

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA



Evaluación histológica de tejido de corazón y pulmón en modelo animal con tratamiento pulpar con técnica de formocresol en comparación con modelo animal sin tratamiento.

Por
Ana Elizabeth Ríos Martínez

Como requisito parcial para obtener el Grado de
Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Noviembre, 2021

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Evaluación histológica de tejido de corazón y pulmón en modelo animal con tratamiento pulpar con técnica de formocresol en comparación con modelo animal sin tratamiento.

Ana Elizabeth Ríos Martínez

Comité de Tesis

Presidente

Secretario

Vocal

Maestría en Ciencias Odontológicas en el Área de Odontopediatría

Evaluación histológica de tejido de corazón y pulmón en modelo animal con tratamiento pulpar con técnica de formocresol en comparación con modelo animal sin tratamiento.

FIRMA

TESISTA

Ana Elizabeth Ríos Martínez

Comité de Tesis

FIRMA

DIRECTOR DE TESIS

DRA. SONIA MARTHA LOPEZ VILLARREAL

CODIRECTOR DE TESIS

DRA. OSVELIA RODRIGUEZ LUIS

ASESOR METODOLÓGICO

DR. GUSTAVO ISRAEL MARTÍNEZ GONZÁLEZ

ASESOR METODOLÓGICO

DR. RICARDO MARTÍNEZ PEDRAZA

ASESOR METODOLÓGICO

DR. CARLOS REYES ESCALERA

AGRADECIMIENTOS

Dios, tu amor y tu bondad no tienen fin, me permites sonreír ante todos mis logros que son resultado de tu ayuda, y cuando caigo y me pones a prueba, aprendo de mis errores y me doy cuenta que los pones en frente mio para que mejore como ser humano, y crezca de diversas maneras.

Este trabajo ha sido una gran bendición en todo sentido y te lo agradezco padre, y no cesan mis ganas de decir que es gracias a ti que esta meta está cumplida, toda la gloria y la honra sea para ti mi Dios.

Quiero expresar mi más sentido agradecimiento a mi gran familia que estuvo siempre apoyándome en todo momento y que gracias a ellos ahora soy lo que soy, los amo mucho y me siento bendecida de tenerlos como mi familia, agradezco a mis amistades que aguantaron mis cancelaciones de salidas por enfocarme en lo que más amo y lo entendieron, estoy muy agradecida con mi Directora de Tesis la Dra Sonia Martha López Villarreal gran ser humano, no pudo haberme tocado mejor directora ya que nunca me solto para que se diera posible esta revisión del presente trabajo, igualmente muy agradecida con el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico para la realización de mis estudios, a mi hermosa Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Tabla de contenido

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	4
LISTA DE TABLAS	7
LISTA DE FIGURAS	8
RESUMEN	9
ABSTRAC.....	10
1.- INTRODUCCIÓN.....	12
2.- HIPÓTESIS.....	13
3. OBJETIVOS.....	14
3.1 OBJETIVOS GENERALES.....	14
3.2.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. ANTECEDENTES.....	15
4.1 CARIES DENTAL.....	17
4.2 PULPA DENTAL.....	19
4.2.1 PULPOTOMÍA.....	23
4.2.2 FORMOCRESOL.....	25
4.2.3 PROCEDIMIENTO CONVENCIONAL DEL TRATAMIENTO DE PULPOTOMIA.....	28
4.3 ALTERNATIVAS DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN LA PULPOTOMÍA.....	29
4.3.1 SULFATO FÉRRICO.....	30
4.3.2 MTA.....	31
4.3.3 GLUTARALDEHÍDO.....	32
4.3.4 ELECTROCIRUGÍA Y LÁSER.....	32
4.3.5 HIDRÓXIDO DE CALCIO.....	33
4.3.6 BIODENTINE.....	33
4.3.7 HUESO LIOFILIZADO.....	34

4.3.8 COLÁGENO.....	34
5. ASPECTOS BIOÉTICOS Y LEGALES.....	35
5.1 CUIDADO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.....	37
5.2 INFRAESTRUCTURA PARA LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES.....	39
5.2.1 LA SALUD DE LOS ANIMALES DEBE SER EVALUADA DE FORMA PERIÓDICA.....	39
5.3 INYECCIONES.....	42
6. TIPOS DE RATAS.....	43
7. PREPARACION DE TEJIDOS.....	44
8. MICROSCOPIA.....	48
9. METODOS.....	50
10. RESULTADOS	56
11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	65
12.DISCUSIÓN.....	66
13. CONCLUSIONES.....	68
14. RESUMEN BIOGRÁFICO	69

LISTA DE TABLAS

Tabla

Página

1. Constantes fisiológicas del ratón.....	43
2. Criterios de evaluación histológica (para 7, 8 y 15 días).....	52
3. Respuesta histológica de células inflamatorias según la medición de corazón a las 7 horas, 8 y 15 días y grupo control.....	61
4. Respuesta histológica de células inflamatorias según la medición de pulmón a las 7 horas, 8 y 15 días y grupo control.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Bioterio.....	53
2. Administrando inyección peritoneal.....	53
3. Cabina biológica.....	53
4. Realización de pulpotomías.....	53
5. Sacrificio de rata para obtener corazón y pulmón.....	54
6. Organos Corazón y Pulmón.....	54
7. Cortes histológicos.....	54
8. Observación en microscopio de cortes histológicos.....	55
9. Caja de laminillas de cortes histológicos.....	55

NOMENCLATURA

OMS	Organización Mundial de la Salud
CPI	Caries de la primera infancia
MEC	Matriz Extracelular
GAG	Glucosaminoglucanos
OZE	Oxido de zinc-eugenol
IRM	Oxido de Zinc reforzado
FA	Formaldehído
$\text{Fe}^2(\text{so}_4)^3$	Sulfato Ferrico
MTA	Agregado de trióxido mineral
CaOH^2	Hidróxido de calcio

TESISTA: ANA ELIZABETH RIOS MARTINEZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. SONIA MARTHA LOPEZ VILLARREAL

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. OSVELIA RODRIGUEZ LUIS.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Evaluación histológica de tejido de corazón y pulmón en modelo animal con tratamiento pulpar con técnica de formocresol en comparación con modelo animal sin tratamiento.

RESUMEN

INTRODUCCIÓN: La metabolización y excreción del formocresol absorbido ocurre por vía renal y pulmonar. El resto del formocresol se fija a los tejidos principalmente en los riñones, el hígado y el pulmón. Cuando se administró en dosis elevadas, se observaron efectos tóxicos agudos como alteraciones cardiovasculares, alteraciones enzimáticas en sangre y orina, así como signos histológicos de lesiones celulares en órganos vitales. **OBJETIVO:** Evaluar histológicamente el tejido de corazón y pulmón de ratas Sprague- Dawley con tratamiento pulpar con técnica de formocresol en comparación con modelo animal sin tratamiento. **METODOLOGÍA:** Se realizó pulpotomía con formocresol a 9 ratones de la raza Sprague-Dawley en el incisivo inferior izquierdo y como control 3 ratas sin tratamiento. Una vez sacrificadas las ratas, se realizará la disección de pulmón y corazón para proceder a su estudio histológico. **RESULTADOS:** Muestran hallazgos de cambios histológicos de los órganos de las ratas tratadas con formocresol en comparación con los órganos de las ratas no tratadas. Se encontraron cambios muy significativos con un alto grado de inflamación.

CONCLUSIONES: En los grupos se encontraron zonas con edema, congestión vascular, hemorragia, vasos congestionados, extravasación y disociación. De acuerdo con los criterios, se evidenció histológicamente que el formocresol sí causa daño histológico en corazón y pulmón en comparación con el grupo control.

DIRECTOR DE TESIS: DRA. SONIA MARTHA LOPEZ VILLARREAL

CODIRECTOR DE TESIS: DRA. OSVELIA RODRIGUEZ LUIS.

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Histological evaluation of heart and lung tissue in an animal model with pulp treatment with formocresol technique compared to an animal model without treatment.

ABSTRACT

INTRODUCTION: The metabolization and excretion of absorbed formocresol occurs by the renal and pulmonary routes. The rest of the formocresol is fixed to the tissues mainly in the kidneys, liver and lung. When administered in high doses, acute toxic effects were observed such as cardiovascular alterations, enzymatic alterations in blood and urine, as well as histological signs of cell injuries in vital organs.

