

Protección pulpar directa en dientes de cabra. Un modelo experimental

Direct pulp capping in goat teeth. An experimental model

Presentado: 21 de septiembre de 2018
Aceptado: 2 de octubre de 2018

Osvaldo Zmener,^a Susana Álvarez Serrano,^a Mónica Yamauchi,^b Sabrina Kokubu,^c Nicolás D'Anunncio,^d Gabriel Kokubu^e

^aCarrera de Especialización en Endodoncia, Facultad de Ciencias Médicas, Escuela de Odontología, Universidad del Salvador, Asociación Odontológica Argentina

^bAsociación Argentina de Ortodoncia

^cCátedra de Odontología Integral Adultos, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires, Argentina

^dColegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires, Argentina

^eDepartamento de Investigación, Facultad de Medicina, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Argentina

Resumen

Objetivos: Evaluar la utilidad de un modelo animal mamífero como la cabra, a fin de estudiar biomateriales indicados para protección pulpar directa.

Materiales y métodos: Bajo anestesia general, se realizaron exposiciones pulpares en las caras vestibulares de los ocho incisivos inferiores de cuatro (n=4) cabras de raza criolla. En cada animal, 6 (n=6) exposiciones fueron protegidas con un material experimental (ACPc), y las 2 (n=2) restantes, con un material de control a base de MTA (WMTA). En total se realizaron 24 (n=24) protecciones con ACPc y 8 (n=8) con WMTA. Las cabras fueron separadas en dos grupos de dos (n=2) animales cada uno. Bajo anestesia general, los dientes se extrajeron a los 30 (Grupo 1) y 60 días (Grupo 2), se fijaron en formol búffer fosfato al 10% y se procesaron para el estudio histológico de rutina. Los animales no fueron sacrificados. En cada período, se analizaron 12 (n=12) protecciones pulpares con ACPc y 4 (n=4) con WMTA.

Resultados: Grupo 1: Once (n=11) pulpas protegidas con ACPc presentaron puente dentinario completo e inflamación crónica remanente. En un caso no hubo puente

dentinario y la pulpa estaba crónicamente inflamada. Las 4 (n=4) pulpas protegidas con WMTA presentaron puente dentinario e inflamación crónica. Grupo 2: Las 12 (n=12) pulpas protegidas con ACPc se encontraban normales, con puente dentinario completo, buena irrigación y capa de odontoblastos continua. Las 4 (n=4) pulpas protegidas con WMTA revelaron condiciones similares. Los resultados se analizaron mediante el test de probabilidad exacta de Fischer ($P<0,05$). Con respecto al factor inflamación, hubo diferencias significativas ($P<0,001$) entre los resultados obtenidos a 30 y 60 días, pero no hubo diferencias entre ACPc y WMTA ($P>0,05$) dentro de cada uno de los períodos de observación. En cuanto a la presencia de puente dentinario, no hubo diferencias significativas ($P>0,05$) entre ACPc y WMTA en ambos períodos de observación.

Conclusiones: Los resultados sugieren que la cabra constituye un modelo animal adecuado para los ensayos de protección pulpar directa.

Palabras clave: Materiales bioactivos, modelo animal, protección pulpar directa, pulpa dental.

Abstract

Aim: To evaluate the suitability of the goat as an animal model for the study of biomaterials indicated for direct pulp capping.

Materials and methods: Under general anaesthesia, pulp exposures were performed on the buccal surfaces of the eight mandibular incisors of four (n=4) healthy Creole goats. The exposures were capped with two biomaterials developed for PPD. In each animal, 6 (n=6) exposures were capped with

an experimental material (ACPc) while for the remaining 2 (n=2) exposures a white MTA (WMTA) was used as the control. A total of 24 (n=24) direct pulp capping with ACPc and 8 (n=8) with WMTA were done. The goats were separated into two groups of two (n=2) animals each. The teeth were extracted after 30 days (Group 1) and 60 days (Group 2) and fixed in 10% phosphate buffered formalin and processed for routine histology. The animals were not euthanized. In each

period, 12 (n=12) PPD with ACPc and 4 (n=4) with WMTA were analyzed.

