

Reacción del tejido celular subcutáneo de la rata a implantes de conos de Resilon y conos de gutapercha

Reaction of the subcutaneous connective tissue of the rat to Resilon and gutta-percha cones implants

Presentado: 18 de marzo de 2015

Aceptado: 1 de octubre de 2015

Santiago Frajlich,^a Carlos Cantarini,^b Osvaldo Zmener,^c Carla Goroni^d^aCátedra de Endodoncia II;^bCátedra de Endodoncia I;^cCarrera de Especialización en Endodoncia;^dCátedra de Patología;

Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Odontología, Universidad del Salvador / Asociación Odontológica Argentina

Resumen

Objetivo: Evaluar la respuesta del tejido celular subcutáneo de la rata a implantes de conos de Resilon (CRE) y conos de gutapercha (CGP).

Materiales y métodos: Se implantaron en el tejido celular subcutáneo de ratas conos de CRE y CGP de medidas similares y conicidad .04. La respuesta de los tejidos circundantes se analizó a los 14 y a los 84 días posimplantación. La reacción a los materiales implantados fue clasificada en cuatro categorías, en función del grado creciente de inflamación, y los resultados fueron sometidos a un análisis estadístico.

Resultados: A los 14 días, se observó en contacto con CRE y con CGP una cápsula de tejido fibroso joven de poco espesor, vasos de neoformación y áreas ocupadas por escasas células inflamatorias, especialmente linfocitos y plasmocitos. Sólo tres casos de CRE y dos casos de GCP presentaron un grado de inflamación mayor en los tejidos circundantes. Luego de 84 días, la reacción a CRE o CGP se redujo y fue similar para ambos materiales en todos los especímenes. Los conos estaban rodea-

dos por un tejido conectivo fibroso maduro y denso, de mayor espesor, y escasos linfocitos y plasmocitos remanentes en los tejidos circundantes, con la singularidad de que en áreas aisladas y adyacentes a los CGP se observó la presencia de partículas aparentemente liberadas por los conos, fagocitadas por macrófagos. Las diferencias entre CRE y CGP, tanto en un mismo período como entre ambos períodos de observación, no fueron significativas ($p > 0,05$).

Conclusión: Luego de 84 días, los conos de CRE y CGP no se comportaron como materiales totalmente inertes en el tejido celular subcutáneo de la rata. La persistencia de algunas células inflamatorias en los tejidos circundantes a los CRE y los CGP, y la actividad macrofágica estimulada por la presencia de partículas liberadas por los CGP, sugieren evitar en lo posible la sobreobturación con los conos y mantenerlos dentro de los límites del conducto radicular.

Palabras clave: Biocompatibilidad, gutapercha, Resilon, respuesta tisular.

Abstract

Aim: To evaluate the response of the subcutaneous connective tissue of the rat to Resilon (CRE) or gutta-percha cones (CGP) implants. **Material and methods:** Resilon (CRE) and gutta-percha (CGP) cones of similar sizes and .04 taper were implanted in the subcutaneous con-

nective tissue of the rat. The response of the surrounding tissues was analyzed after 14 and 84 days postoperatively. The tissue reaction was classified into four categories according to the severity of the inflammation and the results were statistically analyzed.

Results: After 14 days a low thickness juvenile fibrous capsule along with newly formed blood vessels and scarce inflammatory cells, mainly lymphocytes and plasmocytes, was observed in direct contact with CRE and CGP. Only three samples of CRE and two samples of CGP showed a higher grade of inflammation in the surrounding tissues. After 84 days, the tissue reaction to CRE and CGP decreased and was similar in all samples. The cones were surrounded by with a mature and dense fibrous connective tissue of higher thickness along with scarce lymphocytes and plasmocytes. Isolated areas adjacent to the CGP revealed the presence of black particles probably released from the cones which were phagocytized by macrophages. The differences ob-

served between CRE and CGP within the same period as well as among both observation periods were statistically not significant ($p > 0.05$)

Conclusion: After 84 days both, CRE and CGP behaved as not totally inert materials when they were implanted into the subcutaneous connective tissue of the rat. The persistence of some inflammatory cells in the tissues surrounding the CRE and CGP and the macrophagic activity stimulated by the presence of particles released from the CGP suggest that overfilling should be avoided and that the use of cones should be limited to the root canal space.

Key words: Biocompatibility, gutta-percha, Resilon, tissue response

Introducción

Luego de la instrumentación, la irrigación y la desinfección del sistema de conductos radiculares, el uso de un material biocompatible y bien tolerado por los tejidos periapicales para su obturación es fundamental e incide significativamente en el éxito a distancia del tratamiento endodóntico.¹ Si bien se ha sugerido una variedad de materiales y técnicas con ese objetivo, el empleo de conos de gutapercha (CGP) complementados por un sellador continúa siendo uno de los procedimientos universalmente más difundidos.² Durante la última década, los selladores endodónticos a base de metacrilatos hidrófilos han ganado popularidad entre los especialistas, y actualmente han sido aceptados por la American Dental Association.³ Los informes preliminares^{4,5} han demostrado que proveen un sellado adecuado mediante un proceso de adhesión micromecánica con la dentina de las paredes radiculares. Sin embargo, no se adhieren a la superficie de los CGP, lo cual constituye una vía fácilmente accesible a la penetración de bacterias o fluidos del medio bucal, especialmente en los casos en los que la restauración coronaria ha fracasado o se ha perdido. A fin de obtener una adhesión efectiva entre sellador y conos, se ha introducido en el mercado una serie de conos de un material denominado Resilon (CRE; Resilon Research LLC, Madison, CT, Estados Unidos). Los CRE presentan medidas y conicidades similares a los CGP convencionales, y su uso en la clínica ha demostrado resultados promisorios.⁶⁻⁸ De acuerdo a un informe preliminar,⁹ los CRE están constituidos por una resina termoplástica sintética a base de un polímero poliéster (policaprolactona), por partículas de vidrio bioactivo, oxiclورو de bismuto y sulfato de bario, con un relleno de aproximadamente 65% de su peso total.

La posibilidad de que los selladores o los conos entren en contacto con los tejidos periapicales a causa de una sobreobturación accidental constituye una situación

bastante frecuente en endodoncia.¹⁰ Si bien la biocompatibilidad de la gutapercha fue analizada bajo diferentes condiciones experimentales,¹¹⁻¹⁵ las propiedades biológicas de los CRE aún no han sido bien determinadas. El objetivo de este ensayo fue analizar comparativamente la biocompatibilidad de CRE y CGP (estos últimos, utilizados como control positivo) implantados en el tejido celular subcutáneo de la rata. La hipótesis nula establece que no hay diferencias significativas entre ambos materiales.

Materiales y métodos

El protocolo de este estudio fue revisado y aprobado por la Comisión de Ética para la Investigación Científica de la Universidad del Salvador / Asociación Odontológica Argentina.

En este trabajo se utilizaron conos de CRE y de CGP (Maillefer/Dentsply, Ballaigues, Suiza) #40, de conicidad .04, obtenidos al azar de diferentes avíos comerciales nuevos, los cuales fueron previamente esterilizados por medio de rayos gamma.

Los conos se implantaron en el tejido celular subcutáneo de 20 ratas Wistar macho de aproximadamente 200 gramos. Los animales fueron tratados conforme a los requerimientos de las normas ISO 10993-1-1992 e ISO 10993-2-1992,^{16,17} y según los principios éticos de experimentación y las especificaciones para el cuidado y el uso de animales de laboratorio.¹⁸ Fueron puestos en cuarentena durante los 7 días previos a los procedimientos de implantación, a efectos de asegurar que se encontraran en óptimas condiciones de salud. Durante todo el experimento, se tuvo especial cuidado de mantener a los animales confortables y sin dolor. La preparación de los especímenes y los procedimientos quirúrgicos de implantación fueron realizados bajo condiciones de esterilidad y de acuerdo a los procedimientos descriptos en una comunicación anterior.¹⁹

Luego de que los animales fueran anestesiados por medio de una dosis intraperitoneal de clorhidrato de ketamina (14 mg/kg) y acepromazina (10 mg/kg), la piel de la zona dorsal de cada uno de ellos fue rasurada y desinfectada con una solución de yodo/povidona al 10% (Phoenix SAIC, Buenos Aires, Argentina). Posteriormente, se realizó una incisión de aproximadamente 20 mm de longitud a través de la piel por medio de un escalpelo, y se prepararon en la zona subcutánea y a cada lado de la línea media dos áreas en forma de bolsillo de 28 mm de longitud, insertándose cuidadosamente en una de ellas un CGP y en la otra un CRE, manteniendo el mismo esquema de implantación en todos los animales. Los implantes se ubicaron cada uno de ellos a una distancia de aproximadamente 20 mm de la línea media, a fin de evitar interferencias entre la reacción de los tejidos a uno u otro material. Finalmente, los bordes de la herida fueron unidos mediante cianoacrilato (Ciano Anaeróbicos IWT, Buenos Aires, Argentina).

Los animales se mantuvieron en el bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad del Salvador, en jaulas de acero inoxidable con alimento balanceado expandido (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) y agua potable *ad libitum*, con temperatura ambiental controlada (24 °C) y ciclos de luz-oscuridad de doce horas. La eutanasia fue realizada por medio de una sobredosis de solución anestésica en grupos de 10, a los 14 y los 84 días posimplantación.

Los implantes junto con los tejidos circundantes fueron removidos quirúrgicamente y fijados en solución de formol-buffer al 10% (pH 7,4). Luego de la fijación, los especímenes se incluyeron en parafina y se procesaron para su evaluación histológica.

Previamente a la implantación de los conos, y con el objetivo de estandarizar la muestra, se había medido en cada uno de ellos el diámetro externo de su sección circular a una distancia de 1 mm de su extremo más grueso con un calibre Renfert 1119 (Hilzingen, Alemania). En ese punto, cuya medición determinó un diámetro promedio de 1,3 mm, se obtuvieron secciones de aproximadamente 7 µm de espesor de forma transversal al eje mayor de los conos. Los cortes se colorearon alternativamente con hematoxilina y eosina o con tricrómico de Masson, y se analizaron y fotografiaron a diferentes aumentos por medio de un microscopio óptico Ultraphot II (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Canon Powershot A510 (Canon, Tokio, Japón). Las imágenes fueron capturadas y analizadas por medio de un programa (Image Pro Plus; Media Cybernetics, Silver Spring, MD, Estados Unidos). La evaluación fue realizada por dos observadores previamente

calibrados. En los casos en los que no hubo acuerdo, los preparados histológicos fueron analizados nuevamente en conjunto hasta obtener consenso entre ambos observadores.

Los parámetros considerados para la evaluación fueron la presencia y el espesor de una cápsula fibrosa, los cambios vasculares y el tipo de células inflamatorias presentes. El criterio utilizado para evaluar la reacción de los tejidos fue el siguiente: *Grado 0 (sin reacción)*: formación de cápsula fibrosa y ausencia de células inflamatorias. *Grado 1 (reacción mínima)*: presencia de cápsula fibrosa, acompañada por áreas aisladas ocupadas por escasos linfocitos y plasmocitos, y por vasos de neoformación. *Grado 2 (reacción moderada)*: presencia de cápsula fibrosa y numerosos linfocitos, plasmocitos, macrófagos, vasos de neoformación, y eventualmente de algunos polimorfonucleares neutrófilos. *Grado 3 (reacción severa)*: presencia de cápsula fibrosa y de gran cantidad de polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, plasmocitos, macrófagos, células gigantes multinucleadas, y numerosos capilares de neoformación congestionados.

Los datos obtenidos fueron analizados por medio de la prueba exacta de Fischer, a fin de determinar si existió una diferencia significativa entre los CRE y los CGP en cada uno de los períodos estudiados, y el efecto total producido por los factores tiempo y material sobre la reacción de los tejidos.

El nivel de significación fue establecido en $p < 0,05$.

Resultados

El número total de implantes por material y por período de tiempo, y los resultados de la evaluación histológica, pueden observarse en las tablas 1 y 2 respectivamente. Al finalizar cada uno de los períodos posoperatorios, la observación macroscópica en el nivel de las áreas implantadas reveló que las heridas cicatrizaron normalmente y que los animales se encontraban en perfecto estado de salud.

A los 14 días, la reacción de los tejidos en contacto con los CRE fue clasificada de Grado 2 en 3 (n=3) casos, y de Grado 1 en los 7 (n=7) casos restantes. En contacto con los CGP, la reacción de los tejidos fue considerada de Grado 2 en 2 (n=2) casos, y de Grado 1 en los 8 (n=8)

Tabla 1. Cantidad y distribución de los implantes en los diferentes períodos de observación.

| Días | CRE (n) | GCP (n) | Total (n) |
|------|---------|---------|-----------|
| 14 | 10 | 10 | 20 |
| 84 | 10 | 10 | 20 |

casos restantes. En los casos clasificados de Grado 2, los conos estaban rodeados por un tejido fibroso invadido por células inflamatorias, especialmente linfocitos, plasmocitos, macrófagos y vasos de neoformación. En los casos clasificados de Grado 1, los conos se encontraban rodeados por una banda de tejido fibroso, y por la presencia de escasas células inflamatorias y vasos de

neoformación en áreas aisladas adyacentes a los conos o en los tejidos circundantes (figs. 1 y 2).

A los 84 días, la reacción de los tejidos en contacto con los CRE fue considerada de Grado 1 en todos los casos. Los conos se encontraban rodeados por un tejido fibroso denso de mayor espesor, bien definido y con vasos de neoformación. En los tejidos circundantes, se

Tabla 2. Grado de reacción a los materiales implantados en función del tiempo.

| Material | 14 días | | | | | 84 días | | | | |
|----------|---------|-----|---|---|-----|---------|-----|----|-----|-----|
| | n | 0 | 1 | 2 | 3 | n | 0 | 1 | 2 | 3 |
| CRE | 10 | --- | 7 | 3 | --- | 10 | --- | 10 | --- | --- |
| CGP | 10 | --- | 8 | 2 | --- | 10 | --- | 10 | --- | --- |

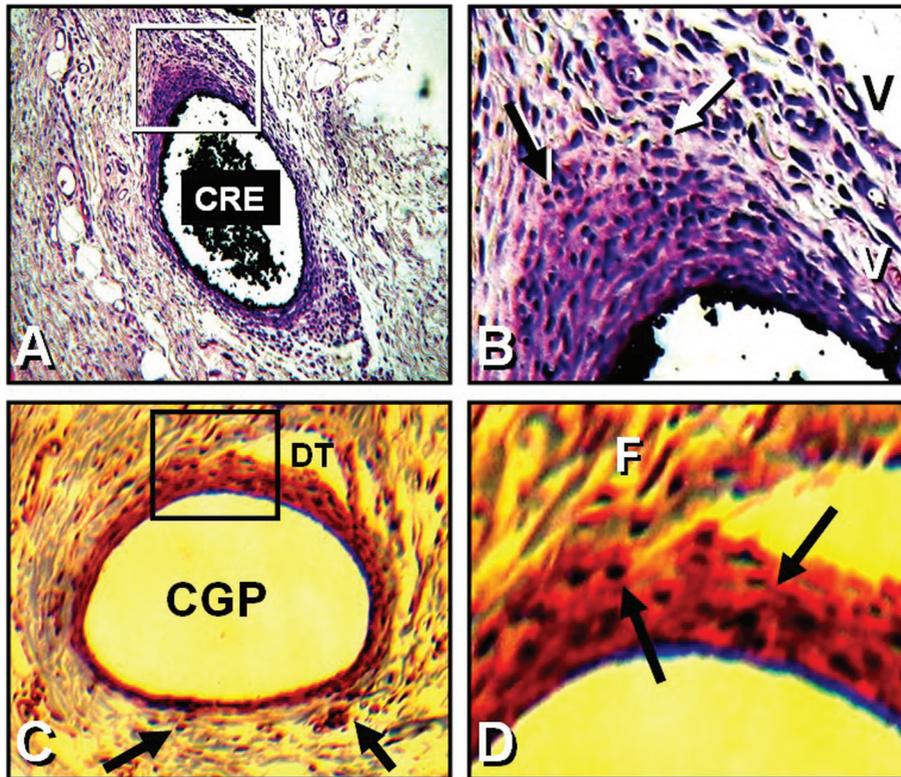


Figura 1. A: Microfotografía de un espécimen representativo de CRE a los 14 días posimplantación, catalogado como Grado 2. Se observa un tejido fibroso invadido por células inflamatorias que rodea al cono. (Hematoxilina y eosina X40). B: Mayor aumento del área del recuadro marcado en A. En contacto con el cono se observa un importante infiltrado de células inflamatorias constituido por linfocitos (flecha blanca), plasmocitos (flecha negra), macrófagos y vasos de neoformación (V). (Hematoxilina y eosina X400). C: Microfotografía de un espécimen representativo de CGP a los 14 días posimplantación, catalogado como Grado 2. El cono está rodeado por un tejido fibroso invadido por células inflamatorias. En los tejidos circundantes se pueden observar células inflamatorias dispersas o en conglomerados (flechas). (Hematoxilina y eosina X100; DT: defecto de técnica). D: Mayor aumento del área del recuadro marcado en C. Se observa un importante infiltrado inflamatorio invadiendo el tejido fibroso que rodea el cono (flechas). (Tricrómico de Masson X1000; F: fibroblastos).

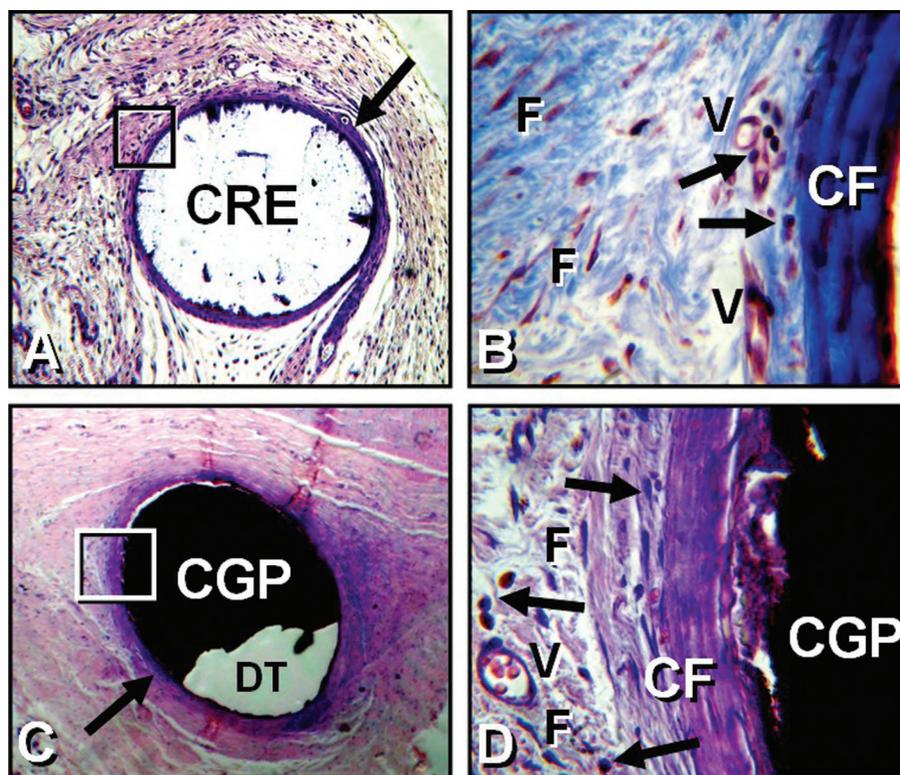


Figura 2. A: Microfotografía de un espécimen representativo de CRE a los 14 días posimplantación, catalogado como Grado 1. El cono se encuentra rodeado por una cápsula fibrosa (flecha) (Hematoxilina y eosina X40). B: Mayor aumento del área del recuadro marcado en A. Se puede observar la cápsula fibrosa (CF) que rodea al cono, escasas células inflamatorias cercanas (flechas) y vasos de neoformación (V). En las áreas circundantes se ve un tejido colágeno denso y numerosos fibroblastos (F). (Tricrómico de Masson X400). C: Microfotografía de un espécimen representativo de CGP a los 14 días posimplantación catalogado como Grado 1, rodeado por una cápsula fibrosa (flecha). (Hematoxilina y eosina X40; DT: defecto de técnica). D: Mayor aumento del área del recuadro marcado en C. Se observan escasas células inflamatorias dentro de la cápsula y en áreas cercanas a ésta (flechas), vasos de neoformación (V) y fibroblastos (F). (Hematoxilina y eosina X1000; CF: cápsula fibrosa, CGP: cono de gutapercha).

observó la presencia de escasas células inflamatorias, especialmente linfocitos y plasmocitos. En contacto con los CGP, la reacción de los tejidos también fue considerada de Grado 1 en todos los casos, con pocos linfocitos y plasmocitos en los tejidos circundantes, pero con la singularidad de que en 7 (n=7) de los especímenes se observó –en áreas aisladas y adyacentes a los conos– la presencia de partículas, probablemente liberadas a partir del material, que estaban siendo fagocitadas por macrófagos (fig. 3). El análisis estadístico de los datos, realizado mediante la prueba exacta de Fischer, demostró que las diferencias observadas entre CRE y CGP –tanto en un mismo período como entre ambos períodos– no fueron significativas ($p > 0,05$), razón por la cual la hipótesis nula fue aceptada.

Discusión

La implantación en el tejido celular subcutáneo de ratas constituye un procedimiento válido como ensayo secundario para el estudio de la biocompatibilidad de materiales endodónticos.^{20,21} Este ensayo permitió analizar la reacción del tejido a los implantes de CRE, cuyas propiedades biológicas aún no han sido adecuadamente investigadas. Los resultados fueron desarrollados de forma descriptiva y categorizados de acuerdo al tipo de reacción observada. Los períodos de tiempo utilizados están comprendidos dentro de los plazos establecidos por los estándares internacionales para el estudio de biomateriales.¹⁹ Los CGP fueron utilizados como control positivo, ya que su comportamiento biológico ha sido previamente informado por diferentes autores,¹¹⁻¹⁴

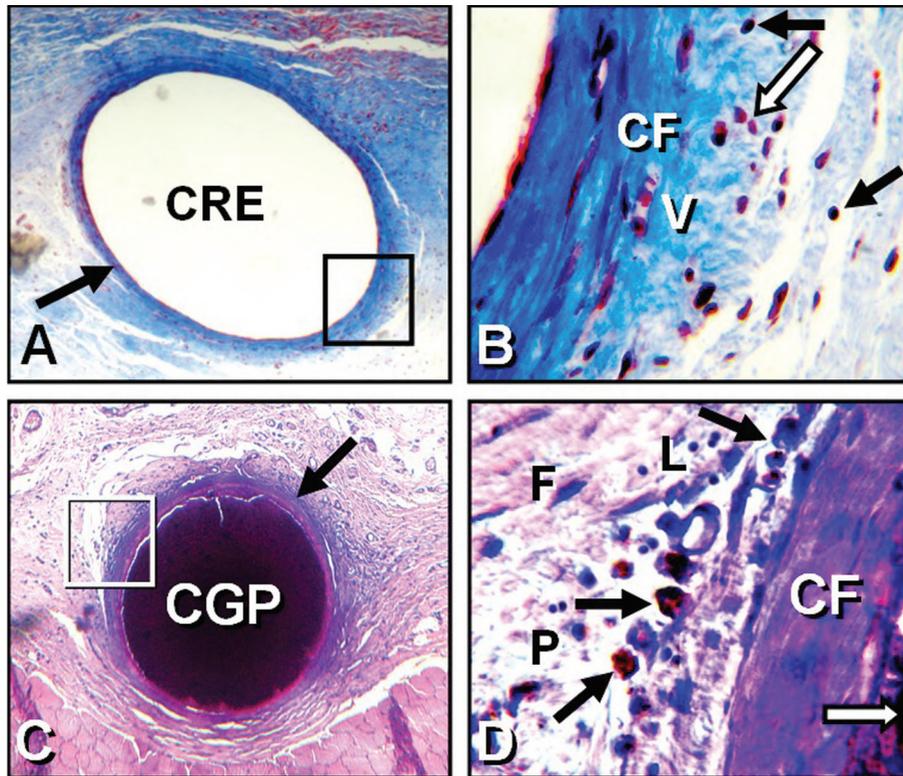


Figura 3. A: Microfotografía de un espécimen representativo de CRE a los 84 días posimplantación, catalogado como Grado 1. El cono se encuentra rodeado por una cápsula fibrosa (flecha) (Tricrómico de Masson X40). B: Mayor aumento del área del recuadro marcado en A. Se observa la cápsula fibrosa (CF) con vasos de neoformación (V), escasos linfocitos (flechas negras) y plasmocitos (flecha blanca) (Tricrómico de Masson X1000). C: Microfotografía de un espécimen representativo de CGP a los 84 días posimplantación, catalogado como Grado 1. El cono se encuentra rodeado por una cápsula fibrosa (flecha). (Hematoxilina y eosina X40). D: Mayor aumento del área del recuadro marcado en C. La figura muestra la presencia de escasos linfocitos (L) y partículas fagocitadas por macrófagos (flechas negras). (Hematoxilina y eosina X1000; P: plasmocito, F: fibroblasto, CF: cápsula fibrosa; flecha blanca: cono de gutapercha).

quienes consideran que, aunque no totalmente inertes, constituyen uno de los materiales de obturación endodóntica mejor tolerados por los tejidos vitales.¹¹ En investigaciones previas,¹¹⁻¹⁴ los CGP han demostrado ser biocompatibles bajo diferentes condiciones experimentales, propiedad que no pudo ser totalmente confirmada en el presente estudio.

Es importante destacar que la sección circular original de algunos especímenes sufrió deformaciones inherentes al proceso de corte histológico. Sin embargo, estos defectos de técnica no impidieron la correcta lectura y la identificación del tipo y el grado de la reacción de los tejidos producida por los materiales implantados. La reacción observada inicialmente en los tejidos en contacto con CRE no resultó del todo inesperada, ya que –como fuera previamente demostrado– en un medio biológico los CRE sufren un proceso de degradación alcalina²² y enzimática,²³ liberando rápidamente una cantidad de

subproductos que pueden resultar irritantes para los tejidos. Esta degradación continúa (aunque de forma más atenuada) en los períodos de observación más extensos, lo cual explicaría de alguna forma la persistencia de cierta cantidad de linfocitos y plasmocitos a los 84 días posimplantación. Sin embargo, resultó interesante observar que, a pesar de la persistencia de subproductos de la degradación de los CRE, la reacción de los tejidos no sufrió variantes importantes al finalizar la experiencia.

La reacción de los tejidos en contacto con CGP tampoco fue del todo inesperada, y los resultados concuerdan sólo parcialmente con los estudios de Wolfson y Seltzer¹² y de Holland *et al.*,¹³ quienes implantaron conos de gutapercha de diferentes marcas comerciales en el tejido celular subcutáneo de ratas y comprobaron que, luego de una leve reacción inflamatoria inicial, los conos son rodeados por una cápsula fibrosa sana, por lo que consideran que, a pesar de la reacción inflamatoria inducida

inicialmente, la gutapercha es un material de obturación que no produce efectos tóxicos sobre los tejidos en el mediano y el largo plazo. Si bien en el presente ensayo inicialmente se detectaron cambios inflamatorios importantes en dos especímenes en los tejidos en contacto con los CGP, a los 84 días todos los casos fueron catalogados de Grado 1; se pudo comprobar la persistencia de escasos linfocitos y algún plasmocito, con la singularidad de que, en áreas aisladas y cercanas a los CGP, se observaron partículas del material liberadas en los tejidos circundantes, estimulando a su vez la confluencia de macrófagos y la fagocitosis del material liberado. Estas observaciones concuerdan con las de Sjögren *et al.*,²⁴ quienes obtuvieron resultados similares cuando implantaron piezas de gutapercha en el tejido celular subcutáneo de cochinitos de Guinea. Esto se explica porque, al igual que los CRE, los CGP también se encuentran expuestos a un proceso de degradación, en este caso mediante un mecanismo oxidativo,^{25,26} lo cual confirma los resultados de una experiencia preliminar²⁷ en la que, en contacto con probetas de gutapercha termoplastizada implantadas en el tejido celular subcutáneo de ratas, se observó un tejido fibroso denso, con la presencia de numerosos macrófagos fagocitando partículas del material en los períodos de observación más extensos. Otra observación interesante fue que los resultados de este trabajo concuerdan ampliamente con los obtenidos por Cardoso *et al.*²⁸ y Zmener *et al.*,²⁹ quienes también implantaron conos de Resilon y conos de gutapercha en el tejido celular subcutáneo de ratas. Lo relevante de este dato fue que los resultados obtenidos fueron similares a pesar de haberse utilizando modelos experimentales diferentes.

Dentro de las limitaciones de este trabajo, los CRE y los CGP no parecerían comportarse como materiales totalmente inertes cuando se implantan en el tejido celular subcutáneo de la rata. Sin embargo, las observaciones realizadas durante la implantación de un biomaterial en tejido celular subcutáneo no pueden ser extrapoladas de forma directa a lo que ocurre en la situación clínica real, y por lo tanto los resultados obtenidos deberían ser analizados con cautela. En ese sentido, debería tenerse en cuenta que los tejidos periapicales presentan diferencias estructurales importantes, y que el comportamiento biológico de los CRE o los CGP en el tejido periodontal podría ser sustancialmente diferente.^{30,31} Esto es especialmente cierto a partir de las observaciones de Serene *et al.*,³² quienes demostraron que tanto los CGP como sus componentes se comportan como activadores potenciales del complemento. De esta forma, podrían inducir –en el mediano y el largo plazo– el desarrollo de una

reacción inflamatoria e impedir la reparación de los tejidos periapicales en casos de sobreobturaciones,³⁰ lo que de alguna manera constituye una limitación del presente estudio, ya que estos aspectos no fueron considerados en nuestro protocolo y requieren ser investigados más exhaustivamente.

Conclusiones

La persistencia de una reacción inflamatoria de Grado 1 inducida por los CRE y los CGP, y la actividad macrofágica observada en contacto con los CGP a los 84 días posimplantación, sugieren que en la situación clínica deberían tomarse los recaudos necesarios para que tanto los CRE como los CGP queden siempre ajustados a la longitud de trabajo y, por lo tanto, confinados dentro del conducto radicular.

Agradecimientos: Al Profesor Ricardo Macchi, por su colaboración en el análisis estadístico de los datos; y a la Sra. Marcela Álvarez, por su ayuda técnica. A la Asociación Odontológica Argentina, por el subsidio otorgado para la financiación del presente estudio.

Los autores declaran no tener conflictos de interés en relación con este estudio.

Referencias

1. Nguyen TN. Obturation of the root canal system. En: Cohen S, Burns RC. *Pathways of the pulp*. 4ª ed., St Louis, Mosby, 1987, pp. 183-94.
2. Taintor JF, Ross PN. Opinions and practices of American Endodontic Diplomates. *Dent J* 1978;44:321-5.
3. ADA Council of Scientific Affairs. Statement on posterior resin-based composites. ADA Council on Dental Benefit Programs. *J Am Dent Assoc* 1998;129:1627-8.
4. Pameijer CH, Zmener O. Resin materials for root canal obturation. *Dent Clin North Am* 2010;54:325-44.
5. Shokouhinejad N, Sabeti M, Gorgestani H, Saghiri MA, Lotfi M, Hoseini A. Penetration of Epiphany, Epiphany self-etch and AH Plus into dentinal tubules: A scanning electron microscopy study. *J Endod* 2011;37:1316-9.
6. Debelian G. Treatment outcome of teeth treated with an evidence-based disinfection protocol and filled with Resilon. *J Endod* 2006;32:251.
7. Oya EO. Case report. 90 clinical cases of root treatment canal filled with Resilon: two-year follow-up. *J Endod* 2008;34:349.
8. Cotton TP, Schindler WG, Schwartz SA, Watson WR, Hargreaves KM. A retrospective study comparing clinical outcomes after obturation with Resilon/Epiphany or gutta-percha/Kerr sealer. *J Endod* 2008;34:789-97.
9. Barnett F, Trope M. Resilon: a novel material to replace gutta-percha. *Contemp Endod* 2004;1:16-9.
10. Augsburg RA, Peters DD. Radiographic evaluation of extruded obturation materials. *J Endod* 1990;16:492-7.

11. Spångberg L. Biological effects of root canal filling materials. 2. Effect in vitro of water-soluble components of root canal filling material on HeLa cells. *Odont Rev* 1969;20:133-45.
12. Wolfson EM, Seltzer S. Reaction of rat connective tissue to some gutta-percha formulations. *J Endod* 1975;1:395-402.
13. Holland R, De Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Mello WD. Resposta tecidual a implantação de diferentes marcas de cones de gutta-percha. Estudo histológico em ratos. *Rev Fac Odont Araçatuba* 1975;4:81-9.
14. Leonardo MR, Utrilla LS, Rothier A, Leonardo RT, Conso-laro A. A comparison of subcutaneous connective tissue responses among three different formulations of gutta-percha used in thermatic techniques. *Int Endod J* 1990;23:211-7.
15. Cleary PT, Newton CW, Morrison SW, Kafrawy AH. Histological examination of paraformaldehyde-exposed gutta-percha implanted in rats. *J Endod* 1992;18:63-7.
16. ISO 10993-1:1992. Biological evaluation of medical devices - Part 1: Guidance on selection of tests. Ginebra, 1992.
17. ISO 10993-2:1992. Biological evaluation of medical devices - Part 2: Animal welfare requirements. Ginebra, 1992.
18. Bayne K. Developing guidelines of the care and use of animals. *Ann NY Acad Sci* 1998;30:105-10.
19. Zmener O. Tissue response to a new methacrylate-based root canal sealer: Preliminary observations in the subcutaneous connective tissue of rats. *J Endod* 2004;30:348-51.
20. FDI. Fédération Dentaire Internationale. Recommended standard practices for the biological evaluation of dental materials. *Int Dent J* 1980;30:174-6.
21. Olsson B, Sliwowsky A, Langeland K. Subcutaneous im-plantation for the biological evaluation of endodontic mate-rials. *J Endod* 1981;7:355-69.
22. Tay FR, Pashley DH, Williams MC, Raina R, Loushine RJ, Weller RN, et al. Susceptibility of a plicaprolactone-based root canal filling material to degradation: I - Alkaline hydro-lysis. *J Endod* 2005;31:593-8.
23. Tay FR, Pashley DH, Yiu CK, Yau YY, Yiu-fai M, Loushine RJ, et al. Susceptibility of a plicaprolactone-based root canal filling material to degradation: II - Gravimetric evaluation of enzymatic hydrolysis. *J Endod* 2005;31:737-41.
24. Sjögren U, Sundqvist G, Nair PNR. Tissue reaction to gutta-percha particles of various sizes when implanted subcuta-neously in guinea pigs. *Eur J Oral Sci* 1995;103:313-21.
25. Maniglia-Ferreira C, Silva JB, De Paula RCM, Feitosa JPA, Zaia AA, Ferraz CCR, et al. Degradation of trans-polyisoprene over time following the analysis of root fillings removed during conventional retreatment. *Int Endod J* 2007;40:25-30.
26. Warneke S, Arenskotter M, Tenberge KB, Steinbüch A. Bac-terial degradation of poly (trans - 1,4 - isoprene) (gutta-per-cha). *Microbiology* 2007;153:347-56.
27. Zmener O, Guglielmotti B, Goldberg F, Massone E, Cabri-ni RL. Biocompatibility of a thermoplasticized gutta-percha in the subcutaneous connective tissue of the rat. *J Dent Res* 1988;67:616.
28. Cardoso M, Marques RF, Lopes MF, Cabrita AS, Santos JM. In vivo biocompatibility of Resilon compared with gutta-per-cha in a pre-clinical model. *Dent Res J* 2013;10:652-8.
29. Zmener O, Pameijer CH, Kokubu GA, Grana DR. Biocom-patibilidad de conos de Resilon y conos de gutapercha en el tejido celular subcutáneo de la rata. Un estudio piloto. *Rev Asoc Odontol Argent* 2010;98:403-8.
30. Oswald RJ, Friedman CE. Periapical response to dentin filings — a pilot study. *O Surg O Med O Pathol* 1980;49:344-55.
31. Sonat B, Dalat D, Günhan O. periapical tissue reaction to root fillings with Sealapex. *Int Endod J* 1990;23:46-52.
32. Serene TP, Vesey J, Boackle RJ. Complement activation as a possible in vitro indication of the inflammatory potential of en-dodontic materials. *O Surg O Med O Pathol* 1988;65:354-7.

Contacto:

OSVALDO ZMENER

osvaldo@zmener.com.ar

Julián Álvarez 2335 3.º D (C1425DHH)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina