https://raoa.aoa.org.ar/revistas?roi=1011000083

# Endodoncia regenerativa en el primer molar inferior de la rata con ápices incompletamente calcificados. Un modelo experimental

## *Regenerative endodontics in the mandibular first molar of the rat. An experimental model*

Presentado: 26 de marzo 2012
Aprobado: 13 de agosto de 2012

Susana Álvarez Serrano[a], Ricardo Martínez Lalis[a], Carolina Chaves[a], Gabriel Kokubu[b], Daniel Grana[b] †, Osvaldo Zmener[a]

[a]Carrera de Especialización en Endodoncia, Escuela de Odontología, Universidad del Salvador / Asociación Odontológica Argentina
[b]Cátedra de Anatomía Patológica, Escuela de Odontología, Universidad del Salvador / Asociación Odontológica Argentina

## Resumen

**Objetivo:** Luego de la extirpación de la pulpa, el procedimiento de regeneración pulpar –inducido por la formación de un coágulo sanguíneo apical dentro de conductos radiculares con ápices incompletamente calcificados– ha sido experimentado en perros y monos. Este procedimiento permite la formación e invaginación de un nuevo tejido, muy similar al pulpar, dentro del conducto radicular. El objetivo de este estudio piloto fue investigar si este mismo proceso se produce al utilizar el conducto distal del primer molar inferior de la rata como modelo experimental.

**Materiales y métodos:** Se realizaron biopulpectomías totales en el conducto distal del primer molar inferior derecho en diez ratas Wistar macho de aproximadamente 80 g de masa que presentaban sus ápices incompletamente calcificados. El primer molar inferior izquierdo no fue intervenido y se utilizó como control negativo. Se provocó una hemorragia apical con el objeto de inducir la formación de un coágulo sanguíneo. El acceso coronario se obturó con resina compuesta y se obtuvieron radiografías posoperatorias inmediatas. Cinco de los animales fueron sacrificados a las 96 horas, y los otros cinco, a los treinta días de la operación. Luego de cada período, las mandíbulas fueron resecadas y posteriormente radiografiadas. Los primeros molares, junto con las estructuras periodontales y óseas que los rodean, fueron removidos, fijados y procesados para su estudio histológico.

**Resultados:** A las 96 horas, los ápices de los dientes experimentales permanecían aún incompletamente calcificados, y se observó dentro de los conductos la invaginación de un tejido de aspecto similar al tejido periodontal, muy celular y con gran cantidad de vasos sanguíneos. Los controles revelaron un desarrollo radicular más extenso, donde se podía apreciar la presencia de la pulpa, la papila dental y numerosos odontoblastos jóvenes. A los treinta días, se observó en los dientes experimentales un desarrollo radicular casi completo, y que el conducto se encontraba ocupado por un tejido fibroso maduro con vasos sanguíneos. En contacto directo con el material de obturación en la cavidad de acceso, se observó una cápsula fibrosa densa sin células inflamatorias. Los dientes de control presentaron un desarrollo radicular completo, con un tejido pulpar normal muy vascularizado, y paredes dentinarias más espesas.

**Conclusión:** Los resultados sugieren que el primer molar inferior de la rata podría constituir un modelo adecuado para el estudio de los procesos de revascularización y regeneración de los tejidos dentro de los conductos radiculares.

**Palabras clave:** Ápice incompletamente calcificado, tejido pulpar, revascularización, regeneración.

## Abstract

***Aim:*** *Recent research on immature teeth of dogs and monkeys has demonstrated that after complete pulp removal, the induction of an apical blood clot may promote the regeneration and invagination of tissues similar to the original ones along with continued root growth. The purpose of this pilot study was to investigate if similar events occur when the distal root of the mandibular first molar of the rat is used as an experimental model.*

***Materials and methods:*** *The pulps of the distal roots of right immature mandibular first molars of ten male Wistar rats (approximately weight 80 g) were removed. The mandibular left first molars were not used and these teeth were considered as negative controls. After induction of an apical hemorrhage the coronal access was sealed and immediate postoperative radiographs were obtained. The animals were sacrificed at 96 hours and thirty days postoperatively. After each observation period, the mandibles were resected, fixed and radiographed. They were then processed for histologic examination.*

***Results:*** *After 96 hours the experimental teeth showed different stages of root formation with open apexes and a periodontal-like tissue invagination containing many blood vessels within the root canal. The control teeth revealed more extended root development with healthy pulp along with visible dental papilla, a juvenile odontoblastic layer and thicker dentin walls. At the thirty-day observation period, the growth of the experimental roots was more complete albeit that the apexes were still open. The canals were filled with a mature fibrous tissue containing many newly formed vessels. In direct contact with the coronal obturation, a thick dense and healthy fibrous tissue capsule without inflammatory cells was observed. The control teeth revealed more extended root development containing healthy vascular pulp tissue, and thicker dentin walls.*

***Conclusion:*** *The results suggest that the distal canal of immature mandibular first molar of the rat could be a suitable experimental model to investigate the pulp revascularization and regeneration processes.*


***Key words:*** *Immature teeth, open apex, pulp tissue, revascularization, regeneration.*

## Introducción

La necesidad de remover completamente el tejido pulpar necrótico en piezas dentarias permanentes jóvenes con ápices incompletamente desarrollados y periodontitis periapical constituye un verdadero problema para la instrumentación, desinfección y obturación, dada la anatomía especial que presentan estas piezas dentarias[1]. Durante muchos años, los procedimientos de apexificación con hidróxido de calcio o –más recientemente– diferentes formulaciones de compuesto de minerales trióxido (MTA) como material de obturación fueron considerados como los tratamientos de elección para estos casos[2].

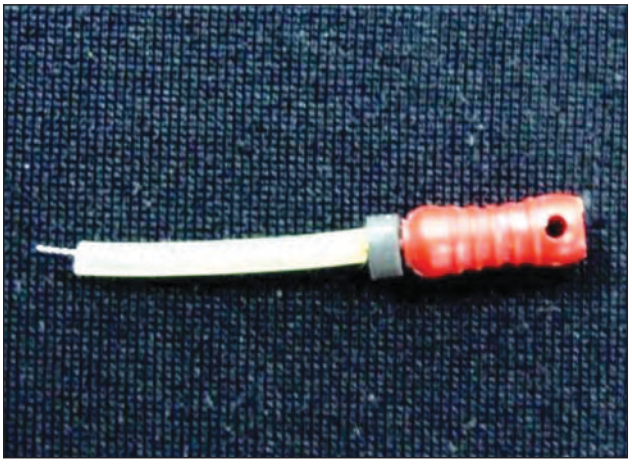


Figura 1. Instrumento modificado mediante un tubo de teflón adherido al tope de silicona. En la fotografía se observa un instrumento preparado para obtener un extremo activo de 2,0 mm.

Se ha informado acerca del éxito obtenido mediante el empleo de estos procedimientos[3,4], aunque, en general, el desarrollo radicular no suele ser completo: las paredes dentinarias permanecen frágiles y delgadas, y las piezas dentarias son susceptibles de sufrir fracturas radiculares con mucha frecuencia[5]. En 2004, Banch y Trope[6] sugirieron un nuevo tipo de procedimiento para estos casos, al que denominaron "revascularización." Para ello, luego de la instrumentación y desinfección de los conductos radiculares por medio de una pasta poliantibiótica, se induce la formación de un coágulo sanguíneo proveniente de los tejidos periapicales, dentro del conducto radicular. Este procedimiento de "regeneración" ha sido experimentado en perros[7,8] y, con algunas variantes, en monos[9], permitiendo la formación e invaginación de un nuevo tejido, similar al periodontal, en el conducto radicular. Torabinejad *et al.*[10] aconsejan enfáticamente utilizar animales de laboratorio pequeños para este tipo de experimento, tales como hurones, conejos o ratas, ya que son de fácil manejo y mantenimiento. Como base para futuras investigaciones, el objetivo de este estudio piloto fue investigar si el conducto distal del primer molar inferior de la rata constituye un modelo experimental adecuado para el estudio de los procesos de regeneración e invaginación de un nuevo tejido intraconducto luego de la remoción de la pulpa mediante instrumentación e irrigación del conducto radicular.

## Materiales y métodos

El protocolo de este proyecto ha sido previamente revisado y aprobado por la Comisión de Ética para la Investigación Científica de la Asociación Odontológica Argentina.

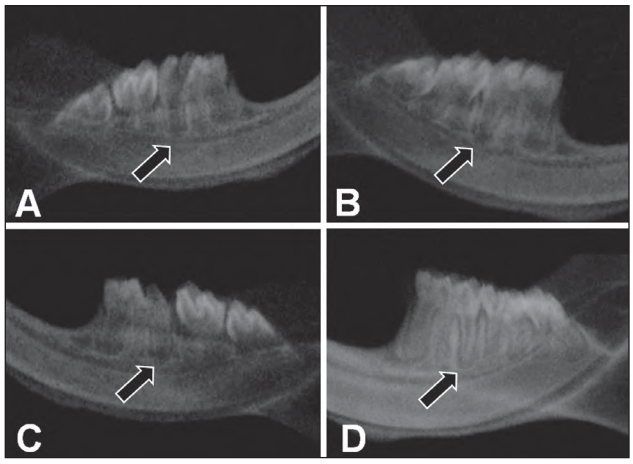



Figura 2. **A:** Radiografía del primer molar inferior de la rata sacrificada a las 96 horas. Obsérvese la amplitud del extremo apical abierto (flecha). **B:** Radiografía del primer molar inferior de la rata sacrificada a los treinta días. La flecha está indicando el desarrollo radicular y el estrechamiento apical más marcado. **C:** Radiografía de un primer molar inferior de control (96 horas). **D:** Radiografía de un primer molar inferior de control (treinta días). Obsérvese el desarrollo radicular completo y la formación final del extremo apical (flecha).

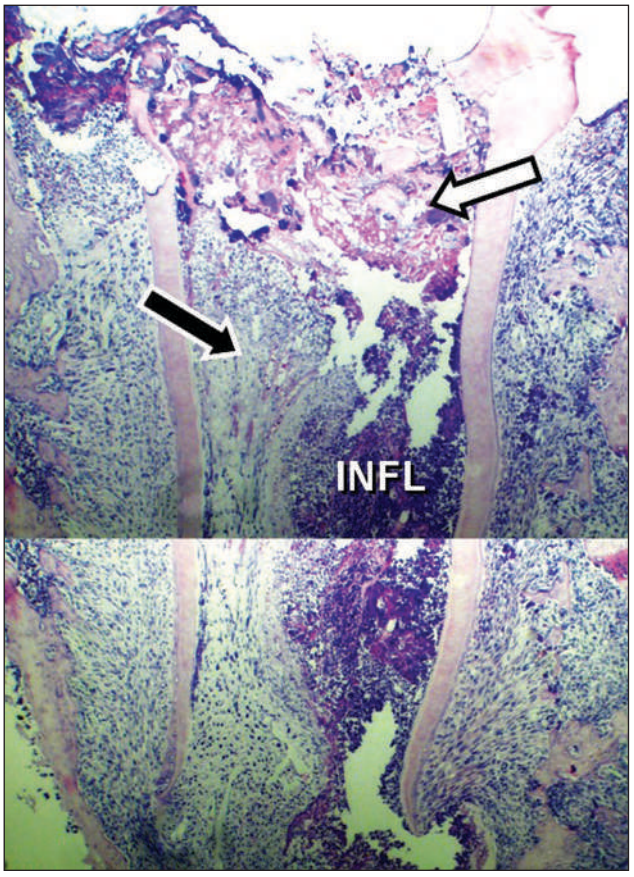



Figura 3. Imagen histológica compuesta de la raíz distal del primer molar inferior de un animal sacrificado a las 96 horas. Se puede observar la invaginación de un tejido similar al periodontal (flecha negra) y una zona de inflamación crónica localizada (INFL), claramente separada del resto del tejido. En el extremo coronario (flecha blanca) se observa la cavidad de acceso ocupada por excedentes del material de obturación perdido, detritus y restos de comida. (Hematoxilina y eosina; magnificación original X 80).

Para este estudio, se utilizaron diez ratas Wistar macho de aproximadamente 80 g de masa. Los animales fueron tratados de acuerdo a las normas ISO 10993-2-1992[11] y las regulaciones internacionales para el cuidado y uso de animales de laboratorio[12]. Los factores de inclusión requirieron fundamentalmente que los animales presentaran buenas condiciones de salud, piezas dentarias sanas, sin caries, y con ápices incompletamente desarrollados. Esta última característica fue confirmada por medio de radiografías.

Todos los procedimientos operatorios fueron realizados bajo estrictas normas de esterilidad y se basaron en una técnica endodóntica desarrollada en nuestro laboratorio para el tratamiento del conducto distal del primer molar inferior de la rata[13,14]. Los animales fueron anestesiados con una dosis intraperitoneal de clorhidrato de ketamina (14 mg/kg) y acepromazina (10 mg/kg), y posteriormente ubicados en decúbito dorsal en una camilla especialmente diseñada para esta experiencia. En esa posición, se mantuvieron con las fauces abiertas mediante el empleo de una ligadura en los incisivos superiores, desplazando la lengua con un *clamp* atraumático[14] que permitía aislar la pieza dentaria del medio bucal. De esta manera, el primer molar inferior derecho quedaba completamente accesible para el operador. Las coronas dentarias fueron lavadas y desinfectadas con una solución antiséptica, y posteriormente fueron realizadas las aperturas en la fosa distal de la cara oclusal con una fresa redonda ½ (Dentsply/Maillefer, Ballaigues, Suiza), rotando a baja velocidad en un micromotor eléctrico y bajo constante refrigeración con suero fisiológico, penetrando lentamente con la fresa hasta la cámara pulpar. Se accedió al conducto distal con una lima K #08 (Dentsply/Maillefer) de 21 mm de longitud, y se removió el tejido pulpar mediante limas K #10 al #40, con una longitud de trabajo de 3,0 mm de profundidad. Para asegurar esto, se redujo en 17 mm la longitud total del instrumento por medio de la inserción de un tubo de teflón de esa medida a lo largo del vástago del mismo y adhiriéndolo a un tope de silicona de 1,0 mm de espesor. En dos casos fue necesario preparar y utilizar instrumentos de menor longitud en su extremo activo (Fig. 1). Luego de irrigar con solución de hipoclorito de sodio al 2,5%, seguido de un abundante lavaje con suero fisiológico, el conducto fue secado con

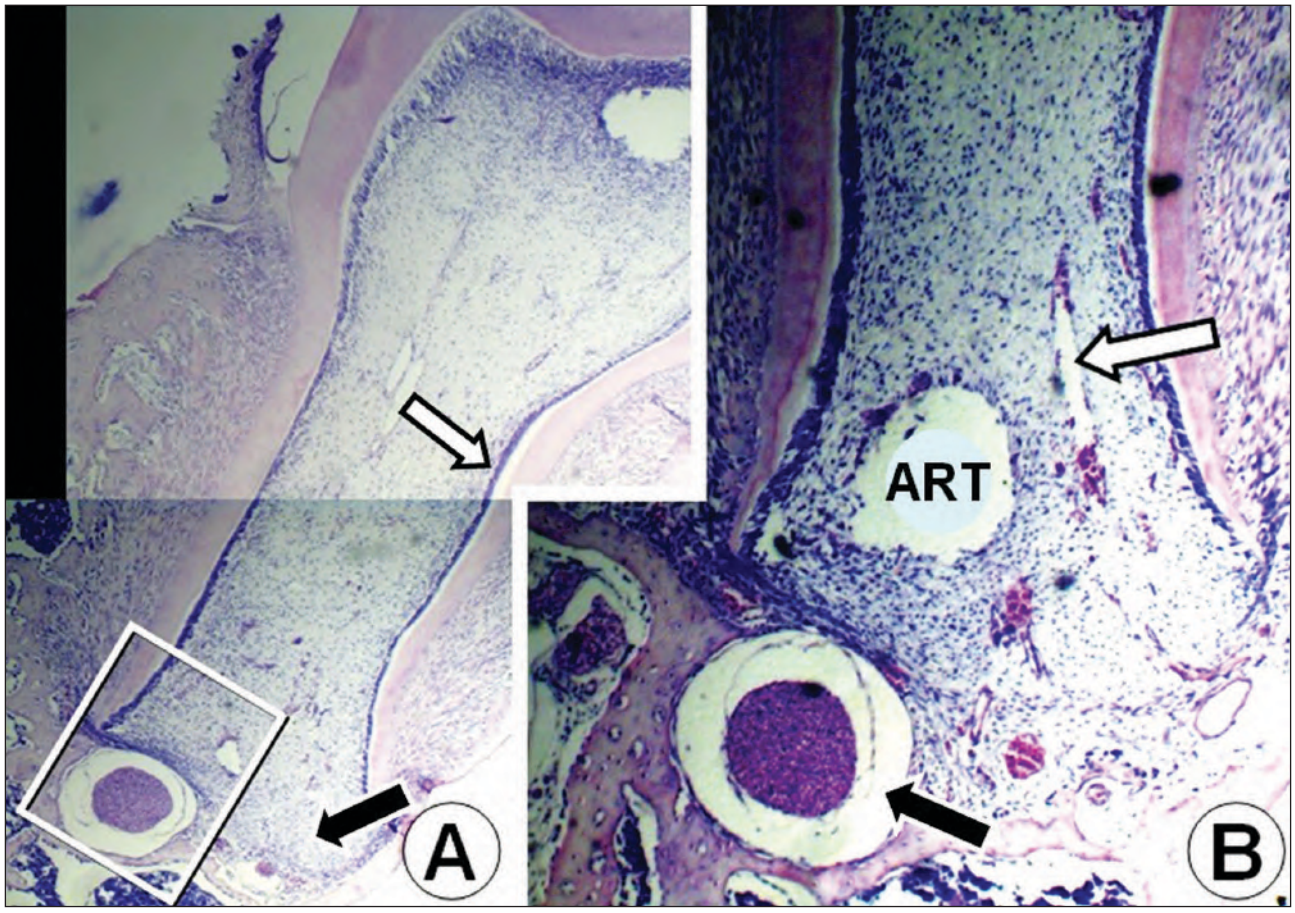



Figura 4. **A:** Imagen histológica compuesta de la raíz distal del primer molar inferior de un animal de control sacrificado a las 96 horas. Se observa un tejido pulpar normal, una hilera odontoblástica continua (flecha blanca) y la papila dental (flecha negra). **B:** Mayor aumento del área marcada en *A*. Se observa una pulpa dental normal, vasos sanguíneos (flecha blanca) y la papila dental. Lindando con el ápice, se puede observar el corte transversal de un nervio (flecha negra) y un artificio de técnica (ART). (Hematoxilina y eosina; magnificación original X 180).

conos de papel estériles y se provocó, mediante una lima K #15, una hemorragia apical con el objeto de inducir la formación de un coágulo en ese nivel. Los accesos fueron sellados con resina compuesta, luego del grabado de los bordes de la cavidad de acceso, durante quince segundos, con ácido fosfórico al 19% (Ultraecht, Ultradent Dental Products, UT, Estados Unidos). Los molares del lado izquierdo no fueron intervenidos; fueron utilizados como control negativo. Se mantuvo a los animales en el bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad del Salvador (USAL), en jaulas de acero inoxidable con agua potable y alimento balanceado ad líbitum, con temperatura ambiental controlada (24 ºC) y ciclos de luz-oscuridad de doce horas. Posteriormente, fueron sacrificados por medio de una sobredosis de solución anestésica; cinco de ellos, a las 96 horas, y los otros cinco, a los treinta días.

Las mandíbulas fueron resecadas, fijadas en formolbuffer al 10% (pH 7,4) y luego radiografiadas (Fig. 2). Los primeros molares, junto con las estructuras periodontales y óseas que los rodean, fueron cuidadosamente removidos en bloques, descalcificados en una solución saturada de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y procesados para su estudio histológico. Se obtuvieron secciones seriadas de aproximadamente 7 μm de espesor en sentido vestíbulo-lingual y orientadas paralelamente al eje longitudinal de la raíz distal, las que fueron finalmente coloreadas con hematoxilina y eosina. Las secciones fueron analizadas y fotografiadas con diferentes aumentos, por medio de un microscopio óptico equipado con una cámara digital Canon PowerShot A510 (Canon, Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas y analizadas por medio de un software (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos). Para la evaluación, se observaron –con diferentes aumentos– la presencia o ausencia de tejido vital sano dentro del conducto radicular previamente instrumentado, los patrones de revascularización y las posibles diferencias con los conductos de control.

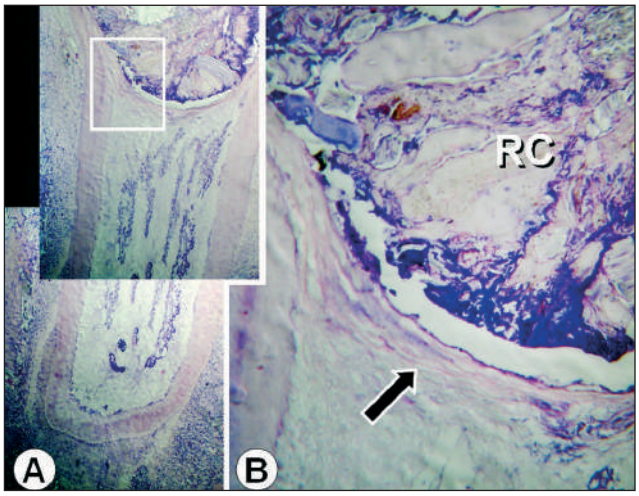



Figura 5. **A:** Imagen histológica compuesta de la raíz distal del primer molar inferior de un animal sacrificado a los treinta días. Se puede observar la presencia de un tejido fibroso similar al periodontal dentro del espacio del conducto radicular, y un mayor desarrollo de la raíz. En el extremo más apical, la imagen de cierre con tejido calcificado es un artificio de técnica provocado por la orientación oblicua del corte que pasa en el nivel de una de las paredes laterales de la raíz. (Hematoxilina y eosina; magnificación original X 80). **B:** Mayor aumento del área marcada en *A*. Se observa la presencia del material de obturación coronario (RC) y una banda fibrosa densa, sin células inflamatorias, que separa al material de obturación del tejido invaginado dentro del conducto. (Hematoxilina y eosina; magnificación original X 180).

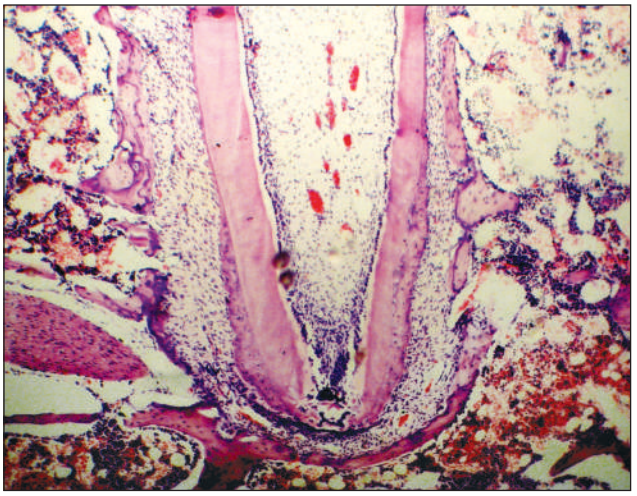


Figura 6. Imagen histológica de la raíz distal del primer molar inferior de un animal de control sacrificado a los treinta días. Se puede observar que la raíz prácticamente ha completado su desarrollo y el espacio del conducto radicular se encuentra ocupado por un tejido pulpar sano y muy vascularizado (hematoxilina y eosina; magnificación original X 80).

## Resultados

A las 96 horas, los ápices de los molares experimentales permanecían aún incompletamente calcificados, y se observó la invaginación de un nuevo tejido, similar al tejido periodontal, aún muy juvenil y con muchos vasos sanguíneos, que llenaba totalmente el conducto radicular. En un caso, la obturación coronaria se había perdido y el nuevo tejido invaginado dentro del conducto presentaba un área de inflamación crónica localizada (Fig. 3). Los molares de control mostraban un desarrollo radicular más extenso y definido, aún con los ápices incompletamente calcificados, donde podía observarse la papila dental, una importante concentración de odontoblastos, el desarrollo de una pulpa joven ricamente vascularizada y un mayor espesor dentinario (Fig. 4).

A los treinta días, los molares experimentales presentaron un mayor desarrollo radicular, y los conductos se encontraban ocupados por un tejido fibroso maduro, con numerosos vasos sanguíneos (Fig. 5). En contacto directo con el material de obturación en la cavidad de acceso, se observó una cápsula fibrosa densa sin células inflamatorias. Los controles revelaron un desarrollo radicular prácticamente completo, y un conducto radicular con un tejido pulpar sano, muy vascularizado, y mayor espesor de las paredes dentinarias (Fig. 6).

## Discusión

Si bien el estudio histológico de los procesos de revascularización y regeneración pulpar en humanos constituye el modelo ideal, a la vez presenta serios inconvenientes relacionados con los preceptos de ética que regulan los procedimientos aceptables para la investigación científica. En ese sentido, los test de uso en animales de laboratorio permiten obtener una valiosa información al respecto. Los molares inferiores de la rata han sido históricamente utilizados para el desarrollo de diferentes experiencias y han demostrado ser un modelo experimental adecuado para la investigación científica en endodoncia[15-20]. Estudios previos[20] han determinado que la rata presenta ciertas similitudes con otras especies animales, incluso con la humana, respecto de la anatomía de los tejidos periodontales y la respuesta inflamatoria periapical a diferentes estímulos. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que la anatomía radicular apical es estructuralmente diferente de la del modelo humano.

En 2004, Gómez y Cabrini[22] informaron acerca de importantes variaciones anatómicas luego de completarse el desarrollo radicular, tales como la aposición de una gran cantidad de cemento (cementosis) que puede incluso producirse dentro de la luz del conducto radicular, en el tercio apical de las raíces dentarias de la

rata, luego del segundo mes de vida y una vez que los animales han superado los 200 g. En este estudio, sin embargo, estas diferencias estructurales no constituyeron un inconveniente, ya que siguiendo el protocolo del proyecto se utilizaron animales de ± 80 g, con sus ápices incompletamente calcificados, cuyo desarrollo radicular se encontró prácticamente completo al finalizar la experiencia, lo cual permitió comparar el desarrollo de los molares experimentales con el de los molares de control. El empleo de una longitud de trabajo no superior a los 3,0 mm (salvo en dos casos) para la extirpación de la pulpa en las raíces incompletamente calcificadas se basó en los resultados de una experiencia piloto (Álvarez Serrano *et al*., 2010; datos no publicados), quienes analizaron veinte primeros molares inferiores extraídos de ratas Wistar de ± 80 g y observaron que la longitud promedio de la raíz distal era de 3,0 mm (rango 2,5-4,0 mm), desde la superficie oclusal hasta el extremo más apical.

El nuevo tejido invaginado dentro del conducto radicular en los molares experimentales presentaba características similares a las del tejido periodontal. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos previamente por Kling *et al*.[23], posteriormente confirmados por Vojinovic y Vojinovic[24], Nelson Filho *et al*.[25] y Wang *et al*.[26], quienes indicaron que cuando la pulpa y la papila dental son eliminadas o destruidas, solamente puede invaginarse dentro del conducto radicular tejido periodontal e incluso hueso y cemento. Sin embargo, debemos reconocer que la no identificación positiva de la sialofosfoproteína –una proteína específicamente expresada por odontoblastos– constituyó una limitación en nuestro protocolo, ya que no se pudo determinar con certeza la verdadera naturaleza de las células participantes en la formación de los nuevos tejidos calcificados durante el desarrollo radicular en los molares experimentales. El uso de estos marcadores, así como el tratamiento de los cortes histológicos mediante coloraciones argénticas para detectar la presencia de fibras nerviosas en los tejidos invaginados, son procedimientos que forman parte del protocolo de las investigaciones que se encuentran actualmente en desarrollo.

## Conclusión

Dentro de las limitaciones del presente trabajo, los resultados sugieren que el conducto distal del primer molar inferior de la rata podría constituir un modelo adecuado para el estudio de los procesos de revascularización y regeneración de tejidos dentro del conducto radicular, una vez que la pulpa y la papila dental han sido destruidas.

*Los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con este estudio y afirman no haber recibido financiamiento externo para realizarlo.*

## Bibliografía

1. Kerekes K, Heide S, Jacobsen I. Follow-up examination of endodontic treatment in traumatized juvenile incisors. *J Endod* 1980;6:744-8.
2. Parirokh M, Torabinejad M. Mineral Trioxide Aggregate. A comprehensive literature review - Part III: Clinical applications, drawbacks, and mechanism of action. *J Endod* 2010;36:400-13.
3. Rafter M. Apexification: a review. *Dent Traumatol* 2005;21:1-8.
4. Giuliani V, Baccetti T, Pace R, Pegavino G. The use of MTA in teeth with necrotic pulps and open apices. *Dent Traumatol* 2002;18:217-21.
5. Andreasen JO, Farik B, Munksgaard EC. Long-term calcium hydroxide as a root canal dressing may increase risk of root fracture. *Dent Traumatol* 2002;18:134-7.
6. Banch F, Trope M. Revascularization of immature permanent teeth with apical periodontitis: new treatment protocol? *J Endod* 2004;30:196-200.
7. Thibodeau B, Teixeira F, Yamauchi M, Caplan DJ, Trope M. Pulp revascularization of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2007;33:680-9.
8. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang GTJ. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after the revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:56-63.
9. Nevins AJ, Finkelstein F, Borden BG, Laporta R. Revitalization of pulpless open apex teeth in Rhesus monkeys using collagen-calcium phosphate gel. *J Endod* 1976;2:159-65.
10. Torabinejad M, Corr R, Buhrley M, Wright K, Shabahang S. An animal model to study regenerative endodontics. *J Endod* 2011;37:197-202.
11. ISO 10993-2:1992. Biological evaluation of medical devices - Part 2: Animal welfare requirements. Ginebra. 1992.
12. Bayne K. Developing guidelines of the care and use of animals. *Ann NY Acad Sci* 1998;30:105-10.
13. Martínez Lalis R, Zmener O, Chaves C, Kokubu GA, Grana DR, Pameijer CH. Reliability of an electronic apex locator in experimental root canal treatment in rats: A preliminary methodology study. *Endod Pract* 2010;13:19-23.
14. Martínez Lalis R, Kokubu GA, Grana DR, Chaves C, Zmener O. Respuesta del tejido periapical de la rata al

ProRoot MTA y a un cemento Portland modificado. *Rev Asoc Odontol Argent* 2010;98:53-9.
15. Maurice G, Schour I. Experimental cavity preparations in the molar of the rat. *J Dent Res* 1955;34:429-34.
16. Paynter KJ, Wood AWS. A method for testing pulpal response to stimuli using the rat molar. *J Canad Dent Assoc* 1955;21:145-54.
17. Erausquin J, Muruzabal M. A method for root canal treatment in the molar of the rat. *O Surg O Med O Pathol* 1967;24:540-6.
18. Muruzabal M, Erausquin J, Devoto FCH. A study of periapical overfilling in root canal treatment in the molar of rat. *Arch Oral Biol* 1966;11:373-83.
19. Erausquin J, Muruzabal M, Devoto FCH, Rikles A. Necrosis of the periodontal ligament in the rat induced by root canal overfillings. *J Dent Res* 1966;45:1084-92.
20. Tepel J, Darwisch M, Hoppe W. Reaction of inflamed periapical tissue to intracanal medicaments and root canal sealers. *Endod Dent Traumatol* 1994;10:233-8.
21. Yu SM, Stashenko P. Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *J Endod* 1987;13:535-40.
22. Gómez P, Cabrini RL. Anatomic variations of the root canal of the rat according to age. *Acta Odont Latinoamer* 2004;17:39-42.
23. Kling M, Cvek M, Mejare L. Rate and predictability of pulp revascularization in therapeutically reimplanted permanent incisors. *Endod Dent Traumatol* 1986;2:83-9.
24. Vojinovic O, Vojinovic J. Periodontal cell migration into the apical pulp during the repair process after pulpectomy in immature teeth: An autoradiographic study. *J Oral Rehabil* 1993;20:637-52.
25. Nelson Filho P, De Oliveira PT, Da Silva RAB. Partial replacement of the dentin-pulp complex by periodontal supporting tisues in traumatically intruded primary maxillary incisor. *Dent Traumatol* 2008;24:553-5.
26. Wang X, Thibodeau B, Trope M, Lin LM, Huang T-J. Histologic characterization of regenerated tissues in canal space after revitalization/revascularization procedure of immature dog teeth with apical periodontitis. *J Endod* 2010;36:56-63.

***Contacto:***
Osvaldo Zmener
osvaldo@zmener.com.ar