Results: Group 1: Eleven (n=11) pulps capped with ACPc showed complete dentin bridges and chronic inflammation. In one case without dentin bridges the pulp was chronically inflamed. The four pulps capped with WMTA revealed the presence of dentin bridges and chronic inflammation. Group 2: Twelve pulps protected with ACPc showed a complete dentin bridges. In addition, well irrigated and healthy pulp tissues along with a continuous odontoblast palisade were observed. The four pulps capped with WMTA revealed similar features. In cases showing dentin bridges, a few numbers of empty spaces as well as odontoblast like cell inclusions were

detected. The results were analyzed by the Fisher's exact test ($P<0.05$). With respect to the inflammation factor there were significant differences between the 30 and 60-day observation periods ($P<0.001$), but no differences were observed between ACPc and WMTA ($P>0.05$) within each of the observation periods. When the presence or absence of a dentin bridges was analyzed, no significant differences ($P>0.05$) were found between materials at each observation period.

Conclusions: The results suggest that the goat seems to be an appropriate animal model for direct pulp capping evaluation.

Key words: Animal model, bioactive materials, dental pulp, direct pulp capping.

Introducción

Se considera modelo animal a todo aquel con similitudes fisiopatológicas con humanos y que permite ser utilizado en el estudio del desarrollo y la progresión de las enfermedades o para ensayar nuevos tratamientos o materiales en contacto con tejidos vitales. El empleo de animales como reactivo biológico en la experimentación de las ciencias odontológicas es fundamental para la investigación de las propiedades biológicas de los materiales dentales.¹ El animal elegido para cada proyecto actúa como modelo experimental y debe reunir determinadas condiciones. Debe ser mamífero, tener piezas dentarias sanas, accesibles, con reacciones pulpaes similares a las de los humanos y ser de fácil manejo. Deben resistir la anestesia general durante un tiempo de trabajo suficiente para cada tipo de experimento proyectado y, en lo posible, debe ser un animal de faena.² Este último requisito es sumamente importante, especialmente cuando se va a efectuar el estudio histológico de la respuesta de los tejidos, ya que con este objetivo se hace necesario realizar la eutanasia del animal al finalizar el experimento.¹⁻³

En endodoncia, son varias las líneas de investigación que requieren de la utilización de modelos animales. En ese sentido, las investigaciones relacionadas con la exposición experimental de la pulpa y su protección con un material biocompatible capaz de estimular el proceso de reparación de la herida por medio de un nuevo tejido calcificado denominado puente dentinario (PD) han ocupado desde hace ya varias décadas un vasto espacio de la literatura. El material ideal para realizar una protección pulpar directa (PPD) no debería ser soluble en contacto con el medio acuoso⁴ y debería ser capaz de resistir la penetración bacteriana, conservando al mismo tiempo la función vital de una pulpa libre de células infla-

matorias.⁵ La PPD es un tratamiento universalmente reconocido que suele presentar un alto porcentaje de éxito,⁶⁻⁸ incluso en piezas dentarias comprometidas por caries.⁹⁻¹¹ La mayoría de los ensayos de materiales para ser utilizados en PPD han sido inicialmente realizados en animales de experimentación.¹²⁻¹⁶ Estos animales requieren ser eutanasiados para el estudio histológico de la respuesta pulpar, lo que ha sido fuertemente condenado por un importante sector de la sociedad, y en ese sentido, la búsqueda de un animal de faena adecuado para este tipo de experimentos aún no termina.

El objetivo del presente ensayo fue evaluar la utilidad de un modelo animal mediante el análisis de la respuesta de la pulpa en PPD realizadas con un material experimental y un material de control en dientes de cabra.

Materiales y métodos

El protocolo del presente ensayo fue revisado y aprobado por el Comité de Ética para la Investigación Científica de la Asociación Odontológica Argentina (resolución n° 0716). La experiencia fue realizada bajo condiciones de esterilidad en un quirófano perteneciente a un establecimiento veterinario acreditado por el Colegio de Veterinarios de la Provincia de Buenos Aires y de acuerdo a las normas establecidas por el documento #41 de ANSI/ADA,¹⁷ ISO 10993-1 (1992)¹ e ISO 7405 (2008).¹⁸ Después de aislar el campo operatorio con goma dique, se realizaron cavidades de clase V y, luego, la exposición pulpar en la cara vestibular de los ocho incisivos inferiores de cuatro (n=4) cabras de raza criolla de 4 años de edad, premedicadas con acepromacina y anestesiadas con ketamina (0,2 mg/kg) y xilacina (0,2 mg/kg) y posterior goteo continuo. Las cavidades se realizaron con fresas de carburo #331 (Dentsply/



Figura 1. Macrofotografía de las cavidades y exposiciones pulpares realizadas en los dientes antero-inferiores. Obsérvese que la hemorragia ha sido cohibida.

Maillefer, Ballaigues, Suiza) a alta velocidad bajo constante refrigeración con suero fisiológico. Las pulpas fueron expuestas en el centro de las cavidades con fresa de carburo #1/2 (Dentsply/Maillefer) rotando a baja velocidad, ejerciendo una suave presión y bajo constante refrigeración con suero fisiológico. Las pulpas se consideraban expuestas cuando se observaba un sangrado a través de la perforación (fig. 1). Se irrigó profusamente con suero fisiológico con el fin de remover restos de dentina y detener el sangrado. Las cavidades se secaron con torundas de algodón estériles. En cada animal se aplicó un material experimental ACPc (Pulpdent Corp., Watertown, Estados Unidos) a base de silicato tricálcico sobre la exposición y el piso de la cavidad en 6 (n=6) dientes, mientras que en los 2 (n=2) dientes restantes la exposición y el piso de la cavidad se cubrieron con MTA de color blanco (WMTA; Densell, Buenos Aires, Argentina), utilizado como control. En todas las cavidades se aplicó posteriormente un *liner* a base de ionómero modificado con resinas (3M Dental Products, St. Paul, MN, Estados Unidos), se realizó un grabado selectivo con ácido fosfórico al 35% (Ultradent Products Inc., South Jordan, UT, Estados Unidos) y se aplicó el adhesivo dentinario ScotchBond Single Bond (3M Dental Products). Finalmente, las cavidades fueron restauradas con la resina compuesta Z250XT (3M Dental Products). Los animales se medicaron con penicilina (2000 UI/kg y estreptomicina 9400 UI/kg) y analgésicos durante 5 días. En 2 cabras, los dientes se extrajeron bajo anestesia general a los 30 días posoperatorios (Grupo 1), mientras que en las otras dos (Grupo 2) las extracciones fueron realizadas a los 60 días. Las he-

ridas se lavaron con suero y se suturaron. Los animales no fueron eutanasiados. Durante los tiempos de observación posoperatorios, los animales fueron mantenidos en alojamientos veterinarios apropiados con alimentación y agua potable *ad libitum*.

A fin de facilitar la penetración del fijador, se realizó inmediatamente luego de la extracción una perforación de 2 mm de diámetro aproximadamente a 10 mm del extremo apical con fresa de carburo, a alta velocidad y profusa refrigeración con suero. Los dientes se fijaron en formol búffer fosfato al 10% durante 10 días. Después de la fijación se descalcificaron con ácido fórmico al 10%, se incluyeron en parafina y se procesaron para su evaluación histológica. Se obtuvieron cortes longitudinales semiseriados de 7 μ m de espesor. Los cortes se colorearon alternativamente con hematoxilina y eosina o con coloración de Brown y Brenn para bacterias. Finalmente, se analizaron y fotografiaron a diferentes aumentos por medio de un microscopio óptico (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemania) equipado con una cámara digital Canon PowerShot A510 (Canon, Tokio, Japón).

Estudio microscópico. En ambos períodos experimentales, los factores considerados para la evaluación fueron la presencia o ausencia de un PD y el tipo de células inflamatorias presentes (polimorfonucleares neutrófilos, linfocitos, plasmocitos, macrófagos y células gigantes multinucleadas). También se consideraron la presencia o ausencia de odontoblastos y los cambios vasculares ocurridos en el seno del tejido pulpar. La respuesta histológica se clasificó de acuerdo a tres categorías: 1: ausencia de PD y presencia de inflamación aguda o crónica; 2: presencia de PD

Tabla 1. Distribución de los procedimientos de acuerdo al material y el período de observación.

	30 días	60 días	Total
ACPc n	12	12	24
WMTA n	4	4	8

Tabla 2. Resultados de la evaluación histológica de acuerdo a los factores material y tiempo de observación.

	30 días				60 días			
	n	C1	C2	C3	n	C1	C2	C3
ACPc	12	1	11	0	12	0	0	12
WMTA	4	0	4	0	4	0	0	4

C1: ausencia de puente dentinario (PD) y presencia de inflamación aguda o crónica; C2: presencia de PD con inflamación crónica; C3: presencia de PD y pulpa normal subyacente.

con inflamación crónica; 3: presencia de PD y pulpa normal subyacente. En todos los casos, se observó si hubo formación de abscesos, áreas necróticas y presencia de bacterias en los túbulos dentinarios. Los resultados fueron analizados por medio del test de probabilidad exacta de Fischer, con un nivel de significación de $P < 0,05$.

Resultados

En total se realizaron 24 ($n=24$) protecciones con ACPc y 8 ($n=8$) con WMTA. La distribución de los materiales y los tiempos de observación pueden consultarse en la tabla 1. Los resultados de la evaluación histológica se encuentran en la tabla 2. Luego de 30 y 60 días, los animales se hallaban sanos, se alimentaban bien y habían aumentado de peso. El examen de las restauraciones no reveló la presencia de alteraciones estructurales o pigmentación marginal clínicamente detectable.

A los 30 días posoperatorios, la reacción de 11 ($n=11$) pulpas protegidas con ACPc fue considerada de categoría 2. En todos los casos se observó la presencia de PD de diferentes espesores, con pocas células o restos dentinarios y una inflamación crónica (fig. 2A). Un solo caso ($n=1$) fue considerado de categoría 1, con inflamación crónica circundando el material de protección, sin PD. Las 4 ($n=4$) pulpas protegidas con WMTA mostraron PD e inflamación crónica (fig. 2B).

A los 60 días, la reacción de las pulpas protegidas con ACPc fue considerada de categoría 3. Todas presentaron PD completo, pulpa normal con buena irrigación y capa de odontoblastos continua (fig. 2C). En las 4 ($n=4$) pulpas protegidas con WMTA los resul-

tados fueron similares a los de las pulpas protegidas con ACPc (fig. 2D).

No se encontraron bacterias en la interfase material de restauración / pared dentinaria de las cavidades en ninguno de los dos períodos de observación. Con respecto al factor inflamación, el análisis estadístico demostró que hubo diferencias significativas ($P < 0,001$) entre los resultados obtenidos a 30 y 60 días, pero no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ACPc y WMTA dentro de cada período de observación. En relación con la presencia de PD, no hubo diferencias significativas ($P > 0,05$) entre ACPc y WMTA en ambos períodos de observación.

Discusión

En el presente ensayo, se comparó la biocompatibilidad y la capacidad del material experimental ACPc y WMTA para inducir la reparación de exposiciones realizadas en pulpas sanas de cabras, de acuerdo a las normas internacionales establecidas para el estudio *in vivo* de las propiedades biológicas de los materiales dentales.^{1,17,18} Durante el tratamiento conservador de una pulpa dental expuesta es importante considerar su estado de salud en el momento de la exposición, lo cual tiene a su vez una influencia decisiva en la evolución del proceso reparativo.² En la actividad clínica, el profesional suele encontrarse con situaciones complejas, especialmente cuando se produce una exposición pulpar provocada por caries, lo que sugiere que en estos casos la pulpa ya se encuentra inflamada.⁹ Aun así, Matsuo *et al.*,⁹ Farsi *et al.*¹⁰ y Bogen¹¹ han observado un importante porcentaje de éxito en PPD realizadas en piezas dentarias afectadas por caries en humanos.

En este trabajo, los resultados histopatológicos revelaron que al finalizar el ensayo (60 días) y luego de una reacción inflamatoria inicial todas las exposiciones pulpares tratadas con ACPc o WMTA presentaron PD completos, morfológicamente similares, y pulpas con capas de odontoblastos continuas y sin células inflamatorias. Es probable que la similitud de la respuesta pulpar en las PPD realizadas con ACPc o WMTA se deba a que ambos materiales están formulados a base de silicato tricálcico.^{4,19} El WMTA fue utilizado como control a causa de sus propiedades biológicas previamente demostradas por diferentes investigadores en PPD, realizadas en animales de experimentación y en humanos.^{6-8,12-15,20,21}

La excelente evolución de las exposiciones pulpares en contacto con ACPc o WMTA también podría deberse a que el ensayo fue realizado bajo condiciones experimentales bien controladas y utilizando

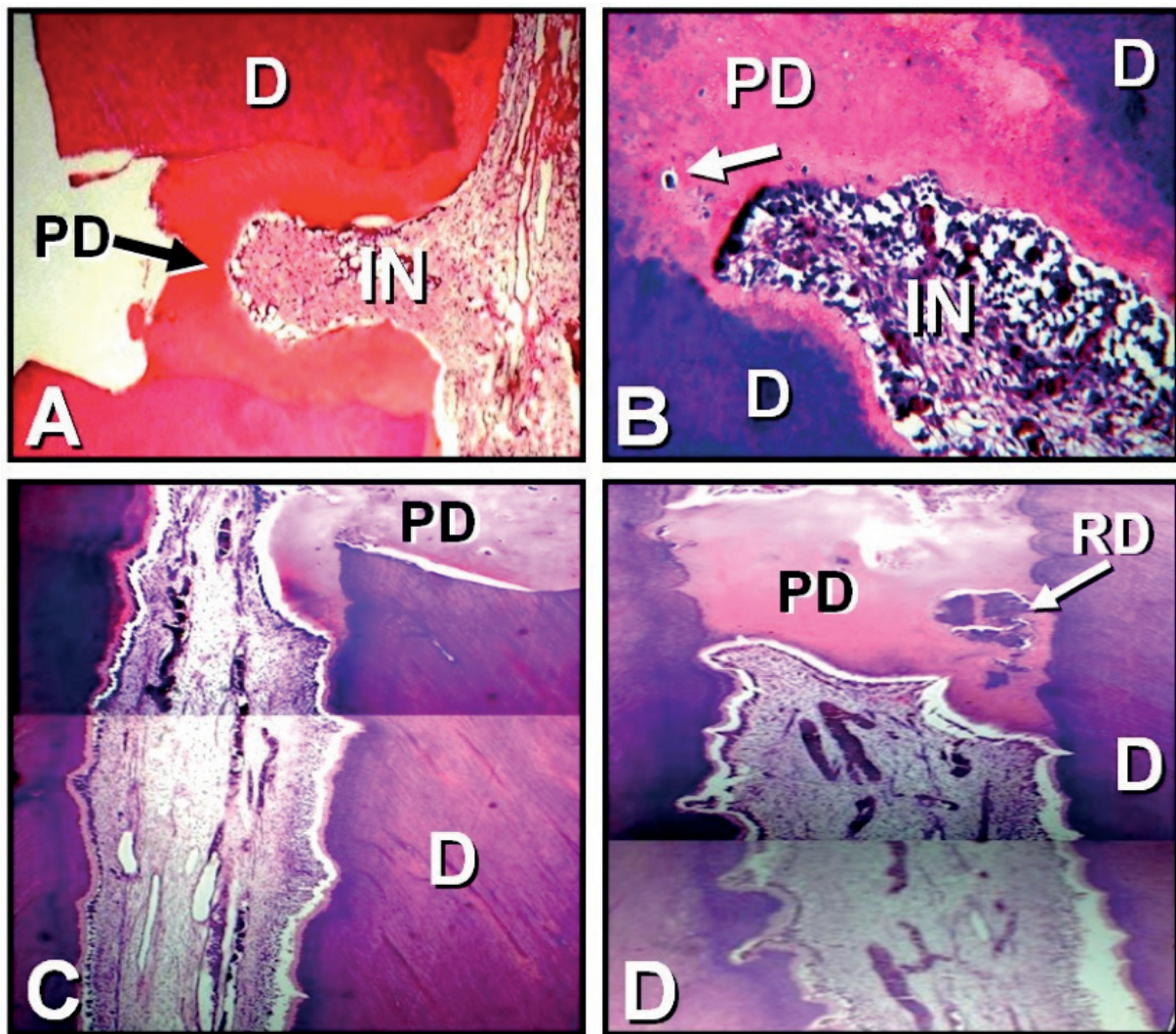


Figura 2. **A:** 30 días. Sección histológica de un espécimen representativo del Grupo 1. En contacto con ACPC, se observa la presencia de un puente dentinario completo (PD) y una pulpa crónicamente inflamada (IN). D: dentina. (Hematoxilina y eosina; magnificación original X100). **B:** 30 días. Sección histológica de un espécimen representativo del Grupo 1. En contacto con WMTA, se puede observar el puente dentinario (PD) con pocas células odontoblásticas incluidas (flecha blanca) y la inflamación crónica de la pulpa subyacente (IN). D: dentina. (Hematoxilina y eosina; magnificación original X400). **C:** 60 días. Microfotografía compuesta de la sección histológica de un espécimen representativo del Grupo 2. En contacto con ACPC, se observa el puente dentinario (PD) y una capa odontoblástica subyacente. Véase también la presencia de una pulpa sana y numerosos vasos sanguíneos. D: dentina. (Hematoxilina y eosina; magnificación original X100). **D:** Microfotografía compuesta de la sección histológica de un espécimen representativo del Grupo 2. En contacto con WMTA, se observa una capa odontoblástica continua por debajo del puente dentinario (PD). La pulpa es normal y contiene numerosos vasos sanguíneos. RD: restos dentinarios incluidos; D: dentina. (Hematoxilina y eosina; magnificación original X400).

dientes sin caries y pulpas sanas. Otros factores que podrían haber influido positivamente en los resultados fueron la ausencia de contaminación bacteriana al finalizar el ensayo y la respuesta biológica del modelo animal utilizado. En ese sentido, los resultados de este trabajo coinciden con los de Zhang *et al.*,²² quienes observaron que la cabra se comporta como un reactivo biológico con similitudes fisiopatológicas con respecto a los humanos.

Conclusiones

En las condiciones en que ha sido realizado el presente estudio, fue posible observar que la cabra reúne la mayoría de los requisitos para el ensayo de biomateriales en contacto con la pulpa dental. Se trata de un animal mamífero de fácil manejo clínico, presenta dientes accesibles en el sector antero-inferior (no posee dientes en el sector antero-superior), es un animal de faena cuya reacción pulpar a diferen-

tes tipos de estímulos resulta similar a lo que ocurre en los humanos, y puede ser anestesiado durante un tiempo de trabajo suficientemente extenso como para realizar diferentes tipos de experimentos. Estas condiciones sugieren que la cabra se comporta como un modelo animal adecuado para el estudio de biomateriales en PPD.

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

Referencias

1. International Standard Organization. ISO 10993-1:1992, Biological evaluation of medical devices. "Guidance on selection of tests", Ginebra, 1992.
2. Zmener O. El uso de animales para la investigación científica en odontología. *Rev Asoc Odontol Argent* 2017;105:1-2.
3. Zmener O. Biomateriales en endodoncia. Investigación y ética. *Canal Abierto* 2013;28:28-30.
4. Grech I, Mallia B, Camilleri J. Investigation of the physical properties of tricalcium silicate cement-based root-end filling materials. *Dent Mat* 2013;29:20-8.
5. Whitterspoon DE. Vital pulp therapy with new materials. New directions and treatment perspectives. Permanent teeth. *Pediatr Dent* 2008;30:220-4.
6. Aeinehchi M, Eslami B, Ghambarinha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: A preliminary report. *Int Endod J* 2003;36:225-31.
7. Accorinte MLR, Loguerio AD, Reis A, Carneiro E, Grande RHM, Murata SS, et al. Response of human dental pulp capped with MTA and calcium hydroxide powder. *Oper Dent* 2008;33:488-95.
8. Katge FA, Patil P. Comparative analysis of 2 calcium silicate-based cements (Biodentine and Mineral Trioxide Aggregate) as direct pulp capping agent in young permanent molars: A split mouth study. *J Endod* 2017;43:507-13.
9. Matsuo T, Naakanishi T, Shimitsu H, Ebisu S. Clinical study of direct pulp capping applied to carious-exposed pulps. *J Endod* 1996;22:551-6.
10. Farsi N, Alamoudi N, Balto K, Al Mushayt A. Clinical assessment of mineral trioxide aggregate (MTA) as direct pulp capping in young permanent teeth. *J Clin Pediatr Dent* 2006;31:72-6.
11. Bogen G. Direct pulp capping with mineral trioxide aggregate: An observational study. *J Am Dent Assoc* 2008;139:305-15.
12. Holland R, Souza V, Nery MJ, Bernabé PFE, Mello W, Otoboni Filho JA. Healing process after pulpotomy and covering with calcium hydroxide, Dycal or MPC. Histological study in dog's teeth. *Rev Fac Odont Araçatuba* 1978;7:185-91.
13. Holland R, De Souza V, Murata SS, Nery MJ, Bernabé PFE, Otoboni Filho JA, et al. Healing process of dog dental pulp after pulpotomy and pulp covering with mineral trioxide aggregate or Portland cement. *Braz Dent J* 2001;12:109-13.
14. Faraco IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001;17:163-6.
15. De Rossi A, Silva LAB, Gatón-Hernández P, Sousa-Neto MD, Nelson Filho P, Siva RAB, et al. Comparison of pulpal responses to pulpotomy and pulp capping with biodentine and mineral trioxide aggregate in dogs. *J Endod* 2014;40:1362-9.
16. Tran XV, Gorin C, Willig C, Baroukh B, Pellat B, Demp F, et al. Effect of a calcium-silicate-based restorative cement on pulp repair. *J Dent Res* 2012;91:1166-71.
17. ANSI/ADA, 2001. American National Standards Institute / American Dental Association. Document #41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials 2001 (revised in 2004).
18. International Standards Organization. ISO 7405 Dentistry. Evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry. Ginebra, 2008.
19. Camilleri J. The chemical composition of mineral trioxide aggregate. *J Conserv Dent* 2008;11:141-3.
20. Chacko V, Kurikose S. Human pulpal response to mineral trioxide aggregate (MTA): A histologic study. *J Clin Pediatr Dent* 2006;30:203-9.
21. Patel R, Cohenca N. Maturogenesis of a cariously exposed immature permanent tooth using MTA for direct pulp capping. A case report. *Dent Traumatol* 2006;22:328-33.
22. Zhang W, Walboomers XF, Jansen JA. The formation of tertiary dentin after pulp capping with calcium phosphate cement loaded with PLGA microparticles containing TGF- β 1. *J Biomed Mat Res* 2008;85:439-44.

Contacto:

OSVALDO ZMENER

osvaldo@zmener.com.ar

Julián Álvarez 2335 (C1425DHI)

Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina