



**UNIVERSIDAD MICHOACANA  
DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO**

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO CUEPI

ESPECIALIDAD EN ENDODONCIA

**TESIS**

**“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”**

PRESENTA:

**C.D. ANJA ARROYO CAMPOS**

**ESPECIALISTA EN ENDODONCIA**

ASESOR DE TESIS:

CIRUJANO DENTISTA ESPECIALISTA EN ENDODONCIA Adriana Lucía Arenas Pérez

COASESOR DE TESIS: M.C. Rubén Abraham Domínguez Pérez

ASESORES EXTERNOS: D.C. Graciela Ma. E. Letechipia Vallejo

M.C. Manuel López Rodríguez

D.C. Alfredo Rigalli

MORELIA, MICHOACÁN, MÉXICO. Febrero 2014

## **INDICE**

Agradecimientos.....	2
Resumen.....	3
Abstract.....	4
Introducción.....	5
Antecedentes.....	13
Planteamiento del problema.....	15
Justificación.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivos.....	16
Materiales y Métodos.....	17
Análisis estadístico.....	33
Resultados.....	34
Discusión.....	42
Conclusión.....	45
Anexos.....	46
Bibliografía.....	50

## **AGRADECIMIENTOS**

A DIOS

A mi familia y amigos

A mis profesores

A mis asesores

A mis peluditos que ahora trascienden a la historia

## **RESUMEN**

**Introducción:** Diversos investigadores han modificado la composición química del polvo de MTA o substituido el líquido con el que se mezcla en busca de mejorar sus propiedades físicas, químicas y biológicas, uno de los aditivos más recientemente propuestos es el fluoruro de sodio. Es bien sabido que el fluoruro de sodio posee buena actividad biológica en el hueso/osteoblastos y células pulpares, por lo cual ha surgido la idea de que se puede introducir en la formulación de cementos de silicato de calcio para mejorar aspectos de comportamiento biológico.

**Objetivos:** Evaluar en un modelo experimental en rata la respuesta biológica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca selladas con MTA Ángelus adicionado con fluoruro de sodio (MTA-F) y compararla con la mostrada al sellar con MTA Ángelus sin aditivos y ZOE.

**Material y Métodos:** Se utilizaron ratas Wistar a las que se perforo furca en los primeros molares mandibulares, seguido del sellado con MTA, MTA-F y ZOE. La respuesta biológica fue evaluada en cortes histológicos longitudinales teñidos con H&E y por técnica histoquímica TRAP, mediante la cuantificación de osteoclastos a 1 día de exposición y la densidad ósea medida a 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 en los de 15 días. Sin embargo no existieron diferencias estadísticamente significativas ( $P > 0.05.$ ) en la densidad ósea entre los grupos MTA y MTA-F a 1 día ni a 15 días de exposición. Existió una correlación ( $R^2 = 0.9869$ ) entre la actividad de los osteoclastos a 1 día de exposición y el porcentaje de la densidad ósea a los 15 días.

**Conclusión:** La adición de fluoruro de sodio al 1% en peso no representó ninguna mejoría significativa en el comportamiento biológico de los tejidos expuestos, es necesario el dopaje del MTA con fluoruro de sodio y no solo su adición en busca de mejores resultados.

PALABRAS CLAVE: Perforación en furca, MTA, Fluoruro de Sodio

## **ABSTRACT**

introduction: Several researchers have modified the chemical composition of the MTA replaced the liquid with which it is mixed, in an attempt to improve their physical, chemical and biological properties , one of the recently proposed additive is sodium fluoride . It is well known that sodium fluoride has good biological activity in bone / osteoblasts and pulp cells , for which there has been the idea that it can enter in the formulation of cement calcium silicate to improve aspects of biological behavior.

Objectives : To evaluate in an experimental rat model the biological response of adjacent furcation perforations sealed with MTA Angelus added sodium fluoride (MTA -F) and compared with that shown by sealing with MTA Angelus without additives and ZOE bone tissue.

Material and Methods: Wistar rats were drilled furca in mandibular first molars , followed by sealing with MTA , MTA -F and ZOE were used. Biological response was assessed in stained histological sections lengthwise H & E and TRAP histochemical technique by quantifying osteoclast within 1 day of exposure and bone density measured at 15 days.

Results: There were statistically significant differences (  $P < 0.01$  ). Between bone density of the groups exposed to MTA and intact , also among those exposed to MTA and exposed to ZOE (  $P < 0.01$  . ) , Both results 1 day and at 15 days . However there were no statistically significant differences (  $P > 0.05$  . ) In bone density between the MTA and MTA -F groups at 1 day and 15 days of exposure. There was a correlation (  $R^2 = 0.9869$  ) between the activity of osteoclasts at 1 day of exposure and percentage of bone density at 15 days .

Conclusion: The addition of sodium fluoride to 1 wt% did not represent any significant improvement in the biological behavior of the exposed tissues, MTA doping with sodium fluoride and its addition not only to find better results is necessary.

KEYWORDS: Furca perforation, MTA, Sodium Fluoride

## **INTRODUCCIÓN**

El objetivo de la endodoncia es el estudio de la estructura, morfología, fisiología y patología de la pulpa dental y los tejidos perirradiculares. En su ámbito integra las ciencias básicas y clínicas que se ocupan de la biología de la pulpa, así como la etiopatogenia, el diagnóstico, la prevención y el tratamiento de las enfermedades y lesiones de las mismas y de los tejidos perirradiculares asociados.<sup>1</sup> Existen errores de procedimiento que se pueden presentar durante la instrumentación de los conductos radiculares, los cuales, pueden favorecer el fracaso del tratamiento de conductos, entre estos podemos mencionar; la fractura de instrumentos, los bloqueos del conducto, la formación de escalones, las transportaciones y las perforaciones. Cada uno de estos errores debe corregirse de manera oportuna y adecuada. Las perforaciones son las complicaciones de la endodoncia y de los tratamientos restaurativos que se definen como: Comunicaciones patológicas (por defectos de reabsorción y caries dental) ó iatrogénicas (durante y después del tratamiento endodóntico) entre el espacio del conducto radicular y el aparato de sostén. Independientemente de la causa, una perforación constituye una invasión de las estructuras de sostén que, si bien inicialmente provoca tan solo la aparición de inflamación con pérdida de la inserción, finalmente puede poner en peligro al diente.<sup>2</sup>

El resultado es una inflamación crónica del periodonto que se caracteriza por la formación de tejido de granulación. El pronóstico puede ser cuestionable si el tratamiento involucra una lesión en la furca de la raíz. Y también dependerá de la localización, el tamaño y el tiempo de contaminación de la lesión.<sup>2</sup> Los dos principales retos a los que un odontólogo se enfrenta cuando intenta reparar una perforación son lograr la hemostasia y la colocación controlada de un material de restauración.<sup>3</sup> Existen aspectos importantes que influyen sobre la reparación de las perforaciones. Los hallazgos de las investigaciones de Kim,<sup>4</sup> Sottosanti,<sup>5</sup> y Blumenthal,<sup>6</sup> se mencionan en el libro Vías de la pulpa<sup>3</sup> como “Las cuatro dimensiones de una perforación”, Las cuales ocurren siempre en combinación, lo que complica de forma sinérgica los resultados del tratamiento.

Estas dimensiones son el nivel, la localización, el tamaño y el tiempo. En relación al **Nivel** las perforaciones pueden aparecer en los tercios radiculares coronal, medio y apical. En las perforaciones de la bifurcación, las consideraciones son similares a las del tercio coronal. Las perforaciones ocurridas a este nivel amenazan la inserción en el surco e implican problemas de tratamiento distintos a las perforaciones más apicales, “Cuánto más apical es una perforación, mejor es su pronóstico. **Localización**, las perforaciones ocurren circunferencialmente en las caras de las raíces bucal, lingual, mesial y distal. Cuando se selecciona un tratamiento no quirúrgico la localización no es tan importante, sin embargo, en el caso de seleccionar un tratamiento quirúrgico la localización de la perforación es fundamental. **Tamaño**, modifica la capacidad del odontólogo para que éste pueda establecer un sellado hermético. En este apartado se dice que “el área de una perforación circular puede describirse matemáticamente como  $\pi r^2$ ”, por lo tanto se menciona que si con una fresa o con otro instrumento se duplica el tamaño de una perforación, la superficie a sellar aumentará 4 veces. **Tiempo**, Cohen en el año 2001<sup>3</sup> señala que diversos investigadores como Kim,<sup>4</sup> Sottosanti<sup>5</sup> y Blumenthal<sup>6</sup> recomiendan sellar la perforación lo más pronto posible para evitar una mayor pérdida de sostén y evitar la destrucción de la cresta gingival independientemente de la etiología de la perforación.<sup>4,5,6</sup>

En base a las características de las perforaciones en furca, estas pueden manejarse de una forma quirúrgica o no quirúrgica. El pronóstico generalmente es excelente si el problema es bien diagnosticado y la perforación es debidamente tratada.<sup>3</sup>

La amalgama, super EBA, cavit, ionomero de vidrio, resina fotocurable, hidróxido del calcio y el Mineral Trióxido Agregado (MTA) han sido utilizados con diferentes grados de éxito para la reparación de perforaciones en furca. Muchos estudios han utilizado MTA, el cual ha demostrado tener una excelente biocompatibilidad al reparar las perforaciones en furca. Sin embargo, su largo tiempo de trabajo, dificultad de manejo y su alto costo son algunas desventajas de este material.<sup>7</sup>

El MTA ha tenido buenos resultados cuando se aplica en cirugía apical,<sup>8</sup> recubrimiento pulpar directo,<sup>9</sup> en procedimientos de apicoformación,<sup>10</sup> en reparación de perforaciones laterales radiculares<sup>11</sup> y perforaciones radiculares en furca.<sup>12</sup>

Ha sido recomendado también para la pulpotomía, material de obturación para el tratamiento de conductos,<sup>13</sup> reabsorciones radiculares,<sup>14</sup> así como, para la formación de una barrera apical en piezas dentales con pulpa necrótica y ápice abierto.<sup>15</sup>

Este material fue desarrollado por los doctores; Seung-Jong Lee, Mehdi Monsef, y Mahmoud Torabinejad, en el año de 1993, en la Universidad de Loma Linda California y recibió su aprobación por U.S. Food and Drug Administration en 1998.<sup>16</sup> Según Torabinejad y sus colaboradores, las principales moléculas presentes en el MTA gris (Loma Linda University, Loma Linda CA) son los iones de calcio y fosfato. Como estos iones también son los principales componentes de los tejidos dentarios, le proporcionan al MTA excelente biocompatibilidad cuando está en contacto con las células y los tejidos. Los análisis realizados demostraron que el MTA después de su endurecimiento, se constituye de óxido de calcio (CaO) en forma de pequeños cristales y de fosfato de calcio con una estructura amorfa con apariencia granular. La composición promedio de los prismas es: 87% de calcio, 2,47% de sílice y el resto es de oxígeno, mientras que las áreas de la estructura amorfa contienen 33% de calcio, 49% de fosfato, 2% de carbono, 35% de cloruro y 6% de sílice. Los principales componentes presentes en este material son el silicato tricálcico ( $3\text{CaO-SiO}_2$ ), aluminato tricálcico ( $3\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ ), óxido tricálcico y óxido de silicato.<sup>17</sup> Mediante ensayos químicos y de difracción de rayos X, Herzog-Flores. y sus colaboradores en el año 2005, analizaron la composición físico-química del MTA gris (Loma Linda University, Loma Linda CA), mostrando que el 18% es insoluble en agua, el 0,36% correspondería al MgO y el 90% de CaO, siendo el 80% de su estructura cristalina.<sup>18</sup>

El ProRoot® MTA (Dentsply Tulsa Dental, Tulsa, OK), se observa como un polvo gris, compuesto principalmente por un 75% de silicato tricálcico ( $3\text{CaO-SiO}_2$ ), silicato dicálcico ( $2\text{CaO-SiO}_2$ ), aluminato tricálcico ( $3\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$ ), ferroaluminato tetracálcico ( $4\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) respectivamente, así como un 20% de óxido de bismuto ( $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ), principal responsable de la radiopacidad del material y 5% de sulfato de calcio dihidratado ( $\text{CaSO}_4\text{-2H}_2\text{O}$ ).<sup>17</sup> Según el fabricante, puede contener también hasta el 0,6% de residuos insolubles libres como el sílice cristalino y otros elementos libres como el óxido de calcio (CaO), y el óxido de magnesio (MgO),

además de álcalis ( $\text{Na}_2\text{O}$  y  $\text{K}_2\text{O}$ ) bajo la forma de sulfatos.<sup>19</sup> De acuerdo con el fabricante, el MTA Angelus® (Angelus Soluções Odontológicas, Londrina, Brazil) en su presentación blanca y gris, contiene en su composición óxido de silicio ( $\text{SiO}_2$ ), óxido de potasio ( $\text{K}_2\text{O}$ ), óxido de aluminio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), óxido de sodio ( $\text{Na}_2\text{O}$ ), óxido de hierro ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ),  $\text{Bi}_2\text{O}_3$ ,  $\text{MgO}$  y residuos insolubles de sílice cristalina,  $\text{CaO}$  y sulfatos de potasio y sodio. No posee en su fórmula  $\text{CaSO}_4$ , con la finalidad de reducir el tiempo de gelificación, el cual ocurre en 10 minutos. Cuando no se coloca este componente, se forma hidrato de aluminato espático, que no forma puente entre las partículas de cemento, lo que produce un rápido endurecimiento.<sup>20</sup> El CPMTM (Egeo S.R.L., Buenos Aires, Argentina) es también un MTA para uso clínico, similar al MTA. El polvo también está compuesto por finas partículas hidrofílicas que forman un gel coloidal en presencia de humedad y solidifica a una estructura dura en 1 hora. Los principales componentes son el silicato tricálcico  $3\text{CaO-SiO}_2$ , aluminato tricálcico  $3\text{CaO-Al}_2\text{O}_3$  y el óxido tricálcico.<sup>21</sup> Recientemente, el MTA blanco se ha desarrollado y comercializado para sustituir el MTA gris cuando existe un compromiso estético, debido a que la presentación gris era propenso a pigmentar la estructura dentaria, por lo que en su contenido se observa una reducción significativa en la proporción del componente ferroaluminato tetracálcico  $4\text{CaO-Al}_2\text{O}_3\text{-Fe}_2\text{O}_3$ .<sup>22</sup>

El polvo del MTA consiste en finas partículas hidrofílicas que endurecen en presencia de agua. La hidratación del polvo permite la formación de un gel coloidal el cual se solidifica después en una estructura dura en aproximadamente 4 horas. Las características del agregado dependen del tamaño de las partículas,

la proporción polvo – líquido, la temperatura, la presencia de agua y la presencia de aire atrapado.<sup>23</sup>

Históricamente, el avance técnico y 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 debe ser sometidos a una serie de pruebas antes de que puedan justificar su empleo inocuo en los seres humanos.<sup>24,25</sup>

Como recomendación de la Asociación Americana de Endodoncia, el uso de nuevos materiales y métodos de tratamiento deben estar basados en estudios de laboratorio, biológicos y clínicos.<sup>26</sup> De acuerdo al grado de contacto que tiene el material de uso odontológico con el organismo, su alteración en el tejido será directa o indirecta, lo que permite clasificarlos en 5 grupos:

**Tipo 1:**

Materiales que pueden entrar en contacto con otras cavidades del cuerpo que no sean la cavidad bucal.

**Tipo 2:**

Materiales que entran en contacto con las mucosas de la cavidad oral.

**Tipo 3:**

Materiales que afectan la pulpa dental o los tejidos adyacentes.

**Tipo 4:**

Materiales para la obturación de conductos radiculares.

**Tipo 5:**

Materiales que pueden afectar el tejido duro del diente.<sup>24</sup>

En 1974, Autian J. Presentó un programa de evaluación para materiales dentales incluyendo tres variedades de exámenes,<sup>27</sup> los cuales mas tarde fueron refinados por Langeland K. y sus colaboradores en 1980.<sup>28</sup> Esto permitió la publicación de la norma ISO 7405 para odontología, que trata la evaluación preclínica de biocompatibilidad de los dispositivos médicos utilizados en odontología y específicamente los métodos de evaluación para los materiales dentales propuestos en 1997.<sup>29</sup> Posteriormente en el 2005 Gangler P. propuso un modelo de tres etapas para evaluar los materiales dentales con el objetivo de probar su biocompatibilidad.<sup>30</sup>

1. Pruebas de detección de toxicidad inespecífica (evaluación de citotoxicidad en líneas celulares; pruebas para evaluar la inhibición de crecimiento de microorganismos, pruebas de genotoxicidad; mutagenicidad y carcinogenicidad en bacterias; pruebas de toxicidad sistémica por ingestión oral o por inhalación en ratones y ratas; evaluación de sensibilidad e irritación de piel en ratones y ratas).

2. Pruebas de uso para la toxicidad específica en animales de experimentación como: ratas, cerdos y monos (implantación en tejidos blandos y hueso; pruebas histopatológicas)
3. Estudios clínicos controlados en humanos.<sup>30</sup>

### **Pruebas *in vitro*** (primera etapa)

Se realizan con el material o un extracto de este que se pone en contacto (exposición) con algún sistema biológico.<sup>31</sup> En estas pruebas se puede determinar la muerte o el crecimiento celular, la función celular y, en algunos casos, se puede evaluar la integridad del material genético de la célula.<sup>32,24</sup> 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 sólo una parte de las que pueden presentarse *in vivo*.<sup>33</sup> Es aceptado que las pruebas *in vitro* sean utilizadas como una primera etapa de prueba para evaluar la toxicidad y citocompatibilidad, de modo que, se evite el uso innecesario de los animales al realizar pruebas de materiales citológicamente inapropiados.<sup>34,35</sup> El término biocompatibilidad es frecuentemente utilizado de forma incorrecta con pruebas *in vitro*, la palabra biocompatibilidad sólo puede ser utilizada en caso de animales ó humanos (*in vivo*), siendo el término correcto citocompatibilidad para pruebas *in vitro*.<sup>35</sup>

Las pruebas *in vitro*<sup>36</sup> nos proporcionan información acerca de la citotoxicidad, genotoxicidad, proliferación y diferenciación celular.<sup>37</sup> Estos estudios son útiles para probar la calidad de nuevos materiales y determinar si estos liberan compuestos potencialmente nocivos, incorporados durante el proceso de fabricación.<sup>36</sup> Sin embargo, la caracterización de estas pruebas no es adecuada para demostrar la respuesta de los tejidos a los materiales, únicamente permite observar la respuesta de líneas celulares o células primarias que se han tomado de animales. Además, la respuesta celular como en el caso de la citotoxicidad debido a la presencia de iones metálicos puede variar entre las líneas celulares.<sup>38</sup>

También pueden sobreestimar el nivel de toxicidad de un material y están limitados a estudios de toxicidad aguda debido a la vida relativamente corta de los cultivos celulares.<sup>36</sup> Estos cultivos mantienen pequeños fragmentos de tejido, sin embargo, no necesariamente preservan su arquitectura. Los cultivos de órganos en este mismo medio, mantienen tejidos u órganos (en parte o completos) lo cual puede permitir alguna diferenciación y preservación de su arquitectura y función tomando en cuenta que los factores sistémicos estarán ausentes, debido a la falta de vascularización los nutrientes y el suplemento de oxígeno están limitados, no existe forma de eliminar los desechos por lo cual este tipo de modelos están limitados a diferencia de los *in vivo*. Las células *in vitro* pueden sufrir cambios fenotípicos, lo cual puede deberse a la disociación de células desde su geometría tridimensional y/o al crecimiento en una superficie bidimensional.<sup>34</sup> Las propiedades dinámicas de un cultivo celular son difíciles de controlar y es complicado crear las interacciones apropiadas que se encuentran *in vivo*.<sup>39</sup>

#### **Pruebas *in vivo*** (segunda etapa)

Por todo lo anterior, los modelos animales son esenciales para evaluar la biocompatibilidad, la respuesta tisular y la función mecánica para un material ortopédico o un material dental antes de su uso clínico en humanos. Estos modelos permiten la evaluación de materiales a través de largos períodos de tiempo, en diferentes tipos de tejido y en animales de distintas edades.<sup>40</sup>

A pesar de que los modelos animales pueden ser buenos para representar una situación clínica humana de forma mecánica y fisiológica.

Debe tenerse siempre presente que es solo una aproximación y que cada modelo animal tendrá ventajas y desventajas.<sup>34</sup>

Existen muchos factores que deben ser considerados cuando se decide sobre un modelo animal en particular. La pregunta de investigación debe ser definida previamente para dirigir de manera adecuada la selección de la especie animal que será utilizada en el estudio.<sup>34</sup>

De acuerdo a Schimandle<sup>41</sup> los factores que determinan la selección animal son los siguientes: Costo de adquisición y cuidado de los animales, disponibilidad, aceptación de la sociedad, tolerancia al cautiverio y facilidad de alojamiento.<sup>41</sup> Otros factores incluyen el bajo costo de mantenimiento, facilidad de manejo, resistencia a las infecciones y enfermedades, características biológicas análogas a los humanos, tolerancia a las cirugías y base de datos existente sobre la información biológica de la especie.<sup>34</sup> Los animales de mayor uso por su similitud con el organismo humano en cuanto a respuesta de tejidos son los ratones, las ratas, los hámsteres, los hurones y los conejos. También se han utilizado ovejas, monos, bovinos, cerdos, perros y gatos.<sup>24</sup> La prueba más utilizada para evaluar biocompatibilidad de materiales dentales es la implantación en tejido subcutáneo en roedores, la cual se emplea con frecuencia para evaluar materiales dentales de uso en la terapia pulpar o la obturación radicular. Los materiales nuevos y los materiales modificados deben ser evaluados y re-evaluados para establecer su biocompatibilidad. El propósito de este proceso de evaluación es verificar la seguridad de los materiales para poder colocarlos en humanos.<sup>42</sup>

#### **Pruebas de uso (tercera etapa)**

Estas pruebas son realizadas en animales y en seres humanos. En estos últimos, dichos estudios se denominan “ensayos clínicos” y son los que proporcionan mayor y real evidencia científica. Las desventajas de estos son su complejidad (dificultad en términos de control experimental e interpretación, sometimiento al comité de ética y marco legal). En animales como la rata la organización internacional de estandarización (ISO 7405) no considera adecuados los tejidos dentales y periodontales para ser utilizados como modelo experimental, sin embargo existen más de 70 investigaciones <sup>43-112</sup> que han sido publicadas en revistas arbitradas alrededor del mundo, utilizando molares de rata para evaluar; el recubrimiento pulpar directo, las pulpotomías y las reacciones del tejido después de la exposición pulpar.<sup>42</sup> Uno de los trabajos más importantes y fundamentales sobre la infección bacteriana del tejido pulpar fue realizado hace más de cuarenta años por Kakehashi en molares de rata,<sup>47</sup> mientras que Stanley enfatizó que el uso de molares de rata es un método confiable y un modelo válido para evaluar el recubrimiento pulpar directo.<sup>113</sup>

## **ANTECEDENTES**

Diversos investigadores han modificado la composición química del polvo de MTA, substituido el líquido con el que se hace la mezcla o adicionado al mismo con otros compuestos, todo en busca de mejorar sus propiedades físicas, químicas y biológicas. Sin embargo no se deben olvidar el potencial terapéutico y la ganancia o pérdida de propiedades que puede presentar el material al adicionarlo.<sup>114</sup>

Uno de los aditivos más recientemente propuestos es el fluoruro de sodio. El fluoruro esta naturalmente presente en la corteza terrestre, por lo que se puede encontrar en el agua, aire, plantas y animales. Por lo tanto, los seres humanos están expuestos al flúor a través de alimentos, el agua potable, y el aire que se respira.<sup>115</sup>

El fluoruro de sodio es un elemento esencial necesario para la salud ósea. Sin embargo, puede tener efectos adversos, lo cual no dependerá únicamente de las concentraciones y del tipo de hueso que está expuesto, sino también en la capacidad de absorción, la edad y el estado nutricional del individuo.<sup>116,117</sup>

La investigación del flúor en Odontología tuvo su inicio en 1901, con el odontólogo Frederick McKay, y G. V. Black. Ellos hicieron dos descubrimientos cruciales. El primero, el esmalte moteado (como Black se refería a esta condición), el segundo, que los dientes afectados con fluorosis eran sorprendentemente e inexplicablemente resistentes a las caries.<sup>118</sup>

Numerosos estudios se han centrado en la investigación de las influencias exactas del fluoruro de sodio en las células y tejidos. En general se acepta que el fluoruro de sodio a concentraciones mayores que 1 mM (mili molar) causan la detención del crecimiento y la muerte celular ya sea por necrosis o apoptosis, aunque los efectos fatales del fluoruro de sodio difieren de acuerdo con las concentraciones de exposición y los tipos de células examinadas.<sup>119,123</sup>

La aplicación tópica de fluoruro en otros tejidos duros distintos al esmalte se ha realizado en diversas investigaciones, y actualmente es considerado un elemento capaz de inhibir la reabsorción radicular después del reimplante dentario, el flúor en la superficie de la raíz tiene la capacidad de reforzar su estructura con la formación de fluorapatita, sin embargo, se cree que es tóxico para las células de resorción que actúan en los tejidos duros.<sup>124,127</sup>

Es bien sabido que el fluoruro de sodio posee buena actividad biológica en el hueso/osteoblastos y células pulpares, por lo cual ha surgido la idea de que se puede introducir en la formulación de cementos de silicato de calcio para mejorar aspectos de comportamiento biológico.<sup>128</sup>

Los cementos de silicato de calcio (MTA) adicionados con fluoruro de sodio han sido recientemente diseñados y estudiados encontrando que al agregar fluoruro de sodio al 1% en peso a los polvos de cementos de silicato de calcio se provoca un retraso en el tiempo de fraguado, incrementa su expansión<sup>128</sup> y el sellado apical a largo plazo.<sup>129</sup>

Un incremento en el contenido del 0 al 10% en peso resulta en un aumento de la solubilidad del cemento en agua o en DMEM (“Dulbecco’s modified Eagle médium). Además de formar fluorapatita en soluciones que contienen fosfatos. Son mejores para formar apatita (bioactividad) y son más reactivos que los cementos convencionales de silicato de calcio.<sup>130</sup>

La fluorapatita  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})\text{F}$  es más activa en los osteoblastos y la formación de hueso que la hidroxiapatita  $\text{Ca}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ .<sup>131</sup> Se ha demostrado que la introducción de los fluoruros en la apatita mejora la respuesta osteoblástica en términos de adhesión, diferenciación,<sup>131</sup> proliferación<sup>132,133</sup> y la mineralización,<sup>134</sup> cuando se compara con hidroxiapatita pura. La incorporación de fluorapatita en recubrimientos de implantes mejora la integración del implante al hueso.<sup>135</sup>

El fluoruro de sodio ha sido añadido a cementos óseos para acelerar la formación temprana de hueso en la interfaz y de ese modo mejorar la fijación.<sup>136-138</sup> Incluso se ha concluido que los cementos de silicato adicionados con flúor son materiales prometedores para usar en contacto con hueso, en endodoncia o en cirugía oral.<sup>139</sup>

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Uno de los accidentes posibles durante la práctica endodóntica es la perforación en furca, lo que compromete el éxito del tratamiento, por esta razón es importante conocer las técnicas y materiales que puedan dar solución a estas situaciones. Dentro de los materiales que se utilizan con este fin se encuentran los cementos de silicato de calcio (MTA) los cuales han demostrado una buena bioactividad, sin embargo aun presenta algunos inconvenientes que no lo hacen un material “ideal”, es por esto que resulta importante realizar ensayos experimentales que permitan conocer si la adición de diferentes compuestos puede mejorar distintas características en el material.

## HIPOTESIS

### **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El cemento de silicato de calcio, (MTA Ángelus) adicionado con fluoruro de sodio al 1% presentará mejores características de biocompatibilidad comparado con el MTA Ángelus sin adicionar.

### **HIPÓTESIS NULA**

El cemento de silicato de calcio (MTA Ángelus) adicionado con fluoruro de sodio al 1% no presentará mejores características de biocompatibilidad, comparado con el MTA Ángelus sin adicionar.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar en un modelo experimental en rata la respuesta biológica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca reparadas con MTA Ángelus adicionado con fluoruro de sodio y compararla con la mostrada por el MTA Ángelus sin aditivos y con la mostrada por el ZOE.

## **OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Comparar el porcentaje de la densidad ósea de la cresta bajo la furca de molares expuestos de 1 y 15 días a los cementos; MTA Angelus blanco, MTA Angelus blanco adicionado con fluoruro de sodio y ZOE.
- Comparar el número de osteoclastos presentes en la cresta ósea bajo la bifurcación de molares expuestos 24 horas a los cementos; MTA Angelus blanco, MTA Angelus blanco adicionado con fluoruro de sodio y ZOE.
- Identificar la existencia de una posible correlación entre el número de osteoclastos activos a las 24 horas de exposición a los cementos MTA Angelus blanco, MTA Angelus blanco Adicionado con fluoruro de sodio y ZOE con el porcentaje de la densidad ósea en 15 días posteriores a la exposición.

## **MATERIALES 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 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*.

**GRUPOS Y TRATAMIENTO:** Se asignaron al azar los siguientes grupos.

- GRUPO 1: Intactos (n=3). 1 rata fue sacrificada a las 24 horas y 2 a los 15 días.
- GRUPO 2: Perforación en furca + MTA-F (n=6), animales a los que se les provoco una perforación en furca que fue reparada con cemento MTA adicionado con 1% de fluoruro de sodio. 3 ratas fueron sacrificadas a las 24 horas y las otras 3 a los 15 días.
- GRUPO 3: Perforación en furca + MTA (n=6), animales a los que se les provoco una perforación en furca que fue reparada con cemento MTA. 3 ratas fueron sacrificadas a las 24 horas y las otras 3 a los 15 días.
- GRUPO 4: Perforación en furca + ZOE (n=6), animales a los que se les provoco una perforación en furca que fue reparada con Cemento de oxido de zinc con eugenol ZOE. 3 ratas fueron sacrificadas a las 24 horas y las otras 3 a los 15 días.

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

Los grupos 2 a 4 se dividieron en 2 subgrupos, de manera que la mitad de animales de cada grupo se sacrificó 24 horas posteriores a la colocación de los materiales y la otra mitad a los 15 días. Una vez sacrificados los animales, se procesaron histológicamente las hemimandíbulas y se analizaron los resultados.

Los anestésicos utilizados fueron: clorhidrato de ketamina al 10% marca Anesket y clorhidrato de xilacina al 2% marca Xilapet, ambas de uso veterinario. (Fig.1)



Figura. 1 (fotografía propia)

**METODO**

Los procedimientos se dividieron en tres fases:

- a) Procedimientos en los animales
- b) Procedimientos en las hemimandíbulas
- c) Procedimientos histológicos

## a) PROCEDIMIENTOS EN LOS ANIMALES

### 1.- Técnica anestésica

Los animales se pesaron y se les aplicó vía intraperitoneal una combinación de ketamina (50mg/kg) y xilacina (5mg/kg).(Fig.2)



Figura.2 (fotografía propia)

### 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 (Fig.3).

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 (Fig.4).



Figura. 3 (fotografía propia)



Figura. 4 (fotografía propia)

### **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 (LC Block-Out), misma que se colocó alrededor de las paredes del molar y los bordes de la cavidad en el aditamento (Fig.5).



Figura. 5 (fotografía propia)

### **4.- Procedimiento endodóntico y extrusión del material**

Una vez anestesiado y colocado el animal en la posición de trabajo, se le colocó una gasa húmeda sobre la cabeza para evitar daño por deshidratación ocular durante el procedimiento, se aseguró al animal para que no cayera o cambiara de posición con un sujetador de tela que lo rodeaba sobre su abdomen, se aisló la pieza dental utilizando el dispositivo de acrílico y la resina fluida fotopolimerizable (LC Block-Out,) y 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  $\frac{1}{4}$  hasta encontrar el acceso a los conductos radiculares, posteriormente se realizó una perforación en la pared mesial del conducto distal utilizando una fresa de diamante montada en un dispositivo ultrasónico Varios 350 (Nsk) (Fig.6), 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, el MTA adicionado con fluoruro de sodio se preparo de la misma forma

que el MTA Angelus sin aditivo, se llevaron los materiales a la zona de la perforación con ayuda de un explorador modificado en su punta, se compacto el material con puntas de papel y se obturo la cámara pulpar y la cavidad de acceso con ionómero de vidrio tipo II (Ionomax).

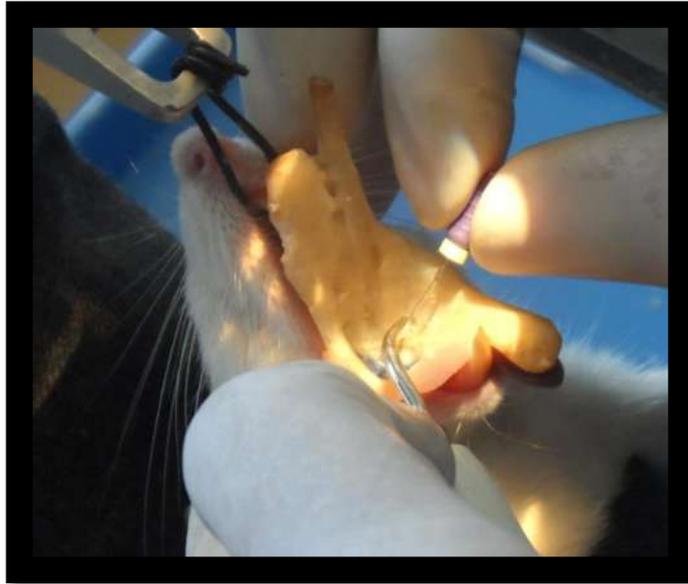


Figura.6 (fotografía propia)

## **5.- Recuperación del animal**

Cada rata fue colocada en una caja limpia sobre una cama térmica y su temperatura fue vigilada y mantenida en 36°C hasta su completo restablecimiento y fue regresado a su caja donde cumplió el tiempo experimental correspondiente.

## **6.- Procedimientos de eutanasia.**

En cuanto los animales cumplieron el tiempo experimental según su grupo, recibieron una sobredosis inhalada de éter y se procedió a la disección de la mandíbula cuando que se verificó la pérdida total de signos vitales.

### **b) PROCEDIMIENTOS EN LAS HEMIMANDIBULAS**

#### **1.- Limpieza y fijación de las hemimandíbulas:**

Ambas hemimandíbulas (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.

## 2.- Obtención de radiografía digital estandarizada

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. (Fig.7)

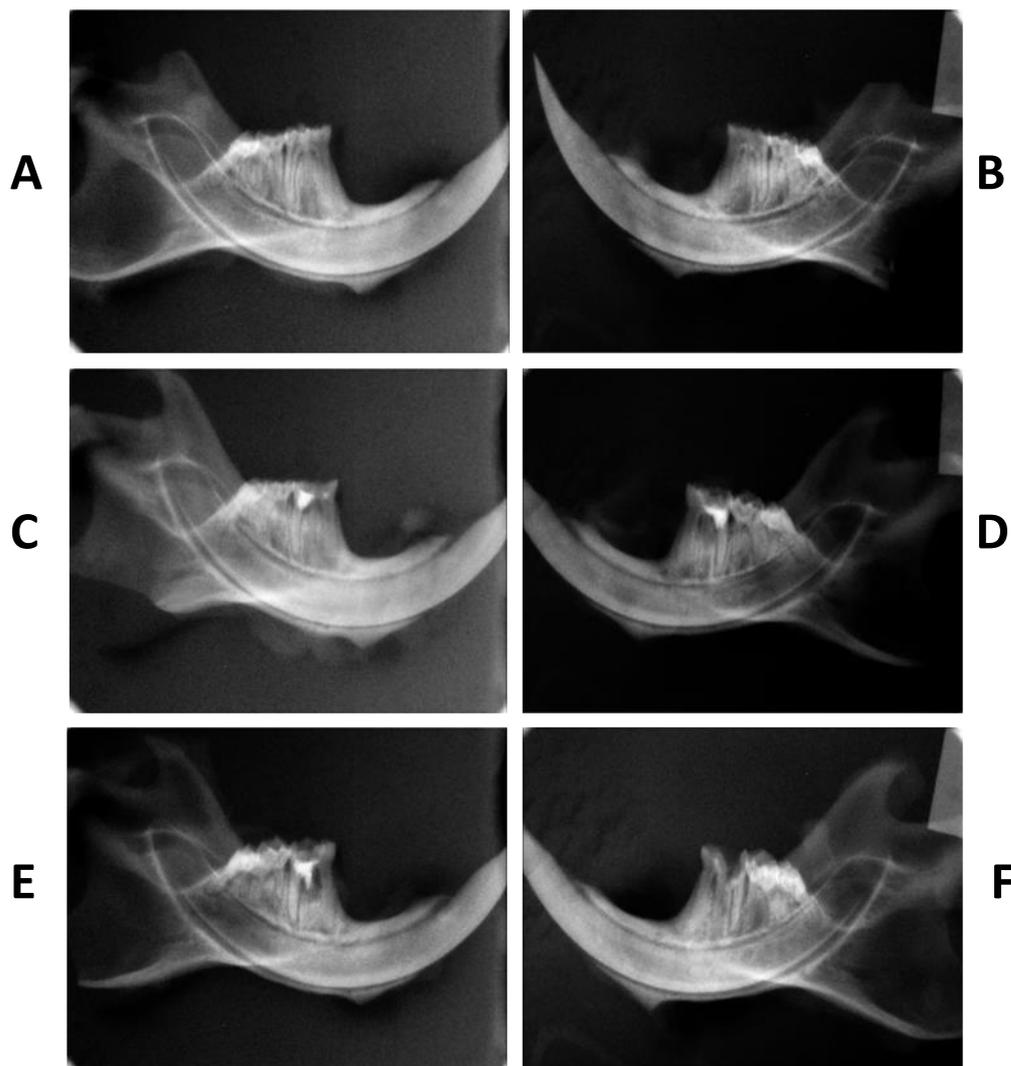


Figura.7 Radiografías representativas de grupos control A y B, de grupos expuestos (incluidos en el análisis) C y D de muestras excluidas (E: mala obturación de la perforación y F: fractura).

### 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.

#### c) PROCEDIMIENTOS HISTOLÓGICOS

##### 1.-Descalcificación

Por tratarse de tejidos calcificados, 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

Una vez concluida y comprobada la descalcificación, se utilizó un procesador de tejidos Microm STP120-1 (Microm International), en donde se colocaron las muestras en casetes prensados para evitar su deformación anatómica durante el proceso (Fig.8). El programa de deshidratación utilizado se muestra en la tabla 1.

Solución	Tiempo (horas)	Solución	Tiempo (horas)
1.-Formol Buferado	1	8.-Alcohol Abs.	2
2.-Alcohol 50%	1	9.-Acetona	1
3.-Alcohol 70%	1	10.-Xilol	4
4.-Alcohol 80%	1	11.-Parafina	4
5.-Alcohol 96%	1	12.-Parafina	4
6.-Alcohol 96%	2	13.-Parafina	4
7.-Alcohol Absoluto	2		

Tabla1. Secuencia de deshidratación



Figura. 8 (fotografía propia)

### 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 del fondo. 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 (Fig.9).



Figura. 9 (fotografía propia)

#### 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 hasta localizar la zona de interés, posterior a esto, todos los cortes se recolectaron de forma seriada hasta acumular 15 laminillas con 5 o 6 cortes cada una (Fig.10).



Figura. 10 (fotografía propia)

#### 5.- Tinción de las muestras

##### **A) Tinción con hematoxilina-eosina:**

Los cortes se tiñeron por el método de hematoxilina – eosina convencional y se fijaron con resina (Entellan) para su posterior observación (Figs.11, 12 y 13).



Figura. 11 (fotografía propia)

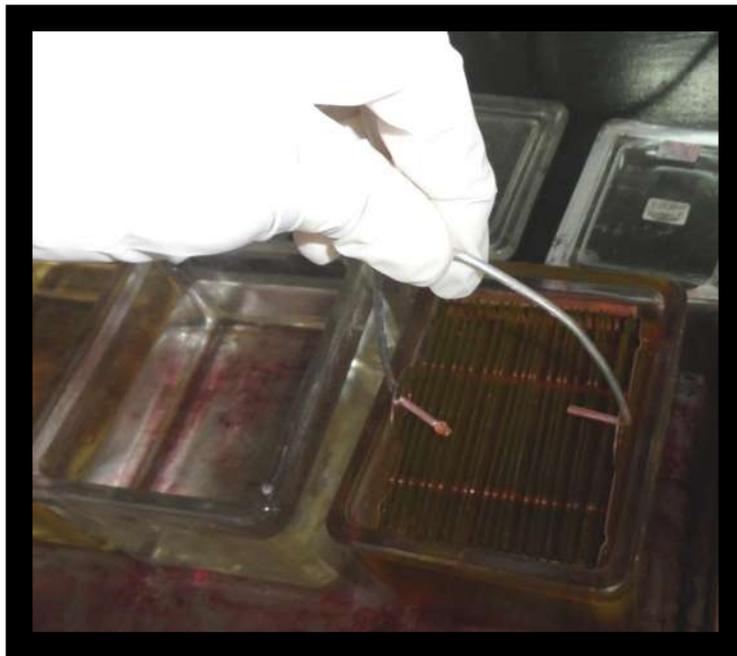


Figura. 12 (fotografía propia)



Figura. 13 (fotografía propia)

**B) Tinción histoquímica TRAP (Fosfatasa ácida tartrato-resistente):**

- 1.- Los cortes se desparafinaron con 3 pases en Xilol de 5 minutos cada uno.
- 2.- Se rehidrataron los cortes comenzando por un pase en alcohol etílico absoluto durante seis minutos, alcohol etílico 95%, alcohol etílico 70% y alcohol etílico 50% tres minutos cada uno, para terminar en agua destilada durante seis minutos.
- 3.- Se Incubaron 7 laminillas por cada 50 ml de buffer de acetato al 0.2M pH 5.0 (Acetato de sodio (0.2M)+ tartrato de sodio dibásico dihidratado (50 mM) + agua destilada) durante 20 minutos a temperatura ambiente.
- 4.- Se transfirieron las laminillas al medio de incubación preparado previamente (búfer de acetato (0.2M) + fosfato de naftol AS-MX (0.5mg/ml) + “Fast red TR salt”) y se incubaron a 37°C durante 60 minutos.
- 5.- Se descartó el medio y se cubrieron las laminillas con agua destilada durante 5 minutos a temperatura ambiente.
- 6.- Se contrastó la tinción TRAP con hematoxilina, para esto se colocaron las lamillas en hematoxilina durante 1 minuto, se realizaron lavados con agua destilada y se cubrieron un minuto más con solución de Scott.
- 7.- Las laminillas fueron montadas con bálsamo de Canadá y se dejaron secar durante 24 horas.

(Figs.14 y 15)



Figura. 14 (fotografía propia)



Figura. 15 (fotografía propia)

### Evaluación histopatológica

Los cortes teñidos con hematoxilina y eosina fueron observados al microscopio (Fig.16) y se seleccionaron 5 cortes para cada subgrupo de manera que se distribuyeron de la siguiente manera:

H&E	MTA	MTA-F	ZOE	CONTROL
1 DIA	5 muestras x 3			
15 DIAS	5 muestras x 3			



Figura. 16 (fotografía propia)

Se obtuvieron 3 microfotografías a 4X y 3 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 mismo que despliega una barra de escala en cada una de las microfotografías y a partir de la cual se realizó la calibración del programa Image-Pro plus con el que se realizaron todas las mediciones. (Fig.17).



Figura. 17 (fotografía propia)

De cada imagen se realizaron en ciego 3 mediciones a diferentes tiempos por el mismo observador: 1.- el área total de la cresta ósea por debajo de la furca, 2.- área total de tejido duro mineralizado. La densidad ósea se calculó multiplicando el área total de tejido mineralizado por 100 y dividiendo el resultado entre el área total de la cresta ósea por debajo de la furca, a partir de considerar que esa área sería la máxima mineralización posible y transformando el valor a porcentaje. (Fig.18)



Figura.18.- Área total de la cresta ósea por debajo de la furca medida y delimitada en azul, área total de tejido mineralizado delimitado medido y delimitado en negro, se restaron las pequeñas áreas no mineralizadas dentro del área mayor.

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---

Los cortes teñidos por la técnica TRAP fueron observados en microscopio y se seleccionaron 4 cortes para cada subgrupo distribuyéndose de la siguiente manera:

TRAP	MTA	MTA-F	ZOE	CONTROL
1 DIA	4 muestras x 3			

Se obtuvieron 3 micrografías a 4X y a 40X con el programa de captura de imágenes Leica Application Suit.

De cada imagen se realizaron en ciego 3 mediciones a diferentes tiempos por el mismo observador: 1.- Se midió el área total de la cresta ósea por debajo de la furca en las imágenes 4X y se contaron en 40X el número de células teñidas de rojo (osteoclastos) presentes dentro del área previamente medida.

## **ANALISIS ESTADISTICO**

Las áreas de tejido periodontal bajo la furca y las áreas de tejido mineralizado registradas en micrómetros cuadrados fueron analizadas con ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey, estableciendo el nivel de significancia en  $P < 0.05$

El número de osteoclastos comprendidos en un área de  $25,000 \mu\text{m}^2$  fueron contados y los resultados fueron analizadas con ANOVA de una vía y prueba post hoc de Tukey, estableciendo un nivel de significancia en  $P < 0.05$

El porcentaje de la densidad ósea obtenida a los 15 días y el número de osteoclastos presentes a 1 día fueron analizadas con la prueba de correlación de Pearson, estableciendo el nivel de significancia en  $P < 0.05$ .

## **RESULTADOS**

### **Resultados Histológicos**

Los datos obtenidos de la evaluación de los cortes histológicos teñidos con H&E y TRAP fueron los siguientes:

#### **Grupo Intactos**

Tanto en el grupo de 1 como en el de 15 días de exposición, la morfología de los tejidos se encontró normal (Fig.19-Intactos), se observó integridad de los tejidos, el ligamento periodontal mostró fibroblastos y fibras colágenas. Se obtuvo un promedio de área total de tejido bajo la furca de  $667,863 \pm 71,554\mu\text{m}^2$  y una área total de tejido mineralizado de  $388,772 \pm 46,877\mu\text{m}^2$ , lo que dió como resultado una densidad ósea de  $58.3\% \pm 4.9\%$ . (Fig.20) Con la tinción histoquímica (TRAP) no se encontraron células teñidas de rojo (osteoclastos) en ninguna de las muestras. (Fig.21- Intactos, Fig. 22.)

#### **Grupos 1 Día de exposición**

##### **Grupo MTA**

No se observó ensanchamiento del ligamento periodontal, la morfología y densidad ósea se mantuvo normal e igual a la de los grupos controles, se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación (Fig. 19-Expuestos 1 día). Se obtuvo un promedio de área total de tejido bajo la furca de  $744,008 \pm 73,415\mu\text{m}^2$  y una área total de tejido mineralizado de  $382,341 \pm 52,361\mu\text{m}^2$ , lo que dió como resultado una densidad ósea de  $51.3\% \pm 3.8\%$ .(Fig. 20). Con la tinción histoquímica (TRAP) se contabilizaron un promedio de  $1.259 \pm 0.206$  células osteoclásticas por cada  $25,000\mu\text{m}^2$  de tejido óseo por debajo de la cresta. (Fig.21- Expuestos, Fig. 22)

### Grupo MTA-F

No se observó ensanchamiento del ligamento periodontal, la morfología y densidad ósea se mantuvo normal e igual a la de los grupos controles, se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación (Fig. 19-Expuestos 1 día). Se obtuvo un promedio de área total de tejido bajo la furca de  $713,553 \pm 101,897\text{um}^2$  y una área total de tejido mineralizado de  $356,628 \pm 47,839\text{um}^2$  lo que dió como resultado una densidad ósea de  $50.4\% \pm 5.9\%$ . (Fig. 20) Con la tinción histoquímica (TRAP) se contabilizaron un promedio de  $1.379 \pm 0.159$  células osteoclasticas por cada  $25,000\text{um}^2$  de tejido óseo por debajo de la cresta. (Fig.21-Expuestos, Fig.22)

### Grupo ZOE

No se observó ensanchamiento del ligamento periodontal, la morfología y densidad ósea se mantuvo normal e igual a la de los grupos controles, se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación (Fig. 19-Expuestos 1 día). Se obtuvo un promedio de área total de tejido bajo la furca de  $716,757 \pm 74,869\text{um}^2$  y una área total de tejido mineralizado de  $412,831 \pm 40,470\text{um}^2$  lo que dió como resultado una densidad ósea de  $57.8\% \pm 4.6\%$  (Fig. 20). Con la tinción histoquímica (TRAP) se contabilizaron un promedio de  $1.958 \pm 0.213$  células osteoclasticas por cada  $25,000\text{um}^2$  de tejido óseo por debajo de la cresta. (Fig.21- Expuestos, Fig.22).

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---

H&E	INTACTOS	MTA 1 DIA	MTA-F 1 DIA	ZOE 1 DIA
<b>AREA TOTAL</b>	667,863 ± 71,554	744,008 ± 73,415.8	713,553 ± 101,897	716,757 ± 74,869
<b>AREA MINERALIZADA</b>	388,772 ± 46,877	382,341 ± 52,361	356,628 ± 47,839	412,831 ± 40,470
<b>DENSIDAD OSEA</b>	58.3% ± 4.9%	51.3% ± 3.8%	50.4% ± 5.9%	57.8% ± 4.6%

Figura 20. Tabla de medias y desviación estándar de cada grupo de expuestos durante 1 día para las áreas medidas en micrómetros cuadrados ( $\mu\text{m}^2$ ) y la densidad ósea obtenida.

TRAP	AREA TOTAL Micrómetros	N° Osteoclastos En el área total	N° de osteoclastos por cada 25,000 $\mu\text{m}^2$
<b>MTA 1 DIA</b>	716,693 ± 71,344	36.16 ± 7.01	1.259 ± 0.2067
<b>MTA-F 1 DIA</b>	667,328 ± 102,343	37.16 ± 8.84	1.379 ± 0.1590
<b>ZOE 1 DIA</b>	639,563 ± 49,303	49.83 ± 3.71	1.958 ± 0.2130
<b>INTACTOS</b>	668,601 ± 69,321	0	0

Figura 22. Tabla de medias y desviaciones estándar de cada grupo de expuestos durante 1 día teñidos por TRAP en donde se muestra el área total de cresta ósea y el número de osteoclastos presentes en esa área correspondiente, en la última columna se muestra el número total de osteoclastos presente por cada 25,000  $\mu\text{m}^2$

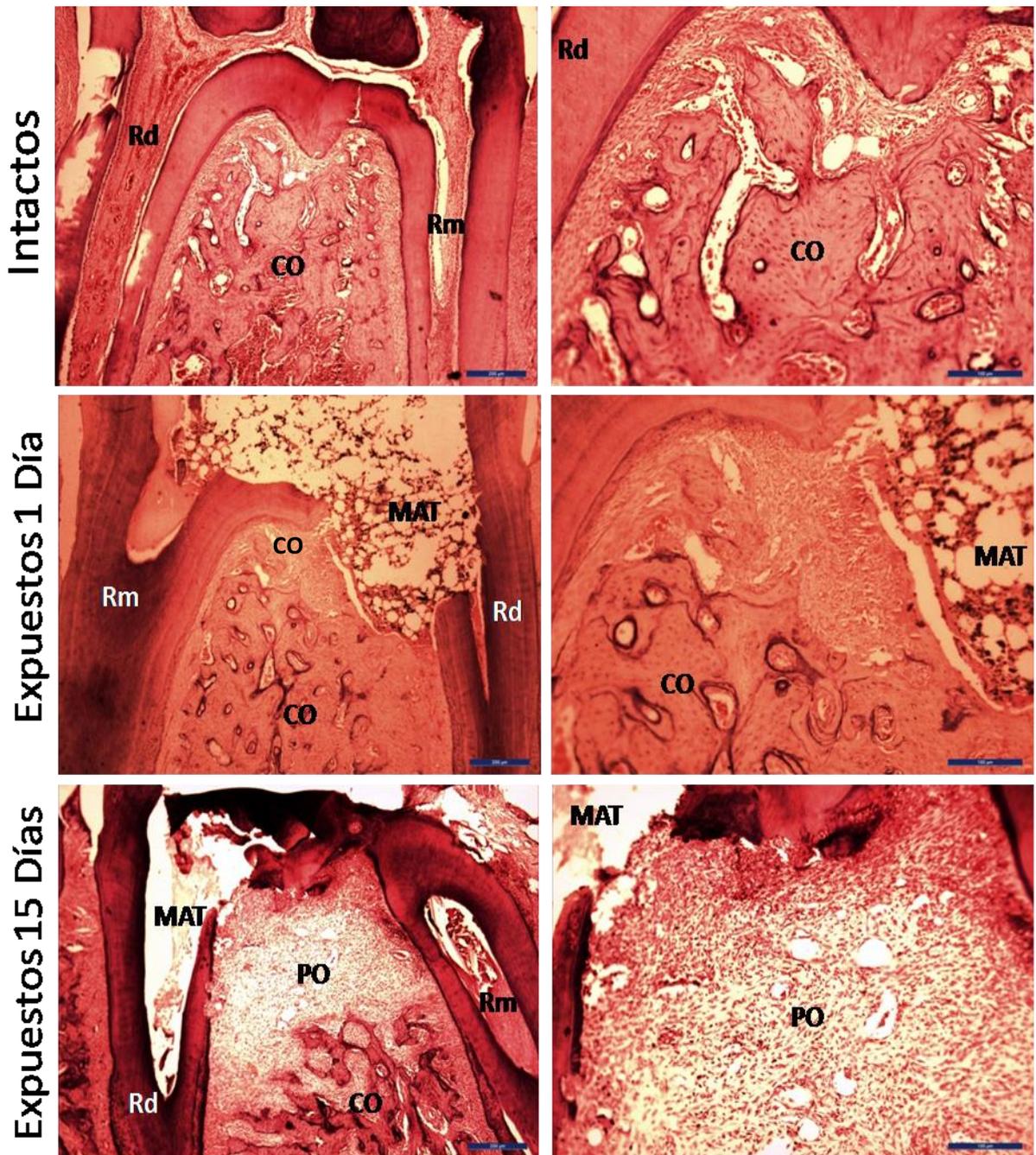


Figura 19. Micrografías de cortes histológicos (H&E) donde se observan las características morfológicas del tejido periapical de los diferentes grupos. Las imágenes en la columna izquierda muestran cortes histológicos a 4X representativos de los grupos expuestos y del intacto realizados longitudinalmente, la columna derecha muestra las mismas imágenes a 10X. CO: Cresta Ósea, Rd: Raíz distal, Rm: Raíz mesial, MAT: Material (cemento utilizado), PO: Perdida Ósea. Nótese en fila Expuestos 15 días, la destrucción del trabeculado óseo.

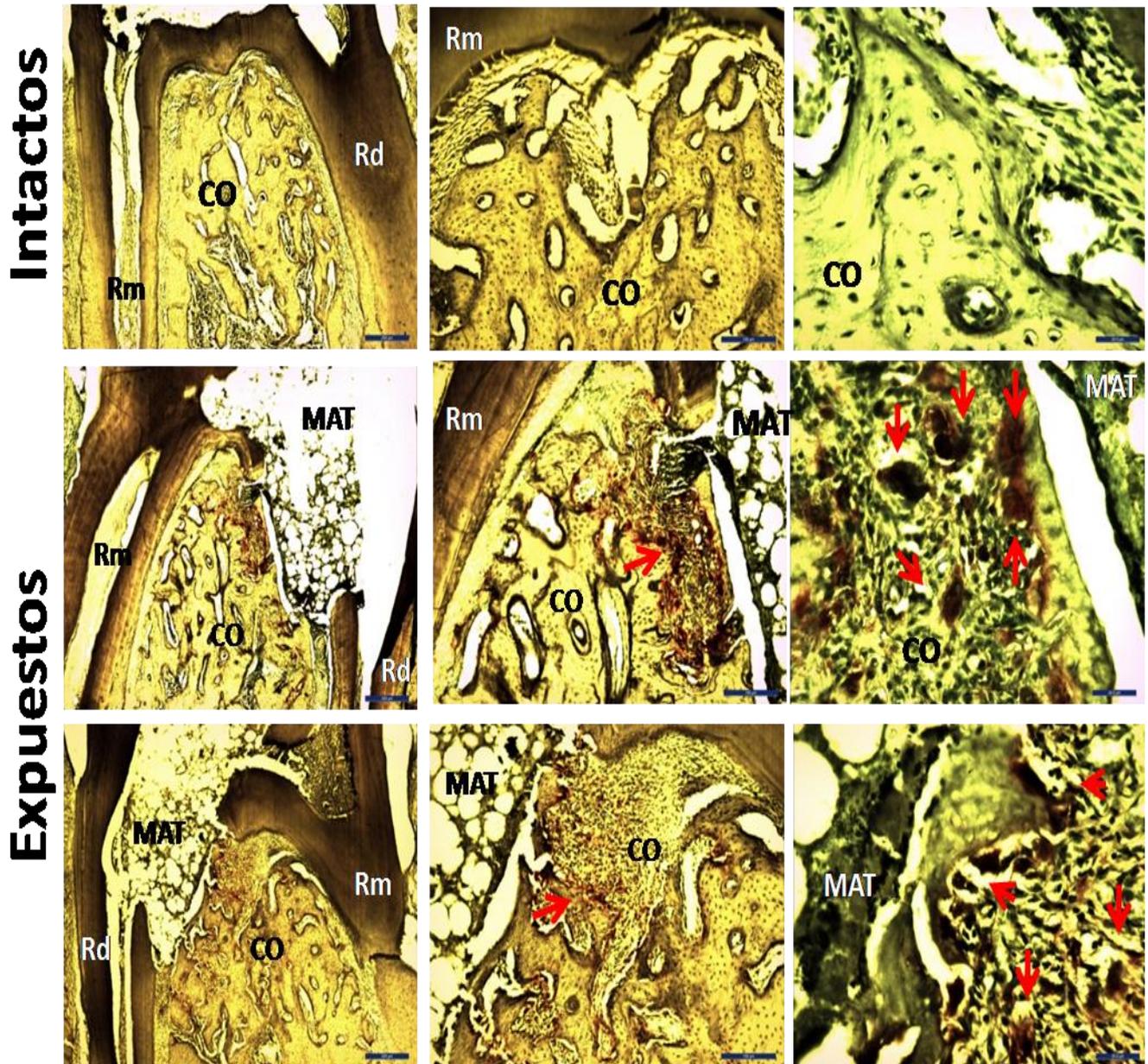


Figura 21. Micrografías de cortes histológicos teñidos por técnica histoquímica TRAP, donde se observan las características morfológicas del tejido periapical de los diferentes grupos. Las imágenes en la columna izquierda muestran cortes a 4X representativos de os grupos expuestos e intacto realizados longitudinalmente, la columna del centro muestra las mismas imágenes a 10X y la columna de la derecha a 40x. CO: Cresta Ósea, Rd: Raíz distal, Rm: Raíz mesial, MAT: Material (cemento utilizado), PO: Perdida Ósea. Nótese las células teñidas de rojo (osteoclastos) marcados con flechas.

## Grupos de 15 días de exposición

### Grupo de MTA

Se observó ensanchamiento del ligamento periodontal, la morfología y densidad ósea se encontraron alteradas, se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación (Fig. 19 –expuestos 15 días). El promedio de área total del tejido bajo la furca fue de  $797,807 \pm 107,267\mu\text{m}^2$  y una área total de tejido mineralizado de  $233,598 \pm 51,881\mu\text{m}^2$  lo que dió como resultado una densidad ósea de  $29\% \pm 4.2\%$ . (Fig. 23).

### Grupo MTA-F

Se observó ensanchamiento del ligamento periodontal, la morfología y densidad ósea se encontraron alteradas, se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación (Fig. 19 –expuestos 15 días). El promedio de área total del tejido bajo la furca fue de  $687,852 \pm 128,634\mu\text{m}^2$  y una área total de tejido mineralizado de  $156,136 \pm 49,118\mu\text{m}^2$  lo que dió como resultado una densidad ósea de  $22.8\% \pm 6.6\%$ . (Fig. 23).

### Grupo ZOE

Se observó ensanchamiento del ligamento periodontal, la morfología y densidad ósea se encontraron alteradas, se observó la perforación a nivel de furca y el material colocado para su reparación (Fig. 19 –expuestos 15 días). El promedio de área total del tejido bajo la furca fue de  $687,388 \pm 73,073\mu\text{m}^2$  y una área total de tejido mineralizado de  $93,035 \pm 57,741\mu\text{m}^2$  lo que dió como resultado una densidad ósea de  $13.2\% \pm 7.5\%$ .(Fig. 23).

H&E	INTACTOS	MTA 15 DIAS	MTA-F 15 DIAS	ZOE 15 DIAS
AREA TOTAL	$667,863 \pm 71,554$	$797,807 \pm 107,267$	$687,852 \pm 128,634$	$687,388 \pm 73,073$
AREA MINERALIZADA	$388,772 \pm 46,877$	$233,598 \pm 51,881$	$156,136 \pm 49,118$	$93,035 \pm 57,741$
DENSIDAD OSEA	$58.3\% \pm 4.9\%$	$29.0\% \pm 4.2\%$	$22.8\% \pm 6.6\%$	$13.2\% \pm 7.5\%$

Figura 23. Tabla de medias y desviación estándar de cada grupo de expuestos durante 15 días, para las áreas medidas en micrómetros y la densidad ósea obtenida.

Existieron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de la densidad ósea de todos los grupos expuestos ( $P < 0.01$ .) comparados con el porcentaje de la densidad ósea del control negativo (INTACTO), existieron también diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos comparados con el control positivo (ZOE 15D), sin embargo no existe diferencia estadísticamente significativa entre el grupo MTA15 D Y MTAF 15D. (Fig. 24)

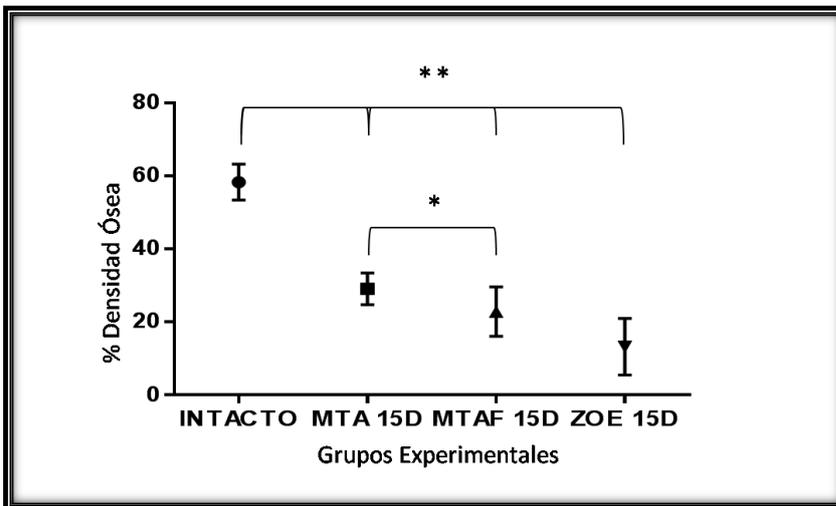


Figura 24. Medias y desviaciones estándar de las densidades Óseas obtenidas posterior a 15 días de exposición.

\* No existe diferencia estadística, \*\* Existe diferencia estadísticamente significativa.

Existieron diferencias estadísticamente significativas entre el número de células osteoclásticas presentes en todos los grupos expuestos ( $P < 0.01$ .) comparados con el control negativo (INTACTO), existieron también diferencias estadísticamente significativas entre todos los grupos comparados con el control positivo (ZOE 1D), sin embargo no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos MTA 1 D Y MTAF 1 D. (Fig 25)

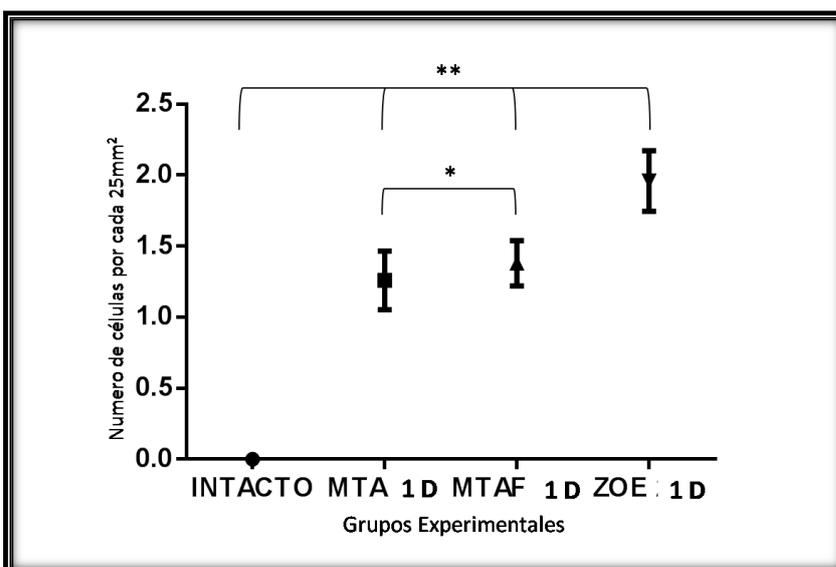


Figura 25. Medias y desviaciones estándar de el número de células osteoclásticas por cada 25,000  $\mu\text{m}^2$  posterior a 1 día de exposición.

\* No existe diferencia estadística, \*\* Existe diferencia estadísticamente significativa.

## Correlación

Se encontró una correlación entre el número de células osteoclasticas presentes detectadas a 1 día de exposición con la pérdida de tejido mineralizado 15 días posteriores a la exposición (densidad ósea). (Fig. 26,27)

	N° Osteoclastos	Densidad Ósea
MTA	36.16 ± 7.01	29.10%
MTA-F	37.16 ± 8.84	22.90%
ZOE	49.83 ± 3.71	13.20%
CONTROL	0	58.30%

Figura 26

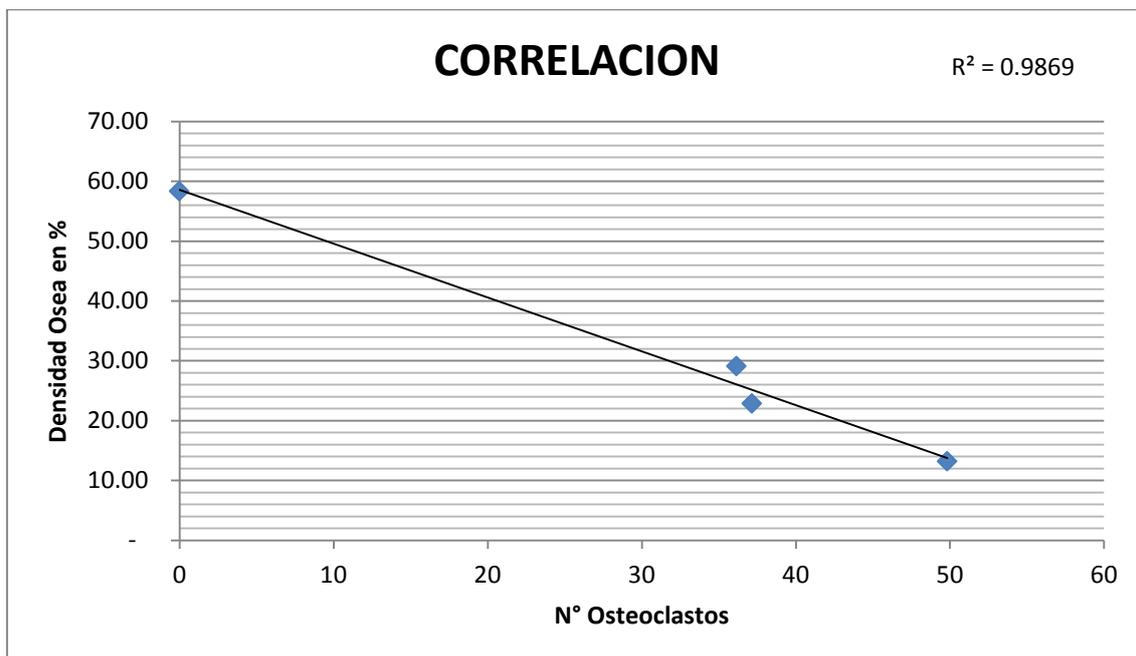


Figura 27. Correlación y recta de regresión lineal entre el número de osteoclastos presentes a 1 día de exposición y el porcentaje de densidad ósea a 15 días de exposición.  $R^2 = 0.9869$   $P = 0.0066$

## **DISCUSIÓN**

Diversos materiales han sido investigados en busca de encontrar el material ideal para sellar perforaciones, sin embargo ninguno ha cumplido todos los requerimientos necesarios.<sup>140</sup>

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron nuevamente que los materiales a base de silicato de calcio (MTA Angelus) presentan un mejor comportamiento biológico al estar en contacto con tejidos periodontales, en este caso, al sellar perforaciones en furca, al compararlos con el ZOE.

Para nuestra investigación decidimos trabajar un modelo de perforación en furca de primeros molares mandibulares de rata, pues aunque es un modelo complejo que presenta numerosas dificultades técnicas, las similitudes anatómicas y fisiológicas de estos tejidos con los humanos hacen que los resultados obtenidos sean sumamente relevantes, además de que el uso de modelos animales más grandes o más cercanos filogenéticamente al hombre presentan numerosas dificultades éticas y económicas.

Nuestro modelo experimental incluyó el aislamiento absoluto de la zona operatoria desde el inicio de los procedimientos, de forma que evitamos en lo máximo posible la contaminación por bacterias pues al igual que otros investigadores estamos de acuerdo en que se tiene un mejor pronóstico si la perforación es sellada de inmediato.<sup>12,141</sup> Nuestro diseño experimental al igual que el de da Silva et al.<sup>142</sup> no realizó apertura coronal ni perforación de furca en el grupo de “íntactos”, pues está comprobado que una perforación expuesta al medio bucal presentará una respuesta inflamatoria intensa<sup>12,143</sup> tampoco incluimos la exposición de las perforaciones a la cavidad oral de la rata durante un período determinado de tiempo tal y como lo han hecho otros autores en los grupos “expuestos”<sup>144,145</sup> evitando con esto, a parte de la contaminación, también el uso de otras sustancias que pudieran tener efectos positivos o negativos sobre la respuesta histológica, como podría ser el hipoclorito de sodio previo al sellado con el material, como ha sido sugerido.<sup>12</sup>

En cuanto a la forma como evaluamos el buen o mal desempeño de los materiales, nuestro modelo no pretendió observar el potencial que pudiera tener el cemento sellador en la formación de tejido cementario adyacente a él, o evaluar la respuesta inflamatoria dando grados de severidad al infiltrado inflamatorio y mucho menos observar si existió proliferación epitelial desde el surco gingival, como han hecho otros autores.<sup>146,12</sup>

Nuestro propósito fue conocer la influencia de los materiales directamente sobre el tejido óseo, haciendo para esto una sobreobtención del material que permitiera en lo máximo su cercanía al hueso. Según Holland<sup>147</sup> una sobreobtención del material tiene como consecuencia una inflamación crónica, mientras que para Juárez-Broon et al.<sup>148</sup> Es posible la neoformación de tejidos mineralizados alrededor del material extruido. Este modelo experimental propone una forma indirecta de evaluar la respuesta inflamatoria y por lo tanto el desempeño de cada uno de los materiales, y esto es al cuantificar el número de osteoclastos activos en cada grupo experimental 24 horas posteriores a la exposición, al encontrar diferencias significativas entre los grupos, principalmente con el grupo expuesto a ZOE y con el de “intactos”, podemos corroborar que existe diferencia de estimulación-respuesta entre los materiales utilizados. 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, se sabe que los materiales a base de óxido de zinc y eugenol liberan lenta y prolongadamente eugenol.<sup>149,150</sup>

Este eugenol causa desnaturalización de proteínas promoviendo con esto cambios estructurales y funcionales en las células llevando progresivamente a muerte celular,<sup>151</sup> es por eso que actualmente se usan como controles que nos permitan identificar respuestas no favorables en donde se observe una respuesta inflamatoria intensa y severa.

El estímulo con los diversos materiales será capaz de inducir una respuesta inflamatoria en donde las células involucradas producirán y liberarán diversos factores e interleucinas tales como la interleucina 1, 6 y TNF así como PGE2, estas citocinas estimularán la formación y actividad de los osteoclastos<sup>152,153</sup> al existir mayor número de osteoclastos activos en la zona podemos suponer que la

respuesta fue mayor y poco favorable, como es el caso del grupo expuesto a ZOE, según da Silva et al.<sup>142</sup> La presencia masiva de osteoclastos marcados positivamente por TRAP indica una actividad resorptiva en la zona posterior al estímulo, o en el caso contrario para el grupo “intactos” en donde no fue posible detectar osteoclastos activos debido a la falta de un estímulo físico y químico. Por otro lado, se sabe que el MTA promueve primeramente la formación de un proceso inflamatorio<sup>143</sup> pues contiene dentro de sus componentes oxido de calcio el cual reacciona con el agua dando como resultado hidróxido de calcio<sup>154-156</sup> la liberación de este hidróxido es responsable de la biocompatibilidad<sup>157</sup> pero también de la necrosis primaria de la superficie en contacto con él,<sup>158</sup> esto podría explicar la presencia de osteoclastos y de zonas con actividad resorptiva también en nuestros grupos expuestos a estos materiales. Da Silva et al.<sup>142</sup> Mostró que al usar MTA la reducción del proceso inflamatorio es posterior a los 15 días y que hasta los 60 días es posible encontrar formación de hueso y el retorno a la normalidad en el ligamento periodontal previamente inflamado. La segunda evaluación que realizamos tiene que ver con los efectos sobre la densidad ósea 15 días posteriores a la exposición, es decir, en que porcentaje la densidad ósea se ha perdido, se mantiene o a aumentado, no fue sorpresivo encontrar valores en la densidad ósea que se correlacionan con los valores de los osteoclastos activos a 24 horas de exposición, existiendo una correlación entre ambos de  $R^2 = 0.9869$ . Se ha sugerido la introducción de fluoruro de sodio dentro de la fórmula del MTA, debido a que se ha encontrado mejora el comportamiento del material debido a la fluorapatita que este forma y que da como resultado un material más bioactivo y osteoconductor. Sin embargo no existen estudios *in vivo* que lo demuestren. En el presente trabajo para ambas evaluaciones (1 y 15 días) existió diferencia estadísticamente significativa entre los grupos expuestos a MTA y los grupos “intacto” y ZOE, pero no existió diferencia entre los resultados mostrados por el grupo de expuestos a MTA Angelus y MTA Angelus adicionado con fluoruro de sodio, esto podría deberse a que el material solo fue adicionado y no dopado como menciona Gandolfi,<sup>128,139,129</sup> el dopaje del silicato de calcio podría lograrse por tratamientos térmicos del material a altas temperaturas que incorporen al fluoruro de sodio dentro de la estructura química de los cementos de silicato de calcio.

Hace falta más experimentación respecto a este dopaje y hacer las exposiciones de los materiales a más largo plazo para confirmar o refutar lo afirmado por da Silva et al.<sup>142</sup> y observar una recuperación del tejido posterior a 15 días e incluso observar la formación de estructuras similares a tejidos mineralizados (cemento radicular) tal y como ha sido reportado por otros autores<sup>121,59</sup>.

## **CONCLUSIÓN**

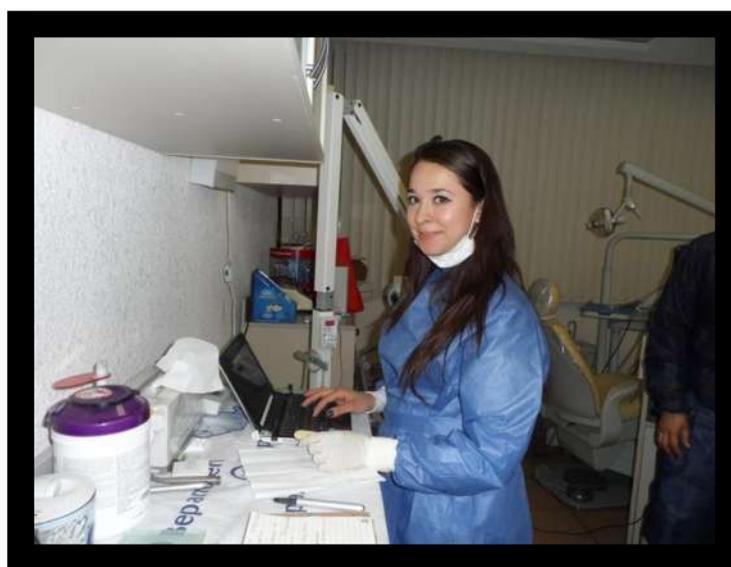
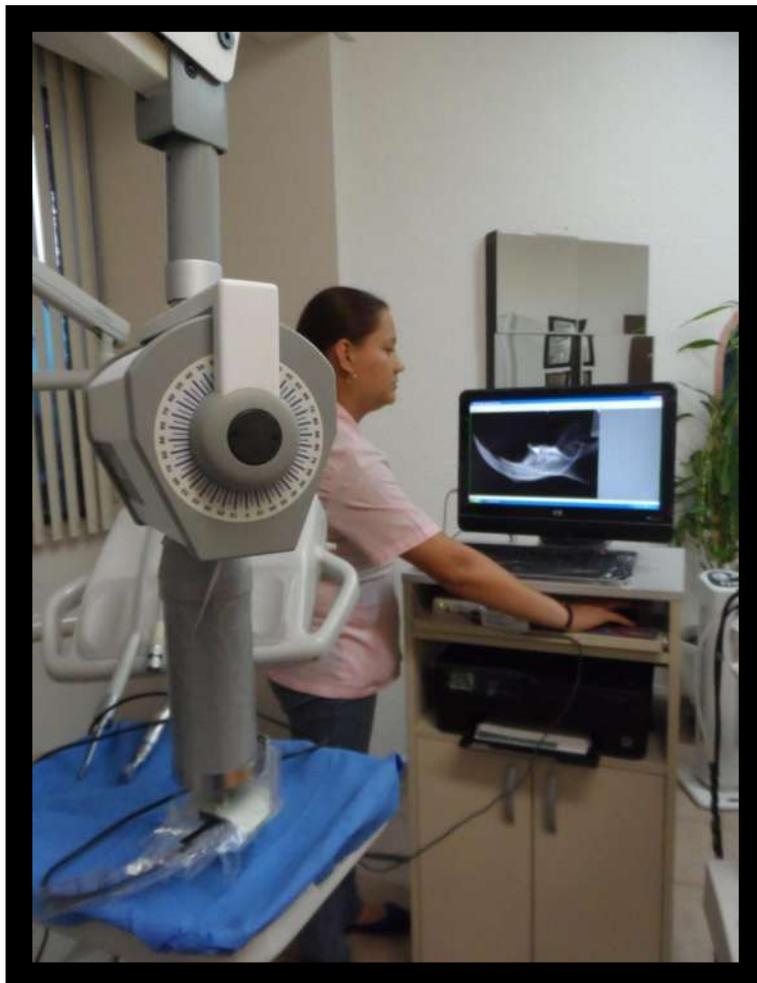
La adición de fluoruro de sodio al 1% en peso al MTA Ángelus no representó una diferencia significativa en la biocompatibilidad, bioactividad u osteoconductividad al compararlo cuando se utiliza el MTA Ángelus sin aditivos. No se observó ningún beneficio de adicionar fluoruro de sodio a estos materiales.

**ANEXOS.** Memorias durante la fase experimental (fotografías propias)



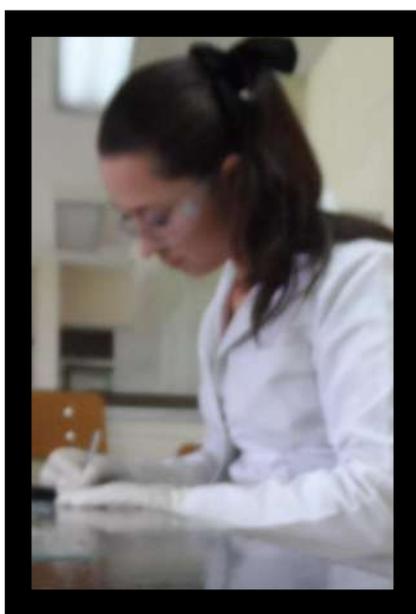
“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---



“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---



“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---



## **BIBLIOGRAFIA**

- 1 Endodontist, A. A. o. in *Contemporary Terminology for Endodontics* 19 (Chicago, 2012).
- 2 Silveira, C. M., Sanchez-Ayala, A., Lagravere, M. O., Pilatti, G. L. & Gomes, O. M. Repair of furcal perforation with mineral trioxide aggregate: long-term follow-up of 2 cases. *J Can Dent Assoc* **74**, 729-733 (2008).
- 3 Ruddle C. Cohen S, B. R. in *Vías de la Pulpa*. 877-921 (2001).
- 4 Kim, S. Principles of endodontic microsurgery. *Dent Clin North Am* **41**, 481-497 (1997).
- 5 Sottosanti, J. Calcium sulfate: a biodegradable and biocompatible barrier for guided tissue regeneration. *Compendium* **13**, 226-228, 230, 232-224 (1992).
- 6 Blumenthal, N. M. The use of collagen membranes for guided tissue regeneration. *Compendium* **13**, 214, 216, 218 passim (1992).
- 7 Asgary, S. Furcal perforation repair using calcium enriched mixture cement. *J Conserv Dent* **13**, 156-158, (2010).
- 8 Torabinejad, M., Hong, C. U., Lee, S. J., Monsef, M. & Pitt Ford, T. R. Investigation of mineral trioxide aggregate for root-end filling in dogs. *J Endod* **21**, 603-608, (1995).
- 9 Ford, T. R., Torabinejad, M., Abedi, H. R., Bakland, L. K. & Kariyawasam, S. P. Using mineral trioxide aggregate as a pulp-capping material. *J Am Dent Assoc* **127**, 1491-1494 (1996).
- 10 Shabahang, S., Torabinejad, M., Boyne, P. P., Abedi, H. & McMillan, P. A comparative study of root-end induction using osteogenic protein-1, calcium hydroxide, and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* **25**, 1-5, (1999).
- 11 Lee, S. J., Monsef, M. & Torabinejad, M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* **19**, 541-544, (1993).
- 12 Ford, T. R., Torabinejad, M., McKendry, D. J., Hong, C. U. & Kariyawasam, S. P. Use of mineral trioxide aggregate for repair of furcal perforations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **79**, 756-763 (1995).
- 13 O'Sullivan, S. M. & Hartwell, G. R. Obturation of a retained primary mandibular second molar using mineral trioxide aggregate: a case report. *J Endod* **27**, 703-705, (2001).
- 14 Baratto-Filho, F. *et al.* Treatment of invasive cervical resorption with MTA: case report. *Aust Endod J* **31**, 76-80 (2005).
- 15 Shabahang, S. & Torabinejad, M. Treatment of teeth with open apices using mineral trioxide aggregate. *Pract Periodontics Aesthet Dent* **12**, 315-320; quiz 322 (2000).
- 16 Schartz S. Richard, e. a. Mineral trioxide Aggregate: a new material for endodontics. *JADA* (1999).
- 17 Torabinejad, M., Hong, C. U., McDonald, F. & Pitt Ford, T. R. Physical and chemical properties of a new root-end filling material. *J Endod* **21**, 349-353, (1995).

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---

- 18 Herzog-Flores D, V. A., Gonzalez V, Rodriguez F, Gomez M, Barrientos V. . Análisis físico-químico del mineral trióxido agregado (MTA) por difracción de rayos X calorimetría y microscopía electrónica de barrido. *Rev ADM* **57**, 125-131 (2000).
- 19 Dentsply. Literature from the manufacturer. (1998 ).
- 20 Angelus. Angelus: cemento reparador. MTA.
- 21 Orosco, F. A., Bramante, C. M., Garcia, R. B., Bernadineli, N. & Moraes, I. G. Sealing ability of grar MTA AngelusTM, CPM TM and MBPc used as apical plugs. *J Appl Oral Sci* **16**, 50-54, (2008).
- 22 Al-Hezaimi, K., Naghshbandi, J., Oglesby, S., Simon, J. H. & Rotstein, I. Human saliva penetration of root canals obturated with two types of mineral trioxide aggregate cements. *J Endod* **31**, 453-456, (2005).
- 23 Thomas Clauder, S.-J. S. Repair of perforations with MTA: clinical applications and mechanisms of action. *Endodontic Topics* 32-55 (2009).
- 24 Anusavice. *Ciencia de los materiales dentales*. 11 edn, (2004).
- 25 Ochoa C, P. E., Rueda K. *Cementos en endodoncia*. 30 (2006).
- 26 Parirokh, M. & Torabinejad, M. Mineral trioxide aggregate: a comprehensive literature review--Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* **36**, 400-413, (2010).
- 27 Autian, J. General toxicity and screening tests for dental materials. *Int Dent J* **24**, 235-250 (1974).
- 28 Langeland K, C. W. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* **30**, 140-188 (1980).
- 29 Organisation, I. S. in *ISO 7405 - Dentistry* Vol. ISO 7405 (International Standard Organisation, Geneva, 1997).
- 30 Gängler. The controversy: restoration technique – should there be exclusively adhesive restorations? . *Dtsch Zahnärztl Z* **60**, 11-14 (2005).
- 31 Costa CA. Hebling J, T. M. Estudo 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* 11-18 ( 1997).
- 32 Kawahara, H., Yamagami, A. & Nakamura, M., Jr. Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int Dent J* **18**, 443-467 (1968).
- 33 Ríos M, C. J., Davidenko N, Krael R, González A, Pérez K, Bello JL. Evaluación toxicológica in vitro de materiales poliméricos de restauración dental compuestos por BIS-GMA. *AnuarioToxicología*, 65-72 (2001).

- 34 Pearce, A. I., Richards, R. G., Milz, S., Schneider, E. & Pearce, S. G. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review. *Eur Cell Mater* **13**, 1-10, (2007).
- 35 Richards, R. G. *et al.* Immunogold labelling of fibroblast focal adhesion sites visualised in fixed material using scanning electron microscopy, and living, using internal reflection microscopy. *Cell Biol Int* **25**, 1237-1249, (2001).
- 36 Pizzoferrato, A. *et al.* Cell culture methods for testing biocompatibility. *Clin Mater* **15**, 173-190 (1994).
- 37 Nahid, M. & Bottenberg, P. [Importance of cell cultures in biocompatible dental materials research]. *Rev Belge Med Dent (1984)* **58**, 189-196 (2003).
- 38 Wataha, J. C., Hanks, C. T. & Sun, Z. Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity. *Dent Mater* **10**, 156-161, (1994).
- 39 Vico, L. *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* **2**, 383-394 (1987).
- 40 Urban, R. M. *et al.* Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Joint Surg Am* **82**, 457-476 (2000).
- 41 Schimandle, J. H. & Boden, S. D. Spine update. The use of animal models to study spinal fusion. *Spine (Phila Pa 1976)* **19**, 1998-2006 (1994).
- 42 Dammaschke, T. Rat molar teeth as a study model for direct pulp capping research in dentistry. *Lab Anim* **44**, 1-6, (2010).
- 43 Maurice, C. G. & Schour, I. Experimental cavity preparations in the molar of the rat. *J Dent Res* **34**, 429-434 (1955).
- 44 Berman, D. S. & Massler, M. Experimental pulpotomies in rat molars. *J Dent Res* **37**, 229-242 (1958).
- 45 Kiryati, A. A. The effect of hydrocortisone plus polyantibiotics upon the damaged and infected dental pulp of rat molars. *J Dent Res* **37**, 886-901 (1958).
- 46 Kozlov, M. & Massler, M. Histologic effects of various drugs on amputated pulps of rat molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **13**, 455-469 (1960).
- 47 Kakehashi, S., Stanley, H. R. & Fitzgerald, R. J. The Effects of Surgical Exposures of Dental Pulp in Germ-Free and Conventional Laboratory Rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **20**, 340-349 (1965).
- 48 Harris, R. & Bull, A. W. The healing of the traumatized dental pulp following capping. *Aust Dent J* **11**, 236-247 (1966).
- 49 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* **30**, 425-430 (1970).

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---

- 50 Hirschfeld, Z., Sela, J. & Ulmansky, M. Hydrex and its effect on the pulp. Preliminary findings on the rat molar. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **34**, 364-371 (1972).
- 51 Sela, J., Hirschfeld, Z. & Ulmansky, M. Reaction of the rat molar pulp to direct capping with the separate components of Hydrex. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **35**, 118-122 (1973).
- 52 Rowe, A. H. Reaction of the rat molar pulp to various materials. *Br Dent J* **122**, 291-300 (1967).
- 53 Paterson, R. C. The reaction of the rat molar pulp to various materials. *Br Dent J* **140**, 93-96 (1976).
- 54 Cotton, W. R. Bacterial contamination as a factor in healing of pulp exposures. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **38**, 441-450 (1974).
- 55 Paterson, R. C. Corticosteroids and the exposed pulp. *Br Dent J* **140**, 174-177 (1976).
- 56 Paterson, R. C. Bacterial contamination and the exposed pulp. *Br Dent J* **140**, 231-236 (1976).
- 57 Ranly, D. M. & Fulton, R. An autoradiographic study of the response of rat molar pulp to formocresol using 3H-thymidine. *Pediatr Dent* **5**, 20-24 (1983).
- 58 Watts, A. & Paterson, R. C. Simple metallic compounds as pulp-capping agents. A pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **44**, 285-292 (1977).
- 59 Gangler, P., Hoyer, I. & Krehan, F. [Biological testing of pulp-preserving agents on the pulp of rat molars]. *Zahn Mund Kieferheilkd Zentralbl* **65**, 851-858 (1977).
- 60 Watts, A. & Paterson, R. C. Simple metallic compounds as pulp-capping agents. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **48**, 561-563 (1979).
- 61 Negm, M. M., Combe, E. C. & Grant, A. A. Reaction of the exposed pulps to new cements containing calcium hydroxide. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **51**, 190-204 (1981).
- 62 Paterson, R. C. Pulp response in sound and carious teeth: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **51**, 209-212 (1981).
- 63 Paterson, R. C., Radford, J. R. & Watts, A. The response of the rat molar pulp of two proprietary calcium hydroxide preparations. *Br Dent J* **151**, 184-186 (1981).
- 64 Sela, J., Tamari, I., Hirschfeld, Z. & Bab, I. Transmission electron microscopy of reparative dentin in rat molar pulps. Primary mineralization via extracellular matrix vesicles. *Acta Anat (Basel)* **109**, 247-251 (1981).
- 65 Watts, A. & Paterson, R. C. A comparison of pulp responses to two different materials in the dog and the rat. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **52**, 648-652 (1981).
- 66 Hirschfeld, Z., Bab, I., Tamari, I. & Sela, J. Primary mineralization of dentin in rats after pulp capping with calcium-hydroxide. *J Oral Pathol* **11**, 426-433 (1982).

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---

- 67 Smith, H. S. & Soni, N. N. Histologic study of pulp capping in rat molars using calcitonin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **53**, 311-317 (1982).
- 68 Watts, A. & Paterson, R. C. Migration of materials and microorganisms in the dental pulp of dogs and rats. *J Endod* **8**, 53-58, (1982).
- 69 Ranly, D. M. & Fulton, R. Reaction of rat molar pulp tissue to Formocresol, formaldehyde, and cresol. *J Endod* **2**, 176-181, (1976).
- 70 Watts, A. & Paterson, R. C. Bacterial contamination and the "toxicity" of materials to the exposed pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **56**, 542-548 (1983).
- 71 Niamonitos, C., Shklar, G. & Krakow, A. A. Effects of vitamin E dietary supplements on the exposed dental pulp in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **59**, 627-636 (1985).
- 72 Paterson, R. C. & Watts, A. Further studies on the exposed germ-free dental pulp. *Int Endod J* **20**, 112-121 (1987).
- 73 Watts, A. & Paterson, R. C. Pulp-capping studies with Analar calcium hydroxide and zinc oxide-eugenol. *Int Endod J* **20**, 169-176 (1987).
- 74 Watts, A. & Paterson, R. C. Bacterial contamination as a factor influencing the toxicity of materials to the exposed dental pulp. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **64**, 466-474 (1987).
- 75 Khayat, B. G., Byers, M. R., Taylor, P. E., Mecifi, K. & Kimberly, C. L. Responses of nerve fibers to pulpal inflammation and periapical lesions in rat molars demonstrated by calcitonin gene-related peptide immunocytochemistry. *J Endod* **14**, 577-587, (1988).
- 76 Kimberly, C. L. & Byers, M. R. Inflammation of rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonin gene-related peptide and axonal sprouting. *Anat Rec* **222**, 289-300, (1988).
- 77 Yanagisawa, T., Ogiwara, H., Kumamoto, Y., Sawada, T. & Takuma, S. Electron microscopic study of osteodentin-forming cells induced in experimentally exposed rat-molar pulp and of their acid- and alkaline-phosphatase activity. *Bull Tokyo Dent Coll* **29**, 165-173 (1988).
- 78 Heling, I., Zalkind, M. & Sela, J. Pulp capping with hydroxyapatite ceramic in rat molars. *Isr J Dent Sci* **2**, 128-132 (1989).
- 79 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* **2**, 133-136 (1989).
- 80 Jaber, L., Mascres, C. & Donohue, W. B. Electron microscope characteristics of dentin repair after hydroxylapatite direct pulp capping in rats. *J Oral Pathol Med* **20**, 502-508 (1991).
- 81 Jaber, L., Mascres, C. & Donohue, W. B. Reaction of the dental pulp to hydroxyapatite. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **73**, 92-98 (1992).
- 82 Chiego, D. J., Jr. An ultrastructural and autoradiographic analysis of primary and replacement odontoblasts following cavity preparation and wound healing in the rat molar. *Proc Finn Dent Soc* **88 Suppl 1**, 243-256 (1992).

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---

- 83 Watts, A., Paterson, R. C., Cohen, B. D. & Combe, E. C. Pulp response to a novel adhesive calcium hydroxide based cement. *Eur J Prosthodont Restor Dent* **3**, 27-32 (1994).
- 84 Sasaki, T. & Kawamata-Kido, H. Providing an environment for reparative dentine induction in amputated rat molar pulp by high molecular-weight hyaluronic acid. *Arch Oral Biol* **40**, 209-219, (1995).
- 85 Tsuneda, Y., Hayakawa, T., Yamamoto, H., Ikemi, T. & Nemoto, K. A histopathological study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oper Dent* **20**, 223-229 (1995).
- 86 Hu, C. C., Zhang, C., Qian, Q. & Tatum, N. B. Reparative dentin formation in rat molars after direct pulp capping with growth factors. *J Endod* **24**, 744-751, (1998).
- 87 Zhang, M. & Fukuyama, H. CGRP immunohistochemistry in wound healing and dentin bridge formation following rat molar pulpotomy. *Histochem Cell Biol* **112**, 325-333, (1999).
- 88 Cortes, O., Garcia, C. & Bernabe, A. Pulpal evaluation of two adhesive systems in rat teeth. *J Clin Pediatr Dent* **25**, 73-77 (2000).
- 89 Costa, C. A., Mesas, A. N. & Hebling, J. Pulp response to direct capping with an adhesive system. *Am J Dent* **13**, 81-87 (2000).
- 90 Decup, F. *et al.* Bone sialoprotein-induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Investig* **4**, 110-119 (2000).
- 91 Dammaschk, T., Stratmann, U., Mokrys, K., Kaup, M. & Ott, K. H. Histocytological evaluation of the reaction of rat pulp tissue to Carisolv. *J Dent* **29**, 283-290, (2001).
- 92 Goldberg, M. *et al.* Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res* **15**, 91-95 (2001).
- 93 Jayawardena, J. A., Kato, J., Moriya, K. & Takagi, Y. Pulpal response to exposure with Er:YAG laser. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **91**, 222-229, (2001).
- 94 Lovschall, H., Fejerskov, O. & Flyvbjerg, A. Pulp-capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res* **15**, 108-112 (2001).
- 95 Six, N., Lasfargues, J. J. & Goldberg, M. Differential repair responses in the coronal and radicular areas of the exposed rat molar pulp induced by recombinant human bone morphogenetic protein 7 (osteogenic protein 1). *Arch Oral Biol* **47**, 177-187, (2002).
- 96 Six, N., Decup, F., Lasfargues, J. J., Salih, E. & Goldberg, M. Osteogenic proteins (bone sialoprotein and bone morphogenetic protein-7) and dental pulp mineralization. *J Mater Sci Mater Med* **13**, 225-232, (2002).
- 97 Andelin, W. E., Shabahang, S., Wright, K. & Torabinejad, M. Identification of hard tissue after experimental pulp capping using dentin sialoprotein (DSP) as a marker. *J Endod* **29**, 646-650, (2003).
- 98 Costa, C. A., Oliveira, M. F., Giro, E. M. & Hebling, J. Biocompatibility of resin-based materials used as pulp-capping agents. *Int Endod J* **36**, 831-839, (2003).

“Evaluación histológica e histomorfométrica del tejido óseo adyacente a perforaciones en furca tratadas con MTA, MTA-F y ZOE en un modelo experimental en rata”

---

- 99 Igarashi, R., Sahara, T., Shimizu-Ishiura, M. & Sasaki, T. Porcine enamel matrix derivative enhances the formation of reparative dentine and dentine bridges during wound healing of amputated rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo)* **52**, 227-236 (2003).
- 100 Salako, N. *et al.* Comparison of bioactive glass, mineral trioxide aggregate, ferric sulfate, and formocresol as pulpotomy agents in rat molar. *Dent Traumatol* **19**, 314-320 (2003).
- 101 Sena, M. *et al.* Octacalcium phosphate-based cement as a pulp-capping agent in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **97**, 749-755, (2004).
- 102 Lovschall, H., Tummers, M., Thesleff, I., Fuchtbauer, E. M. & Poulsen, K. Activation of the Notch signaling pathway in response to pulp capping of rat molars. *Eur J Oral Sci* **113**, 312-317, (2005).
- 103 Sabir, A., Tabbu, C. R., Agustiono, P. & Sosroseno, W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci* **47**, 135-138 (2005).
- 104 Dammaschke, T., Stratmann, U., Danesh, G., Schafer, E. & Ott, K. H. Reaction of rat pulp tissue to Carisolv 'new gel'--a histocytological evaluation. *Aust Dent J* **51**, 57-63 (2006).
- 105 Jegat, N., Septier, D., Veis, A., Poliard, A. & Goldberg, M. Short-term effects of amelogenin gene splice products A+4 and A-4 implanted in the exposed rat molar pulp. *Head Face Med* **3**, 40, (2007).
- 106 Kuratate, M. *et al.* Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod* **34**, 970-974, (2008).
- 107 Fitzgerald, M. Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H-thymidine. *J Dent Res* **58**, 2198-2206 (1979).
- 108 Thomas GP, S. N., Palmer JE. . Histological study of pulp capping in rat molars using prolactation. *Natl Dent Assoc J* **44**, 9-11 ( 1988).
- 109 Dammaschke T, S., U, Mokrys K, Kaup M, Ott KHR. . Histocytological evaluation of immediate reactions of rat pulp tissue to three different adhesive systems. *Dtsch Zahnärztl Z* **58**, 32-37 (2003).
- 110 Dammaschke T, S. U., Kaup M, Ott KHR. . Histocytological evaluation of reaction of rat pulp tissue to Carisolv 2. . *Stomatologie* **101**, 31-36 (2004).
- 111 Robson WC, K. R. Preliminary studies on pulp capping with demineralized dentin. *Proc Finn Dent Soc* **88(Suppl 1)**, 279-282 (1992).
- 112 Jean A H, P. J., Daculsi G. . Pulpal response to calcium phosphate materials. In vivo study of calcium phosphate materials in endodontics. . *Cell Mater* **3**, 193-200 (1993).
- 113 Stanley, H. R. Criteria for standardizing and increasing credibility of direct pulp capping studies. *Am J Dent* **11 Spec No**, S17-34 (1998).
- 114 Roberts, W. H., Toth, M.J., Berzins, W.D., Charlton, G.D. Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatent: A reviw of the literature. *Dent Mater* **24**, 149-164 (2008).

- 115 Gutierrez-Salinas, J. *et al.* Exposure to sodium fluoride produces signs of apoptosis in rat leukocytes. *Int J Mol Sci* **11**, 3610-3622, (2010).
- 116 Caverzasio, J., Palmer, G. & Bonjour, J. P. Fluoride: mode of action. *Bone* **22**, 585-589, (1998).
- 117 Fordyce. in *Encyclopedia of Environmental Health*. Vol. 5 776–785 (2011).
- 118 CJM, B. Historia de la fluoruración. *Revista ADM* Vol. **LVII**, No. **5** , 192-194 (Septiembre-Octubre 2001.).
- 119 Chien, C. H. *et al.* Enhancement of cytotoxic activity of sodium fluoride against human periodontal ligament fibroblasts by water pressure. *In Vivo* **20**, 849-856 (2006).
- 120 Wurtz, T. *et al.* Fluoride at non-toxic dose affects odontoblast gene expression in vitro. *Toxicology* **249**, 26-34,(2008).
- 121 Lee JH, J. J., Jeong YJ, Park JH, Yang KH, Choi NK, Kim SH, Kim WJ. . Involvement of both mitochondrial- and death receptor-dependent apoptotic pathways regulated by Bcl-2 family in sodium fluoride-induced apoptosis of the human gingival fibroblasts. . *Toxicology*. **347**, 243:340 (2008).
- 122 Qu WJ, Z. D., Wu PF, Wang JF, Han B. . Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. . *J Bone Miner Metab*. **26**, 328–334 (2008).
- 123 Yan X, F. C., Chen Q, Li W, Wang H, Lv L, Smith GW, Wang J. Effects of sodium fluoride treatment in vitro on cell proliferation, apoptosis and caspase-3 and caspase-9 mRNA expression by neonatal rat osteoblasts. . *Arch Toxicol* **83**, 451–458 (2008).
- 124 Bjorvatn, K. & Massler, M. Effect of fluorides on root resorption in replanted rat molars. *Acta Odontol Scand* **29**, 17-29 (1971).
- 125 Coccia, C. T. A clinical investigation of root resorption rates in reimplanted young permanent incisors: a five-year study. *J Endod* **6**, 413-420, (1980).
- 126 Shulman, L. B., Gedalia, I. & Feingold, R. M. Fluoride concentration in root surfaces and alveolar bone of fluoride-immersed monkey incisors three weeks after replantation. *J Dent Res* **52**, 1314-1316 (1973).
- 127 Andreasen JO, A. F. 4th ed edn, (2007).
- 128 Gandolfi, M. G. *et al.* Setting time and expansion in different soaking media of experimental accelerated calcium-silicate cements and ProRoot MTA. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **108**, e39-45, (2009).
- 129 Gandolfi, M. G. & Prati, C. MTA and F-doped MTA cements used as sealers with warm gutta-percha. Long-term study of sealing ability. *Int Endod J* **43**, 889-901,(2010).
- 130 Colin A, P. C., Pelliccioni GA, Gandolfi MG. Solubility in water or DMEM of F-doped MTA cements with increasing F-content. . *Dental Materials*, 26S, e67 (2010).

- 131 Qu, H., Wei, M. The effect of fluoride contents in fluoridated hydroxyapatite on osteoblast behaviour. *Acta biomaterialia* **2**, 113-119 (2006).
- 132 Yoon, B. H. *et al.* Stability and cellular responses to fluorapatite-collagen composites. *Biomaterials* **26**, 2957-2963,(2005).
- 133 Qu, W. J., Zhong, D. B., Wu, P. F., Wang, J. F. & Han, B. Sodium fluoride modulates caprine osteoblast proliferation and differentiation. *Journal of bone and mineral metabolism* **26**, 328-334, (2008).
- 134 Zhang, W. G., Wang, L. Z. & Liu, Z. [The influence of fluoride on the development of the osteoblast phenotype in rat calvarial osteoblasts: an in vitro study]. *Shanghai kou qiang yi xue = Shanghai journal of stomatology* **7**, 88-93 (1998).
- 135 Bhadang, K. A. *et al.* Biological responses of human osteoblasts and osteoclasts to flame-sprayed coatings of hydroxyapatite and fluorapatite blends. *Acta biomaterialia* **6**, 1575-1583,(2010).
- 136 Sundfeldt, M. *et al.* Does sodium fluoride in bone cement affect implant fixation? Part I: bone tissue response, implant fixation and histology in nine rabbits. *Journal of materials science. Materials in medicine* **13**, 1037-1043 (2002).
- 137 Sundfeldt, M. *et al.* Does sodium fluoride in bone cement affect implant fixation. Part II: evaluation of the effect of sodium fluoride additions to acrylic bone cement and the fixation of titanium implants in ovariectomized rabbits. *Journal of materials science. Materials in medicine* **13**, 1045-1050 (2002).
- 138 Cartmell, S. Controlled release scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of pharmaceutical sciences* **98**, 430-441, (2009).
- 139 Gandolfi, M. G. *et al.* Fluoride-containing nanoporous calcium-silicate MTA cements for endodontics and oral surgery: early fluorapatite formation in a phosphate-containing solution. *Int Endod J* **44**, 938-949, (2011).
- 140 Hartwell, G. R. & England, M. C. Healing of furcation perforations in primate teeth after repair with decalcified freeze-dried bone: a longitudinal study. *J Endod* **19**, 357-361, (1993).
- 141 Beavers, R. A., Bergenholtz, G. & Cox, C. F. Periodontal wound healing following intentional root perforations in permanent teeth of *Macaca mulatta*. *Int Endod J* **19**, 36-44 (1986).
- 142 da Silva, G. F., Guerreiro-Tanomaru, J. M., Sasso-Cerri, E., Tanomaru-Filho, M. & Cerri, P. S. Histological and histomorphometrical evaluation of furcation perforations filled with MTA, CPM and ZOE. *Int Endod J* **44**, 100-110, (2011).
- 143 Noetzel, J. *et al.* Tissue responses to an experimental calcium phosphate cement and mineral trioxide aggregate as materials for furcation perforation repair: a histological study in dogs. *Clin Oral Investig* **10**, 77-83, (2006).
- 144 Jew, R. C., Weine, F. S., Keene, J. J., Jr. & Smulson, M. H. A histologic evaluation of periodontal tissues adjacent to root perforations filled with Cavit. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **54**, 124-135 (1982).

- 145 Rafter, M., Baker, M., Alves, M., Daniel, J. & Remeikis, N. Evaluation of healing with use of an internal matrix to repair furcation perforations. *Int Endod J* **35**, 775-783 (2002).
- 146 Al-Daafas, A. & Al-Nazhan, S. Histological evaluation of contaminated furcal perforation in dogs' teeth repaired by MTA with or without internal matrix. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **103**, e92-99, (2007).
- 147 Holland, R. *et al.* Mineral trioxide aggregate repair of lateral root perforations. *J Endod* **27**, 281-284 (2001).
- 148 Juarez Broon, N. *et al.* Healing of root perforations treated with Mineral Trioxide Aggregate (MTA) and Portland cement. *J Appl Oral Sci* **14**, 305-311, (2006).
- 149 Molnar, E. J. Residual eugenol from zinc oxide-eugenol compounds. *J Dent Res* **46**, 645-649 (1967).
- 150 Becker, R. M., Hume, W. R. & Wolinsky, L. E. Release of eugenol from mixtures of ZOE in vitro. *J Pedod* **8**, 71-77 (1983).
- 151 Kozam, G. & Mantell, G. M. The effect of eugenol on oral mucous membranes. *J Dent Res* **57**, 954-957 (1978).
- 152 Phan, T. C., Xu, J. & Zheng, M. H. Interaction between osteoblast and osteoclast: impact in bone disease. *Histol Histopathol* **19**, 1325-1344 (2004).
- 153 Michael, H., Harkonen, P. L., Vaananen, H. K. & Hentunen, T. A. Estrogen and testosterone use different cellular pathways to inhibit osteoclastogenesis and bone resorption. *J Bone Miner Res* **20**, 2224-2232,(2005).
- 154 Holland, R. *et al.* Reaction of rat connective tissue to implanted dentin tubes filled with a white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* **13**, 23-26 (2002).
- 155 Camilleri, J. Hydration mechanisms of mineral trioxide aggregate. *Int Endod J* **40**, 462-470, (2007).
- 156 Camilleri, J., Montesin, F. E., Di Silvio, L. & Pitt Ford, T. R. The chemical constitution and biocompatibility of accelerated Portland cement for endodontic use. *Int Endod J* **38**, 834-842, (2005).
- 157 Sarkar, N. K., Caicedo, R., Ritwik, P., Moiseyeva, R. & Kawashima, I. Physicochemical basis of the biologic properties of mineral trioxide aggregate. *J Endod* **31**, 97-100, (2005).
- 158 Shahi, S., Rahimi, S., Lotfi, M., Yavari, H. & Gaderian, A. A comparative study of the biocompatibility of three root-end filling materials in rat connective tissue. *J Endod* **32**, 776-780, (2006).
- 159 Yildirim, T., Gencoglu, N., Firat, I., Perk, C. & Guzel, O. Histologic study of furcation perforations treated with MTA or Super EBA in dogs' teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **100**, 120-124, (2005).