models in the laboratory rat. CRC Press; 2010.
27. Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL. The Laboratory Rat. 2005.
28. Dammaschke T, Schneider U, Stratmann U, Yoo J-M, Schäfer E. Effect of root canal dressings on the regeneration of inflamed periapical tissue. *Acta Odontol Scand*. 2005;63:143-52.