OBJECTIVE: To evaluate histologically the pulp, liver, kidney and lung of Sprague-Dawley rats with pulp treatment with formocresol technique. **METHODOLOGY:** 9 mice of the Sprague-Dawley breed were performed with formocresol in the lower left incisor and as control 3 rats without treatment. Once the rats have been sacrificed, dissection of dental pulp, liver, kidney and lung will be performed to proceed with histological study. **RESULTS:** They show findings of histological changes of the organs of rats treated with formocresol compared to the organs of untreated rats. Very significant changes were found with a high degree of inflammation.

CONCLUSIONS: Areas with edema, vascular congestion, hemorrhage, congested vessels, extravasation and dissociation were found in the groups. According to the criteria, it was histologically evidenced that formocresol does cause histological damage to the heart and lung compared to the control group.

1.- INTRODUCCIÓN

En el campo odontológico se ha utilizado el formocresol como parte del procedimiento de las pulpotomías en piezas de la primera dentición, al estudiar los antecedentes de este producto es reconocido como tóxico e irritante, en la actualidad, se sigue utilizando diluido en los tratamientos para fijar pulpas de la primera dentición, con el objetivo de preservar las piezas.

Conociendo tales desventajas se sugirió realizar un estudio en donde se realizaran pulpotomías con la técnica tradicional de formocresol y poder evaluar el daño histológico en órganos. Por tal motivo los objetivos de este estudio fueron: existe presencia de daño histológico en corazón y pulmón de ratas Sprague-Dawley con tratamiento pulpar con técnica de formocresol y compararlas con ratas sin tratamiento.

Una de las indicaciones en uso de formocresol es el no tener contacto directo el cual pudiera producir irritabilidad, toxicidad, en su uso en cantidades mayores de las recomendadas pudiendo provocar una necrosis de los tejidos, llegar a la circulación periférica y de esta forma a los órganos del paciente, pudiendo provocar trastornos sistémicos graves.

El presente estudio se realizó en ratas y los cambios clínicos y hallazgos histológicos podrán ser extrapolados al ser humano. Los resultados obtenidos muestran hallazgos de cambios histológicos de los órganos de las ratas tratadas con formocresol en comparación con los órganos de las ratas no tratadas. Se encontraron cambios muy significativos con un alto grado de inflamación.

2.- HIPÓTESIS

Existe presencia de daño histológico en corazón y pulmón de ratas Sprague-Dawley con tratamiento pulpar con técnica de formocresol en comparación con el grupo control.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

Evaluar histológicamente el tejido de corazón y pulmón de ratas Sprague-Dawley con tratamiento pulpar con técnica de formocresol en comparación con modelo animal sin tratamiento.

3.2.- Objetivos específicos

- 1) Tratar con pulpotomía con formocresol a 9 ratones Sprague-Dawley en el incisivo inferior izquierdo y como control 3 ratas sin tratamiento previa adaptación de 2 a 3 semanas.
- 2) Efectuar sacrificio de las ratas a los 3, 8 y 15 días obteniendo el corazón y el pulmón de las ratas tratadas con formocresol y las ratas del grupo control para ser evaluados fijándolos en formaldehído al 10%.
- 3) Emplear la técnica histológica incluyendo fijación en formaldehído, deshidratación, transparentación, inclusión en parafina y finalmente, la obtención de cortes y tinción.
- 4) Analizar bajo la observación del microscopio óptico los cortes histológicos en 10X y 40X teñidos con la técnica de H y E (Hematoxilina-Eosina).
- 5) Comparar la respuesta histológica de corazón y pulmón de ratas tratadas con pulpotomía con técnica de formocresol y las ratas control.
- 6) Medir los patrones histológicos mediante análisis patológico morfométrico.

4. ANTECEDENTES

Los niños en edades tempranas son altamente vulnerables a problemas de salud en general. Muchas veces implican problemas de salud bucal como la caries dental considerada como una enfermedad transmisible de origen multifactorial, plenamente relacionada con higiene oral defectuosa, alimentación nocturna, alto consumo de azúcares, colonización bacteriana y bajo nivel socioeconómico de los padres. Ésta, puede presentar graves repercusiones como dolor intenso, infecciones faciales, hospitalizaciones y visitas a urgencias, así como disminución en el desarrollo físico del infante, alto costo de tratamiento y disminución en la calidad de vida¹.

La prevalencia de caries a nivel mundial presenta parámetros discordantes: mientras que en los países desarrollados se ha reducido considerablemente gracias a adecuados programas de control y prevención a nivel masivo, en países como México la caries afecta a alrededor del 95% de los niños menores de ocho años de edad y al 99% de los adultos. La alta incidencia de caries entre los niños de México se debe a muchos factores, entre los cuales se ha mencionado frecuentemente el alto consumo de golosinas y alimentos chatarras, auspiciado por una desmedida comercialización y publicidad; se agrega la falta de conocimientos de la sociedad sobre los daños que causa a la salud dental el consumo de golosinas entre comidas, lo cual frecuentemente es ignorado por padres y maestros².

Según datos de la Organización Mundial de la salud (OMS), aproximadamente más de 5 000 personas padecen caries dental, lo que equivale aproximadamente a 80 % de la población mundial, de manera que si se tiene en cuenta la cantidad de personas con estos padecimientos, se pudiera hablar de la existencia de una pandemia de enfermedades dentales en el mundo y en América Latina. Al respecto se plantea que a pesar de los conocimientos sobre las causas de este trastorno tan común, continúa teniendo elevada prevalencia en la mayoría de los países europeos y asiáticos. En investigaciones realizadas en España, México y Argentina, se informa que la caries dental afecta a más de 95% de la población, con una prevalencia de hasta 98,0% en la población general³.

Los esfuerzos por conservar dientes cariados con compromiso pulpar, por medio de la mutilación de la cámara pulpar se remontan a 1981, cuando Witzel describió el método⁴.

La terapia de la pulpa fue tal vez descrita por primera vez en 1756 por Philip Pfaff, quien realizó el tapado de la pulpa al tratar de cubrir la pulpa expuesta con una pequeña pieza de oro cuidadosamente adaptada a la base de la cavidad. Leonard Koecker, en 1826, cauterizó la parte descubierta de la pulpa con un alambre de hierro al rojo vivo, cubriendo posteriormente el tejido en contacto con un trozo de lámina de plomo. En 1899, se introdujo el "triopaste de Gysi" como el primer compuesto para combinar formaldehído y creosota en la pulpa x en condiciones permanentemente estériles⁵.

El formocresol fue introducido en 1904 por Buckley para el tratamiento de la pulpa putrescente en dientes de animales. La fórmula original de Buckley consistía en formalina concentrada 53 g, cresol 35 g, glicerol 7 g y agua 5 g. Buckley introdujo una fórmula comercial que consistía en 19% de formaldehído, 35% de cresol y glicerina en agua destilada. Massler y Mansukhani estudiaron los efectos histológicos del formocresol sobre la pulpa amputada de 205 molares de rata y 43 dientes primarios y permanentes. Describieron, en los molares de la rata, la reacción defensiva como encapsulación brusca de las células inflamatorias, seguida de calcificación de la cápsula y formación de dentina reparadora; Además, se informó la aposición de nuevos puentes de matriz de dentina⁵.

La cavidad oral es un sistema ecológico complejo debido a sus características anatómicas, fisiológicas y a la variedad de las poblaciones microbianas. Se ha llegado a identificar más de 700 especies bacterianas dentro de la cavidad oral consideradas en la actualidad como bacterias autóctonas en el humano. Sin embargo, estas especies autóctonas, en relación al huésped, están entre la simbiosis (convivencia de dos organismos disímiles, donde ambos se benefician) y la patogenicidad (donde uno de los organismos presenta daño)⁶.

La higiene bucal deficiente es un factor muy decisivo en la aparición de la caries dental, ya que implica mayor acumulación de placa dentobacteriana, lo cual reduce el coeficiente de difusión de los ácidos formados por los microorganismos fermentadores, facilita el proceso de desmineralización y eleva el riesgo de caries⁷.

La cavidad oral humana, usualmente es estéril. Al momento del nacimiento, el neonato entra en contacto con un considerable número y tipos de especies bacterianas provenientes de una variedad de fuentes externas medioambientales (aire, agua, alimentos, otros seres humanos). El establecimiento de la flora oral autóctona se inicia en los primeros días de vida del recién nacido y beneficia al huésped de varias maneras. En primer lugar, provee protección de especies bacterianas similares pero más patógenas. En segundo lugar, es una barrera para la colonización de bacterias más virulentas a través de la inhibición espacial de potenciales sitios de adhesión, competencia fisiológica de nutrientes, y por la producción de sustancias inhibitorias⁸.

4.1 CARIES DENTAL

La cavitación en los dientes es el resultado de un proceso patógeno denominado caries dental que se ha producido en la superficie del diente durante semanas o incluso años. La acumulación de placa dental (biopelícula) en el diente suele ser la primera manifestación de la enfermedad. Aunque la producción de ácido es la causa inmediata y próxima de la disolución de los dientes; es el medio en el que se forma el ácido lo que debería ser de interés principal⁹.

La caries dental es una de las enfermedades más prevalentes (alrededor del 50%) en los niños de todo el mundo. Si no se trata a tiempo, puede afectar no solo la función de masticación sino también el habla, la sonrisa y el entorno psicosocial y la calidad de vida del niño y la familia. El tratamiento de las enfermedades dentales es muy caro en todos los países y la prevención es muy sencilla y eficaz. La caries en niños menores de 6 años se llama caries de la primera infancia (CPI)¹⁰.

La caries dental es una enfermedad de origen multifactorial que afecta entre el 60% y el 90% de la población escolar dañando a los tejidos dentales y causando la pérdida prematura de los dientes infantiles⁸.

Las especies bacterianas acidogénicas-acidúricas más relevantes conocidas hasta la fecha son *Streptococcus mutans*, bifidobacterias y lactobacilli. Mientras que los estreptococos mutans son iniciadores, las bifidobacterias y los lactobacilos son más potenciadores de la progresión. Los impulsores de la actividad microbiana son condiciones ambientales específicas, como la presencia de azúcares dietéticos fermentables y la ausencia de oxígeno¹¹.

Como enfermedad multifactorial de alta prevalencia, la caries dental afecta a una gran proporción de la población mundial. Como los dientes están constantemente bañados en saliva, los componentes y las propiedades de este fluido oral juegan un papel esencial en la aparición y progresión de la caries dental. Varios componentes inorgánicos (agua y electrolitos) y orgánicos (proteínas y péptidos) pueden proteger los dientes de la caries dental¹².

La caries dental, el traumatismo y otros posibles factores podrían provocar lesiones de la pulpa dental. La infección dental podría dar lugar a respuestas inmunitarias e inflamatorias mediadas por eventos moleculares y celulares y la degradación del tejido. La respuesta inflamatoria de la pulpa dental podría estar regulada por eventos genéticos y epigenéticos¹³.

4.2 PULPA DENTAL

La pulpa dental como todo tejido especializado cumple con funciones específicas, según las células que lo componen: formativa, sensorial, nutritiva y defensiva o protectora¹⁴.

Tiene un cumplimiento relativamente bajo porque está encerrado en tejido duro. Su baja elasticidad frente a daños, como la caries dental, da como resultado la extracción frecuente de la pulpa dental durante la terapia endodóntica. La pérdida de pulpa dental conduce con frecuencia a la fragilidad del diente y, finalmente, al deterioro de la calidad de vida del paciente¹⁵.

La pulpa posee elementos tisulares, entre los que se incluyen nervios, tejido vascular, fibras de tejido conectivo, sustancia fundamental, fluido intersticial, odontoblastos, fibroblastos, células inmunocompetentes y otros elementos celulares¹⁶. A diferencia de la mayoría de los tejidos, la pulpa carece de un sistema colateral y depende de las pocas arteriolas que penetran a través de los orificios radiculares. Este sistema vascular disminuye progresivamente con la edad, al igual que el tamaño de la cavidad pulpar, debido al depósito continuo de dentina secundaria y por la aposición localizada y deformante de la dentina terciaria que se produce como respuesta ante distintos tipos de noxas¹⁶. La pulpa dental es un órgano sensorial único, a pesar de la baja conductividad térmica de la dentina, es sensible a los estímulos fríos y calientes. Al igual que otros tejidos conectivos del cuerpo posee potencial de regeneración y reparación, por lo que puede formar dentina a lo largo de toda la vida, lo que permite que la pulpa vital compense parcialmente la pérdida de esmalte y dentina producto de un traumatismo mecánico o una enfermedad¹⁶.

La pulpa dental está formada por un 75% de agua y por un 25% de materia orgánica constituida por células y matriz extracelular (MEC) representada por fibras y sustancia fundamental¹⁷.

a)Sustancia fundamental

La sustancia fundamental o matriz extracelular ocupa los espacios libres dejados por las células, fibras, vasos y nervios. Es abundante en las pulpas jóvenes. Tiene consistencia gelatinosa y continua, siendo diferente de los fluidos tisulares. Está compuesta, principalmente por glucosaminoglucanos (GAG), ácido hialurónico, condroitín sulfato, glucoproteínas y agua¹⁶. En dientes recién erupcionados el GAG predominante es el dermatán sulfato. En cambio, en pulpas maduras el ácido hialurónico es el componente esencial y en menor proporción se presentan el dermatán y el condroitín sulfato. A través de la sustancia fundamental transcurren los metabolitos celulares, los nutrientes y los productos de desecho desde las células a los vasos sanguíneos¹⁷.

b) Células de la pulpa dental

- Odontoblastos: Responsable de la dentinogénesis y en el diente permanente se le considera la célula más importante del complejo dentino pulpar. Los estadios de diferenciación de pre-odontoblastos a odontoblastos jóvenes y a odontoblastos maduros, son hallados de igual manera en procesos de reparación.

- Fibroblastos: Son las células más numerosas de la pulpa, secretan a los precursores de las fibras: colágenas, reticulares y elásticas y la sustancia fundamental de la pulpa¹⁷. Los fibroblastos se encargan además de la síntesis de la sustancia fundamental, es posible que estas células puedan reemplazar un odontoblasto que se pierda eventualmente. Se ha demostrado que tienen la capacidad de ingerir y degradar colágeno cuando son estimuladas adecuadamente¹⁷.

- Células mesenquimales: Derivan del ectodermo de las crestas neurales. Estos pueden diferenciarse en nuevos odontoblastos o fibroblastos, según el estímulo que actúe¹⁷. El número de células mesenquimales disminuye con la edad, reduciéndose la capacidad de autodefensa de la pulpa¹⁸.

- Macrófagos: En los procesos inflamatorios los histiocitos se transforman en macrófagos libres que se encargan de fagocitar microorganismos y eliminar células

muertas, también poseen una función inmunológica, fagocitan partículas extrañas y las presentarlas a los linfocitos. Además elaboran enzimas, facilitando su migración dentro del tejido conectivo¹⁷.

- Otras células del tejido pulpar: Linfocitos, células plasmáticas y en ocasiones eosinófilos y mastocitos, que son evidentes en los procesos inflamatorios¹⁷.

c) Fibras del tejido conectivo de la pulpa dental

- Fibras colágenas
- Fibras reticulares
- Fibras elásticas
- Fibras de oxitalán

-Zonas morfológicas de la pulpa dental: Histológicamente se pueden diferenciar cuatro zonas diferentes en la pulpa, desde la predentina (dentina sin mineralizar) hacia la pulpa:

- Zona odontoblástica: Es la capa más externa, constituida por odontoblastos, ubicados subyacente a la predentina. Entre los cuerpos se encuentran capilares, fibras nerviosas y células dendríticas¹⁶. Los cuerpos celulares se conectan entre sí por complejos de unión, las cuales mantienen la integridad de la capa odontoblástica. En las caras laterales predominan las uniones en hendidura que proporcionan vías de baja resistencia, regulan el intercambio de metabolitos de bajo peso molecular entre los odontoblastos y la capa odontoblástica de la pulpa coronal contiene más células por unidad de área que la de la pulpa radicular.

- Zona basal: Se encuentra debajo de la capa odontoblástica, con un ancho aproximado de 40 µm, relativamente libre de células.

- Zona rica en células: Contiene una proporción elevada de fibroblastos, puede contener además un número variable de macrófagos, células dendríticas y células

mesenquimatosas indiferenciadas o células madre. Es mucho más prominente en la pulpa coronal que en la radicular¹⁶.

- Zona central de la pulpa: Formada por el tejido conectivo laxo característico de la pulpa, con sus diversos tipos celulares, fundamentalmente fibroblastos, células ectomesenquimáticas y macrófagos de localización perivascular, pocas fibras inmersas en la matriz extracelular amorfa y abundantes vasos y nervios¹⁶.

La prevalencia de caries sigue siendo alta en todo el mundo, y la carga de la enfermedad afecta cada vez más a los grupos de edad avanzada y socialmente desfavorecidos en las culturas occidentales. Si no se trata, la caries avanzará a través de la pulpitis estimulante de la dentina y, finalmente, la infección y necrosis pulpar; sin embargo, si se trata de forma conservadora, la recuperación pulpar se produce incluso en las lesiones cariosas profundas¹⁹.

En presencia de pulpitis reversible producto de caries, existe un aumento del número de odontoblastos en el tejido pulpar, el que condicionaría su capacidad de respuesta reparativa y la formación de dentina reaccional. La estimación cuantificable del número de odontoblastos nos entrega información sobre la capacidad reparativa de la pulpa expuesta a una injuria²⁰.

La utilización de medicamentos sobre tejidos vitales, provoca una respuesta de tipo inflamatorio, que induce, tanto a los monocitos recién llegados al tejido como a los macrófagos residentes, a proliferar y expandirse²¹.

Las intervenciones pulpares están indicadas para la caries dental extensa. Dependiendo de la gravedad de la enfermedad, se encuentran disponibles tres técnicas de tratamiento pulpar: recubrimiento pulpar directo, pulpotomía y pulpectomía. Después del tratamiento, la cavidad se llena con un medicamento. Los materiales comúnmente utilizados incluyen agregado de trióxido mineral (MTA), hidróxido de calcio, formocresol o sulfato férrico²².

4.2.1 PULPOTOMÍA

La caries en la primera infancia es un grave problema de salud pública. Cuando la caries se extiende para afectar la pulpa, se intentan varias formas de tratamiento pulpar para estimular la reparación de los dientes. Aunque la pulpotomía es el tratamiento de elección para la exposición vital de la pulpa del diente primario, existe una tendencia entre muchos dentistas a realizar pulpectomías en los incisivos primarios vitales²³.

El tratamiento de los dientes cariados con signos y síntomas indicativos de pulpitis irreversible es tradicionalmente invasivo, pero la evidencia emergente sugiere resultados de tratamiento exitosos con un tratamiento pulpar vital menos invasivo como la pulpotomía coronal²⁴.

La pulpotomía en molares temporales es un tratamiento que consiste en la extirpación de la pulpa cameral y la fijación de la pulpa radicular mediante medicamentos, cuando la inflamación pulpar está limitada a la pulpa cameral²⁵.

La pulpotomía es uno de los métodos más utilizados para preservar la pulpa vital en los dientes, lo cual es de gran importancia para lograr la formación continua de raíces en dientes permanentes inmaduros que sufren de caries o traumatismos dentales²⁶.

El concepto de realizar la técnica de pulpotomía en molares temporales, con el fin de evitar su pérdida prematura, es muy antiguo. Los tratamientos odontológicos en niños considerados más avanzados en el siglo XIX ya incluían este concepto. La mayoría de los fármacos utilizados entonces, resina fenicada; discos desvitalizantes de arsénico y novocaína; pasta de alumbre y otros, fueron desechados con el uso²⁷.

Aunque se aceptaba la utilidad de la pulpotomía, la realización de esta técnica quedaba limitada a unos pocos odontólogos considerados avanzados en las técnicas de tratamiento odontológico de la infancia²⁷.

La utilización rutinaria se remonta a principios del siglo XX, cuando Buckley aplicó una mezcla de tricresol y formaldehído en un algodón, en la cámara pulpar, sellándola posteriormente. Al abrir la cámara pulpar unos días después observó que, según su descripción, “los gases y líquidos tóxicos habían sido convertidos en líquidos y sólidos no tóxicos”. Fue el inicio de la fórmula de Buckley que todavía se utiliza hoy en día²⁸.

En los años treinta, (Sweet, 1937), propuso la aplicación de una mezcla de óxido de zinc, eugenol y formocresol para el tratamiento pulpar de molares temporales. A partir de ese momento numerosos autores utilizaron el medicamento y, en la práctica, se desarrolló y universalizó la técnica operatoria para la pulpotomía²⁹.

Debido a la acción germicida y antiséptica de los compuestos utilizados, y a la poca dificultad de la técnica, el procedimiento fue un éxito, perdurando hasta la actualidad. Está ampliamente documentado en numerosos estudios, que representa el tratamiento pulpar más frecuentemente realizado en dentición temporal³⁰.

El éxito de la pulpotomía en el manejo de la pulpitis irreversible desafía la retórica de que la pulpitis irreversible solo puede manejarse mediante un tratamiento de conducto. Se debe considerar el análisis de costo-efectividad en lugar del análisis sobre la efectividad del resultado del tratamiento solo en todos los dominios de la atención médica para evaluar los beneficios de las opciones de tratamiento alternativas³¹.

El tratamiento con pulpotomía coronal también se puede considerar como una opción de tratamiento intermedio en el manejo de exposiciones pulpares vitales

cariosas de dientes permanentes con ápices radiculares cerrados. Esta opción también puede servir como un sustituto de la extracción cuando el tratamiento del conducto radicular no se puede realizar para pacientes de bajos ingresos y sin seguro o en áreas desatendidas³².

Procedimiento de la Pulpotomía

1. Aplicación de anestesia local.
2. Aislamiento absoluto de la pieza.
3. Retiro de la lesión cariosa.
4. Retiro del techo de la cámara pulpar mediante el uso de fresas.
5. Amputación de la pulpa coronal mediante el uso de cureta de dentina.³³
6. Hemostasia con algodón estéril (la hemostasia debería ser alcanzada dentro de los 4 minutos posteriores a la colocación del algodón). En ocasiones se prefiere agregar algodón con suero fisiológico.
7. Administración de la medicación pulpar.
8. Colocación de base óxido de zinc-eugenol (OZE) o IRM (OZE reforzado) y restauración final, de preferencia una corona de acero preformada.

4.2.2 FORMOCRESOL

La pulpotomía con formocresol es uno de los procedimientos más comunes en casos de exposición mecánica y cariosa en dientes temporales. Formocresol es un medicamento clínicamente exitoso a largo plazo para su uso en el procedimiento de pulpotomía, principalmente debido a su excelente éxito clínico y su facilidad de uso. Se han realizado varios estudios para investigar el riesgo de exposición al formocresol porque tiene riesgos mutagénicos, tóxicos y cancerígenos en humanos³⁴.

El formocresol fue introducido por Buckley a principios del siglo XX, contenía un 19% de formaldehído y un 25% de tricresol en una solución de 15% de glicerina y agua³⁵.

El formocresol fue introducido para tratar los dientes permanentes no vitales en los Estados Unidos por Buckley en 1904. En 1930, Sweet introdujo la técnica de pulpotomía con formocresol. El formocresol se ha convertido posteriormente en un popular medicamento de pulpotomía para los dientes primarios³⁶.

Hay diversos estudios publicados que relacionan su empleo con el éxito clínico que va desde el 55% al 98%. 67 3.2.3.2.

Composición:

- Formaldehído (19%)
- Cresol (35%)
- Glicerina (15%)
- Agua (31%)

La fórmula fue modificada de modo que los preparados comerciales habitualmente disponibles consisten en un 19% de formaldehído y 35% de cresol en una solución de glicerina y agua. La concentración 1:5 de esta fórmula se prepara mezclando primero tres partes de glicerina con una porción de agua destilada y luego agregando cuatro partes de este diluyente a una del formocresol³⁷.

La glicerina se utiliza como emulsión (vehículo) para prevenir la polimerización del formaldehído. El formaldehído, el más simple de los aldehídos, es un metabolito frecuente y un componente necesario para la síntesis de ciertos componentes bioquímicos esenciales en el hombre. El formaldehído, es una sustancia que ejerce acción de fijación tisular y antibacteriana, cuales son responsables del éxito clínico de la pulpotomía;³⁷ además que precipita proteínas y provoca trombosis e isquemia, el pequeño tamaño de su molécula facilita su penetración. El cresol es un cáustico antiséptico y disuelve las membranas celulares, además es una fuente

desinfectante pero no tiene propiedades fijadoras³⁸. Tanto el cresol como la glicerina atenúan el poder irritante del formaldehído.

Se considera que los compuestos del formocresol, son elementos tóxicos para las células, puesto que tienen una alta capacidad cáustica y provocan una inflamación y posterior necrosis total o parcial de los tejidos con los que entra en contacto³⁹.

El formocresol comenzó a usarse en Odontopediatría en 1930 y años más tarde se demostró su efecto citostático sobre la pulpa³⁹.

El formocresol es un agente fijador, que tiene capacidad momificante. Provoca una desnaturalización de las proteínas de la pulpa radicular más próxima a la cámara pulpar y se difunde hacia la pulpa más apical, fijando los tejidos en mayor o menor medida. En la mayoría de los casos permite una reabsorción normal y exfoliación de los dientes temporales, es un germicida potente, debido a su alta alcalinidad, no provoca reabsorciones internas y presenta un elevado porcentaje de éxito clínico⁴⁰.

En la pulpotomía, el formocresol se coloca en la base de la cámara pulpar en un área fija que está en contacto directo con el tejido pulpar (durante un período de 5 minutos)⁴¹.

El formaldehído, el primer componente del formocresol, es considerado como un potencial carcinógeno humano por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC). En 2009, la IARC afirmó que el formaldehído era un carcinógeno humano, causando leucemia y cánceres de la nasofaringe⁴².

El formaldehído (FA) interactúa con las moléculas biológicas, como el ADN, e induce enlaces cruzados ADN-proteína (DPC), estrés oxidativo, especies reactivas de oxígeno (ROS), metilación, daño cromosómico, fragmentación y aductos de ADN, que se consideran en los efectos genotóxicos más importantes causados por la exposición a FA⁴³.

La metabolización y excreción del formocresol absorbido ocurre por vía renal y pulmonar. El resto del formocresol se fija a los tejidos principalmente en los riñones, el hígado y el pulmón. Cuando se administró en dosis elevadas, se observaron efectos tóxicos agudos como alteraciones cardiovasculares, alteraciones enzimáticas en sangre y orina, así como signos histológicos de lesiones celulares en órganos vitales⁴⁴.

Esto ha estimulado las investigaciones de alternativas al formocresol, algunos de los cuales han demostrado eficacia equivalente a la de este medicamento. Sin embargo, hasta que este objetivo se logre, el formocresol debería seguir utilizándose en el tratamiento pulpar en pediatría (Lewis, 1998).

Por estas razones los esfuerzos por encontrar un sustituto a este medicamento se han incrementado durante los últimos años⁴⁵.

4.2.3 PROCEDIMIENTO CONVENCIONAL DEL TRATAMIENTO DE PULPOTOMÍA

Tomando en consideración que el diagnóstico para realizar una pulpotomía se establece mediante el protocolo de un examen clínico y radiográfico, los criterios a seguir serán una evaluación clínica, con la historia clínica y dental y una evaluación radiográfica que en conjunto establecerán la posibilidad de considerar la pulpotomía como alternativa de tratamiento tomando en consideración las indicaciones y contraindicaciones de una pulpotomía⁴⁶.

Boj y cols. (2007) proponen la técnica o pasos a seguir para realizar una pulpotomía convencional que consiste en lo siguiente:

Administración de anestesia local.

Aislamiento del campo operatorio, con dique de goma.

Apertura de la cavidad y eliminación de la dentina cariada, si existe. Con este procedimiento se impide la contaminación bacteriana pulpar y se obtiene una correcta observación de la zona expuesta.

Eliminación del techo de la cámara pulpar con fresa de tungsteno no. 330 a alta velocidad y refrigeración.

Extirpación de la pulpa cameral con un excavador agudo bien afilado o con fresa de tungsteno redonda grande no. 4 o 6 a baja velocidad con cuidado de no lesionar el tejido pulpar.

Lavado con suero fisiológico.

Controlar la hemorragia por presión con bolitas de algodón estéril.

Fijación de la pulpa radicular con un algodón ligeramente humedecido en formocresol, presionando ligeramente durante 3 a 5 minutos.

Obturación del fondo de la cavidad con una mezcla de óxido de zinc y eugenol, la cual se condensa suavemente sobre el piso de la cámara con torundas de algodón.

Obturación definitiva del diente⁴⁶.

En cuanto al efecto del formocresol en el tejido pulpar, histológicamente se ha observado que produce una primera zona amplia de fijación acidófila, en el tejido inmediatamente adyacente al lugar de aplicación. En dirección más apical, la fijación puede ser incompleta y, microscópicamente se observa una banda más ancha de tejido eosinófilo que se extiende al tercio apical del diente. La pérdida de detalle celular justifica la interpretación microscópica de necrosis por coagulación⁴⁶.

4.3 ALTERNATIVAS DE MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN LA PULPOTOMÍA

La pulpotomía de los dientes temporales proporciona resultados clínicos favorables a lo largo del tiempo; sin embargo, hasta la fecha, todavía no existe un consenso sobre un material de apósito pulpar ideal⁴⁷.

4.3.1 SULFATO FÉRRICO

Este compuesto hemostático fue propuesto en la teoría que podría prevenir problemas encontrados en la formación del coágulo, y por lo tanto minimizar los cambios por inflamación y reabsorción interna⁴⁸.

Las teorías en el uso de sustancias para inhibir el sangrado, han llevado a los investigadores odontológicos a realizar numerosos estudios, uno de los principales y más recientes es con el sulfato férrico $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, que es un compuesto constituido por dos sales, la sal de ácido sulfúrico y la sal férrica⁴⁹.

Recientemente se le han encontrado muchas ventajas y usos al sulfato férrico entre ellas, es un producto muy eficiente como hemostático, se ha utilizado en cirugía de endodoncia para controlar la hemorragia, también ha sido empleado como desinfectante, considerándolo a este entre los desinfectantes fuertes, es inoloro, no es irritante de los tejidos blandos, y además ha sido aplicado en restauraciones de piezas dentarias⁴⁸.

Las propiedades del sulfato férrico son: hemostáticas y biológicas con compatibilidad con los tejidos pulpaes y con algunas otras características favorables. Es bacteriostático y bactericida para factores agresivos y tiene la capacidad de reparación o formación de la dentina secundaria⁴⁹.

Se ha demostrado por medio de la literatura la excesiva información del formocresol, como sus propiedades. También se ha mencionado el glutaraldehído, y el hidróxido de calcio, pero en la actualidad se cuenta con el sulfato férrico al 15%, el cual ha demostrado mejores resultados histológicos que los productos ya mencionados⁵⁰.

El sulfato férrico minimiza los cambios de inflamación y de reabsorciones internas de los tejidos pulpaes⁵¹.

Cabe mencionar que el sulfato férrico no es un agente fijador, si no un agente hemostático que al momento de colocarlo en la pulpa su reacción en ese momento

es la coagulación, lo cual es importante mencionar. El formocresol momifica la pulpa con cierta agresión la cual provoca alguna inflamación sistémica al momento de fijar la pulpa dentaria³². Las ventajas que tiene el sulfato férrico, ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) es el control de hemorragias como también la aceptación de los tejidos de cuerpo humano; una desventaja del sulfato férrico es la pigmentación a los tejidos, como en la piel del cuerpo humano⁵².

4.3.2 MTA

El agregado de trióxido mineral (MTA) fue desarrollado por Torabinejad en la Universidad de Loma Linda en 1995. El agregado de trióxido mineral se introdujo como un material de apósito alternativo potencial para la pulpotomía de molares primarios con características de estimulación de la liberación de citoquinas de las células óseas, que induce la formación de tejido duro, un dentinogénico efecto sobre la pulpa, propiedades antimicrobianas y capacidad para mantener la integridad de la pulpa después del recubrimiento de pulpa y pulpotomía sin efecto citotóxico⁵³.

Recientemente, el agregado de trióxido mineral (MTA) ha atraído la atención como un medicamento de pulpotomía debido a su excelente capacidad de sellado, biocompatibilidad y estimulación de la formación de tejido duro. También parece tener una mayor tasa de éxito clínico y radiográfico a largo plazo que el Formocresol⁵⁴.

La pulpotomía parcial MTA mantiene una buena tasa de éxito por el seguimiento de 2 años en dientes permanentes maduros diagnosticados clínicamente con pulpitis irreversible⁵⁵.

El MTA se considera el material estándar de oro para los procedimientos de pulpotomía, tiene algunos inconvenientes (mala manipulación, potencial de tinción, tiempo de fraguado prolongado); por lo tanto, es importante evaluar el desempeño clínico de otros cementos⁵⁶.

El MTA como agente de pulpotomía ha mostrado resultados favorables en el caso de los molares primarios. Hay literatura limitada disponible con respecto a su uso en incisivos primarios. Sin embargo, el éxito de la terapia pulpar vital con MTA depende de la selección adecuada del caso y de la técnica de manejo del diente que del material en sí⁵⁷.

4.3.3 GLUTARALDEHÍDO

El glutaraldehído se ha recomendado como sustituto del formocresol en los procedimientos de pulpotomía en dientes primarios. Gravenmade propuso que el glutaraldehído podría usarse como un nuevo agente pulpar y que ofrecía las características positivas del formocresol sin inducir los efectos secundarios menos deseables porque es un agente activo que retícula las proteínas en virtud de sus dos sitios activos. El glutaraldehído también ha demostrado una superioridad del tejido con una inmunogenicidad relativamente pequeña, y se difunde mínimamente a través de los tejidos. Sin embargo, Rusmah y Rahim informaron que el 2% de glutaraldehído tamponado no se difundió fuera del cemento y la dentina de los dientes primarios pulpotomizados en los niños. Además, no hubo evidencia de amputación periapical⁵⁴.

4.3.4 ELECTROCIRUGÍA Y LÁSER

La electrocirugía se ha utilizado en odontología para extirpar tejidos blandos y controlar la hemorragia asociada con procedimientos quirúrgicos periodontales y orales. En 1957, las leyes informaron el uso de pulpotomías de electrocoagulación en la pulpa de los dientes permanentes en pacientes entre las edades de 11 y 27 años. Después de 4 meses, se encontró que la técnica producía una amputación en el 37% de los casos tratados. Yakuschji estudió técnicas electroquirúrgicas para pulpotomías de seis dientes primarios. Encontró respuestas pulpares favorables cuando los dientes fueron examinados hasta 13 días⁵⁸.

4.3.5 HIDRÓXIDO DE CALCIO

El hidróxido de calcio se introdujo en combinación con otras sales como un agente que cubre la pulpa llamado calxil.

La principal desventaja del hidróxido de calcio como medicamento en la terapia de la pulpa primaria es la frecuente búsqueda de la resorción interna. Las investigaciones que describen fallas en el uso de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ en los dientes primarios debido al frecuente desarrollo de pulpa crónica en la amación y la reabsorción interna incluyen las de Via y Magnusson. Además, Schroder informó que se produjo una reabsorción interna de la dentina después de la pulpotomía para dientes primarios cuando se usaba $\text{Ca}(\text{OH})_2$, en parte porque la pulpa inflamada crónicamente está presente en el momento del tratamiento o es inducida por un tratamiento inadecuado de la herida, como dejar un coágulo de sangre. entre la superficie de la herida y el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ⁵⁸.

4.3.6 BIODENTINE

Septodont desarrolló un nuevo cemento de silicato tricálcico (Biodentine™) que podría unir características mecánicas perfectas con una biocompatibilidad sobresaliente, además de un rendimiento bioactivo. Biodentine™ se ha introducido y progresado (a través de la tecnología de bio-silicato activo) con el propósito de incorporar una mayor biocompatibilidad y bioactividad de los silicatos de calcio, produciendo características mejoradas que hacen que sea mejor que cualquier otro cemento a base de silicato de calcio, como un tiempo de fraguado rápido, alta resistencia a la compresión y fácil manejo, así como sus múltiples usos tanto en endodoncia como en odontología restauradora sin que resulte en la decoloración de los dientes tratados⁵⁷.

Los dientes permanentes jóvenes con exposición a caries pueden tratarse con éxito con pulpotomía completa utilizando Biodentine, y los signos y síntomas clínicos de pulpitis irreversible no son una contraindicación⁵⁹.

La pulpotomía completa con Biodentine es una opción de tratamiento exitosa para pulpas expuestas a caries en molares permanentes maduros con signos y síntomas clínicos indicativos de pulpitis irreversible, hasta por 1 año⁶⁰.

4.3.7 HUESO LIOFILIZADO

Fadavi et al evaluaron los efectos del hueso liofilizado en la pulpa amputada en 15 dientes de mono primarios y uno permanente. Compararon estos dientes con los dientes tratados con Ca (OH) 2 y formocresol. El hueso liofilizado mostró una barrera de calcificación completa o parcial directamente debajo del sitio de amputación, y se mostraron resultados similares en el grupo de Ca (OH) 2 después de 3 meses; sin embargo, los resultados en el grupo de formocresol fueron comparables a los de estudios publicados previamente⁵⁸.

4.3.8 COLÁGENO

Nevins et al informaron sobre un estudio histológico con gel de colágeno y fosfato de calcio en pulpotomías de los dientes de nueve monos Rhesus que fueron seguidos durante 4 a 8 meses. Los resultados mostraron la reabsorción de gel y el reemplazo de tejidos duros en 14 de 16 dientes, sin observarse en las muestras a largo plazo. Bimstein y Shoshan informaron sobre un estudio histológico utilizando nutrientes celulares enriquecidos en solución de colágeno para pulpotomías de los incisivos permanentes anteriores de perros jóvenes. Después de 30 días, notaron la regeneración completa del tejido pulpar. Fuks et al utilizaron una solución de colágeno enriquecida para pulpotomías de dientes primarios en monos. Después de 60 días, todos los dientes tratados con colágeno mostraron una apariencia radiográfica normal de dentina con formación de puente. Después de 60 días, el 80% de los dientes tenía pulpa vital, y el otro 20% mostró una severa inflamación⁵⁸.

5. ASPECTOS BIOÉTICOS Y LEGALES

La utilización de animales en investigación, enseñanza, y experimentación es aceptable únicamente si promete contribuir al entendimiento de principios biológicos fundamentales o al desarrollo de conocimientos que puedan beneficiar a humanos o animales. Esto es aplicable en investigación biomédica y biológica, donde se emplean modelos animales para el estudio de enfermedades humanas o de mecanismos fisiológicos específicos. Se deben buscar alternativas antes del uso de animales, y solo cuando no se encuentren o no sean viables, se recurrirá a ellos, utilizando el menor número posible⁶¹.

La experimentación con animales es objeto de controversias. Algunas personas, defensores de los animales, piensan que no es aceptable su uso con fines científicos a riesgo de hacerlos sufrir o afirman que los resultados obtenidos con animales no son transponibles en el ser humano. Otros, en particular los investigadores en biología o medicina, piensan que los modelos animales son fundamentales para la búsqueda biomédica. Esta confrontación de opiniones se basa en gran medida en una evolución del lugar de los animales en nuestra sociedad. La normativa autoriza el uso de animales con fines científicos pero obliga a hacerlo en condiciones restrictivas⁶¹.

Los modelos animales se han utilizado en la investigación experimental para aumentar el conocimiento humano y contribuir a encontrar soluciones a cuestiones biológicas y biomédicas. Sin embargo, la creciente preocupación por el bienestar de los animales utilizados y una mayor conciencia del concepto de derechos de los animales ha traído un mayor enfoque en las cuestiones éticas relacionadas⁶².

La ciencia de animales de laboratorio surge para proporcionar a la comunidad científica la formación y directrices en todos los aspectos relacionados con la experimentación animal. Su marco ético plantea que los animales no deben ser

sometidos a sufrimiento físico o psicológico y se regula por estrictas normas bioéticas⁶³.

El uso de animales en experimentación es ético cuando no hay otra alternativa y su propósito está vinculado con la obtención de un bien mayor. Cada institución donde se realice esta práctica tiene que instaurar un comité institucional de cuidado y uso de animales de laboratorio (CICUAL), cuyo reglamento estará regido por la legislación nacional; si no la hubiese, se regirá por normativas internacionales⁶⁴.

La ciencia responsable es un término amplio que se refiere a alta calidad, investigación reproducible que también aborde el potencial animal preocupaciones de bienestar, normativas y de seguridad, realizadas con un alto principios éticos, incluida la consideración de la amplia gama implicaciones para el trabajo que están realizando⁶⁵.

- En investigación: se usan vertebrados vivos para responder interrogantes específicas⁶⁶.
- En enseñanza: se usan vertebrados vivos para ilustrar principios o técnicas a estudiantes, las cuales no pueden llevarse a cabo usando alternativas no animales⁶⁶.
- En experimentación: se usan vertebrados vivos en ensayos de seguridad y eficacia de compuestos, en los que se evalúan sus efectos, previo a su uso en humanos⁶⁶.
- En diagnóstico: se usan vertebrados vivos para el diagnóstico de enfermedades.⁶⁶

El uso de animales debe regirse por los enunciados de Russell y Burch (1959), conocidos como las 3 R's: reducción, refinamiento y reemplazo⁶⁶.

- Reducción: se refiere al tamaño apropiado de la muestra. Se enfoca en el uso del menor número de animales con los que se puedan obtener resultados estadísticos válidos⁶⁶.

- Refinamiento: se refiere al uso de los métodos y técnicas depuradas, con las que se espera minimizar la incomodidad que se ocasiona a los animales⁶⁶.
- Reemplazo: se refiere al uso de especies bajas en la escala evolutiva, de modelos de computadora, cultivos de células, o cadáveres⁶⁶. También, atado a refinamiento, se refiere al reemplazo de procedimientos dolorosos, que pueden causar sufrimiento animal, por procedimientos no dolorosos⁶⁶.

Razones por las que se utilizan animales en la investigación Biomédica:

1. Para comprender como funcionan nuestros cuerpos: Debido a las similitudes entre humanos y animales, los investigadores usan modelos animales para comprender como funciona nuestro cuerpo, buscando conocimientos biológicos fundamentales que puedan aplicarse para mejorar la salud de los seres humanos y animales⁶⁷.
2. Como modelos para estudiar enfermedades: Los humanos y los animales comparten cientos de enfermedades, por lo mismo los animales pueden actuar como modelos para el estudio de las enfermedades humanas⁶⁷.
3. Para evaluar potenciales maneras de tratamiento: Cuando los investigadores poseen conocimiento de una enfermedad en particular, desarrollan planes de tratamiento, los cuales se prueban en animales. Los datos de estudios en animales son esenciales, deben poseerse, antes que las nuevas técnicas terapéuticas y procedimientos quirúrgicos puedan ser evaluados en humanos⁶⁷.
4. Para evaluar la eficacia y seguridad en nuevas drogas: Para identificar nuevas drogas se requiere de animales en los que los investigadores puedan cuantificar los efectos, tanto benéficos como dañinos, de los compuestos en los órganos y tejidos del organismo⁶⁷.

5.1 CUIDADO DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO

Cuando se emplean animales, se debe proveer para su comodidad física, así como por su bienestar psicológico. Las necesidades básicas incluyen un ambiente apropiado (temperatura, ventilación, humedad, ciclo de luz, comida, agua,

enjaulado, niveles de ruido). La cantidad de espacio debe ser adecuada a la especie, pero más no es necesariamente mejor⁶⁷.

Vivienda:

- Se prefieren jaulas con piso continuo a aquellas de enrejado metálico.⁶⁸
- Los animales deben colocarse, cuando sea apropiado y posible, en situaciones sociales⁶⁸.
- Deben proveer ambientes adecuados a la especie⁶⁸.

Ambiente:

- Los animales se acomodan de acuerdo a la especie⁶⁸.
- Se les proporciona comida apropiada y agua⁶⁸.
- Los animales se inspeccionan diariamente, en busca de signos de enfermedad o estrés⁶⁸.

Criterios para eutanasia temprana:

- Los criterios para una eutanasia temprana se deben definir claramente antes de iniciar cualquier trabajo que involucre animales⁶⁸.
- La muerte no es un fin aceptable. Las muertes sin anestesia no deben de ocurrir en laboratorios de investigación⁶⁸.
- Entre los criterios para realizar una eutanasia temprana se incluyen pérdida de peso del 15 % o más, deshidratación, pilo erección en roedores, depresión y letargo⁶⁸.

Anestésicos y analgésicos

Se deben utilizar analgésicos y anestésicos apropiados para prevenir que los animales sufran dolor innecesario.⁶⁸ En la mayoría de los casos los analgésicos no interfieren con los resultados de la investigación. De hecho, previniendo el dolor se acelera la recuperación del animal y se reduce la pérdida de peso⁶⁸.

Reconocimiento de dolor o aflicción.

Hay que buscar alteraciones en el nivel de actividad del animal, andadura, temperamento, apetito, consumo de agua y apariencia. Hay que buscar por ojos opacos, pelambre erecto (pilo erección), pérdida de interés en lo que lo rodea, e incremento en la respiración o el pulso⁶⁸.

Es probable que si un procedimiento similar causa dolor en los humanos también causa dolor en los animales⁶⁸.

El promover altos estándares de cuidado y de bienestar animal conduce a resultados científicos de alta calidad y maximiza el uso de los fondos de investigación⁶⁸.

5.2 INFRAESTRUCTURA PARA LA EXPERIMENTACIÓN CON ANIMALES

El lugar donde se alojan los animales de experimentación se denomina bioterio, animalario o estabulario, y se define como la instalación dedicada a la crianza, mantenimiento, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Es necesario que tanto el bioterio como su personal proporcionen al animal un perfecto estado de salud física y mental en sincronía con el ambiente, libre de hambre, sed y malnutrición; libre de miedo, ansiedad y angustia; libre de incomodidad física, frío, y calor; libre de dolor, lesión y enfermedad y libre para expresar su comportamiento natural.

Con respecto al macroambiente, es fundamental asegurar la higiene y desinfección de las salas de alojamiento, y controlar constantes ambientales como temperatura, humedad relativa, ventilación, iluminación, altas concentraciones de amoníaco y ruido⁶⁹.

5.2.1 LA SALUD DE LOS ANIMALES DEBE SER EVALUADA DE FORMA PERIÓDICA

A pesar del desarrollo de poderosas técnicas y tecnologías de biología molecular, los estudios que involucran animales de investigación siguen siendo un componente clave de la biología de descubrimiento y en el descubrimiento y desarrollo de nuevos

medicamentos. En 1959, se desarrollaron los Principios de la Técnica Experimental Humanitaria, las 3R (Reemplazo, Reducción y Refinamiento) para proporcionar un marco para garantizar que la investigación con animales se emprendiera de la manera más humana posible⁶³.

El personal capacitado ha de evaluar el estado de salud de los animales de forma rutinaria, no solo por obligación legal y moral, sino también para garantizar resultados fiables y repetibles. Es necesario que esta evaluación sea más amplia y frecuente en procedimientos invasivos, quirúrgicos y a la llegada del animal al bioterio⁶⁴.

Cuando se utilicen animales en la experimentación se deben tener presentes diferentes “principios” que garanticen su bienestar. Entre ellos: la utilización de los animales solo cuando sea necesario y justificado, garantizarles un entorno adecuado a sus necesidades y una manipulación apropiada, y ofrecerles supervisión profesional que garantice su salud y bienestar.

El principio de las tres erres: reducción del número de animales en cada experimento, refinamiento de los métodos experimentales y remplazo por técnicas sin animales, constituye un referente en el respeto hacia la vida de animales no humanos. Es ético experimentar para la consecución del bienestar humano, pero sin ocasionar daño desproporcionado a seres vivos, que al igual que los humanos, tienen derecho al bien máspreciado “la vida”⁶³.

Las nuevas tres erres: responsabilidad en el proceso de capacitación de las personas, respeto: reconocer el sufrimiento y el dolor del animal, y reubicar, buscar otro fin diferente a la eutanasia. Estos aspectos son producto del análisis profundo de la utilización de animales no humanos en experimentación y para beneplácito de muchos, encausan el camino en la lucha por defender los derechos de los animales todos, y no solo de aquellos utilizados en experimentación⁶⁷.

En gran medida, gracias a la investigación en animales los científicos han descubierto maneras de sanar enfermedades y prolongar la vida humana. Por

ejemplo, la creación de vacunas (poliomielitis), el desarrollo de los trasplantes de órganos, las transfusiones de sangre, la diálisis para los pacientes de riñón, técnicas quirúrgicas y de traumatología y el valor terapéutico de las medicinas modernas, que se prueban primero en animales. Esta investigación ha servido también para conocer el funcionamiento de los sistemas orgánicos, debido a que existen semejanzas significativas entre los sistemas fisiológicos de los seres humanos y los de varias especies animales. Mucho de lo que sabemos sobre el sistema inmune se ha obtenido de los estudios con los ratones⁶⁷.

El ratón es el modelo animal más usado en la actualidad para el análisis de enfermedades humanas de origen genético, ya que permite un control adecuado de la base genética del organismo y de las posibles alteraciones genéticas que acompañan el desarrollo de la enfermedad. Por tanto, la importancia de estos modelos es enorme para el estudio *in vivo* de la función de ciertos genes en el desarrollo de la enfermedad, para la identificación de nuevas moléculas diana y para el ensayo preclínico de nuevas terapias dirigidas a estas moléculas. Su estudio es clave para decidir si una determinada estrategia terapéutica es efectiva o supone riesgos secundarios en la salud de los pacientes⁶⁷.

Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales incluyen la posibilidad de manipular información genética nueva dentro de la célula y transmitirla a la línea germinal. Por otro lado, el ratón tiene un ciclo reproductivo muy corto con tamaño de camadas grandes; es un animal pequeño, manejable, resistente, bien caracterizado en cuanto a su biología y muy usado en el laboratorio. Es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes. Para el ratón existe un número abundante de anticuerpos y sondas de cADN, y se han construido bibliotecas genómicas y de cADN para cada cepa de ratón. Es relativamente barato en comparación con otros animales experimentales y su mantenimiento, aun en condiciones de alta seguridad, es relativamente sencillo⁶⁹.

Todo aquel que en sus investigaciones utilice animales de laboratorio, debe guardar una premisa: el respeto por la vida, por el dolor o el sufrimiento al que éstos pueden ser sometidos en los estudios que conduce. Esta responsabilidad involucra desde el bioterista encargado de la producción y el cuidado de los animales hasta al directivo de la institución productora o usuaria de los mismos⁶⁹.

Está ampliamente aceptado que, como parte del cuidado humanitario y el uso de animales en la investigación, el dolor experimentado por los animales debe minimizarse en la medida de lo posible, en consonancia con los objetivos de la investigación. En algunos casos, el dolor puede ser el tema de estudio, mientras que en otros casos, el uso de algunos tipos de analgésicos puede interferir con los objetivos experimentales del trabajo⁷⁰.

5.3 INYECCIONES

La inyección intradérmica es una técnica utilizada frecuentemente en estudios de: inflamación, sensibilización, diagnóstico de flujo sanguíneo cutáneo y en inmunología.

La inyección intramuscular se utiliza como una vía de administración sistémica, en estudios de liberación lenta (formulaciones oleosas) y en valoración de vacunas. La inyección intraperitoneal se utiliza para administrar volúmenes relativamente grandes de sustancias solubles. Su utilización es muy común en pequeños roedores y peces.

La vía intravenosa se usa con frecuencia en experimentos farmacológicos y toxicológicos de biodisponibilidad inmediata

Comúnmente usada para la administración de compuestos irritantes o imposibles de ser administrados por otras vías⁷⁰.

6. TIPOS DE RATAS

El ratón es un mamífero que comparte algunas características anatómicas y fisiológicas con otros mamíferos, incluido el hombre, como: sangre caliente, presencia de pelo, y corazón dividido en 4 compartimientos. Las similitudes compartidas por ratones y hombre son esenciales par fines comparativos⁷¹.

Debido a que envejece 30 veces más rápido que los humanos, lo que permite ver los resultados de ciertos estudios a lo largo de varias generaciones en períodos cortos ⁷¹.

Pertenece al orden de los roedores, el más abundante dentro de la Clase mamíferos. El ratón debe disponer de agua y comida en toda oportunidad⁷¹.

Tabla 1. Constantes fisiológicas del ratón	
Constante	Promedio
Temperatura rectal	37.4°
Movimientos respiratorios por minuto	84-230
Frecuencia cardiaca	330-780
Peso corporal	0.025kg (adulto)
Pubertad	35-40 días de vida

Sprague-Dawley: Son un tipo de rata albina muy tranquila y fácil de manejar en el laboratorio.

Wistar: Crecen más lentamente que la Sprague-Dawley y también es albina.

Long Evans: Se utilizan para estudios de psicología y comportamiento (estos típicos que incluyen laberintos, por ejemplo). No son albinas.

Fisher F344: Se utilizan para estudios de inmunología y teratología.

SHR y WKY: Se utilizan para el estudio de la hipertensión⁷⁰.

Aunque las ratas exógamas Sprague Dawley se utilizan comúnmente en estudios de comportamiento, fisiológicos y farmacológicos, pueden surgir diferencias

dramáticas en las respuestas de las ratas obtenidas de diferentes proveedores incluso cuando el sexo, la edad y las condiciones ambientales se mantienen constantes⁷².

La Asociación Médica Mundial (AMM) ha actualizado la Declaración de Helsinki y la ha sometido a constantes revisiones, desarrollando así un cuerpo de principios y criterios de actuación mediante artículos que posteriormente se aplican con protocolos adicionales.

Los estudios clínicos y la investigación biomédica son fundamentales para mejorar el bienestar y la salud del entorno social y de cada individuo. Deben respetarse ciertas condiciones que garanticen el respeto a la vida, a la dignidad del paciente y a considerar la investigación como un medio que se ajuste a los principios subalternos de procurar la salud⁷³.

7. PREPARACIÓN DE TEJIDOS

Los tejidos deben estar preparados adecuadamente para su observación. Los métodos de preparación se dividen, según el estado en que se encuentren los tejidos, en dos grupos⁷⁴ :

1. Métodos para observar células vivas, y
2. Métodos para observar células fijadas.

En los tejidos vivos se pueden estudiar al mismo tiempo estructura y función; pero son difíciles de manejar y se dispone de ellos por cortos períodos, por lo que, generalmente, se emplean preparaciones fijadas y teñidas, en las que solo se estudia la estructura⁷⁴ .

Los tejidos generalmente se estudian por medio de cortes, los cuales son preparaciones más o menos permanentes. Las técnicas histológicas son las diversas maneras en que se pueden preparar los cortes. De manera general, un

corte se prepara cortando una porción delgada de un fragmento pequeño de tejido fijado, que después se tiñe, se monta en un medio con índice de refracción adecuado sobre un portaobjetos, y finalmente se cubre con un cubreobjetos⁷⁴.

El método de producción de un corte de tejido teñido con lleva la obtención de la muestra, la fijación de la misma, su inclusión, corte, tinción y montaje⁷⁴.

Obtención de la muestra. Se debe obtener material fresco, proveniente de un animal anestesiado o inmediatamente después de su muerte, para evitar la degradación del tejido⁷⁴.

Fijación. Pretende conservar el protoplasma con la menor alteración posible con respecto al tejido vivo, por lo que debe efectuarse con brevedad para evitar su autólisis. La mayoría de los fijadores coagulan el protoplasma, haciéndolo insoluble, y endurecen el tejido para facilitar su corte; algunos pueden conservar los carbohidratos y los lípidos. Muchos fijadores aumentan la afinidad del protoplasma por ciertos colorantes^{74, 75}. Los bloques de tejido deben de ser delgados para permitir que el fijador penetre en ellos en un tiempo razonablemente corto; para este fin se recomienda que posean un grosor no mayor a 0.5 cm y que se encuentren inmersos, en al menos, 20 veces su volumen de fijador. Los reactivos que se emplean con más frecuencia como agentes fijadores son formalina, alcohol, bicloruro de mercurio y algunos ácidos. La elección del fijador se relaciona con el tejido a estudiar y el método de tinción que se usará. Debido a su compatibilidad con la mayoría de las tinciones, formalina al 10 % es el agente fijador más utilizado. La duración de la fijación depende, como ya se mencionó, del tamaño de la muestra del tejido^{74, 75}.

Descalcificación. El tejido calcificado debe colocarse en solución descalcificadora para poder cortarlo con el micrótomo de tejido blando; el revolver o agitar la solución descalcificadora acelera el proceso. Las soluciones más empleadas son ácido nítrico, ácido fórmico y citrato de sodio, ácido sulfo-salicílico⁷⁵.

Inclusión. Tiene como finalidad proporcionar un soporte rígido al bloque de tejido para que se puedan hacer cortes delgados. Antes de la inclusión debe lavarse con agua, entre 3 a 24 horas, para eliminar el exceso de fijador y luego se deshidrata pasándolo por soluciones de concentración creciente de alcohol etílico. Luego el tejido se aclara, lo cual consiste en eliminar el agente deshidratante y sustituirlo por un líquido que pueda mezclarse con él y con el medio de inclusión. Los agentes aclarantes incluyen xilol, cloroformo, benceno y aceite de cedro. Después de aclarado, el tejido se infiltra con el medio de inclusión para obtener una masa homogénea firme que contiene el tejido incluido. Para este propósito se emplean parafina celoidina, nitrocelulosa y carbowax. La inclusión en parafina es rápida y útil para cortes delgados^{74, 75}.

Corte. El bloque de tejido incluido se recorta, por lo general en forma de cubo, y se monta en el micrótopo, con cuya hoja se obtienen cortes de espesor de 3 a 10 micras. Cada corte se pasa a un portaobjetos limpio, previamente marcado, sobre el que se ha extendido un poco de albúmina de huevo. Se hace correr agua por debajo del corte y se coloca el portaobjetos en una platina caliente. El agua se evapora y el corte queda colocado sobre la superficie de vidrio, a la cual queda adherido^{74, 75}.

Tinción. Su propósito es destacar el contraste natural y hacer más evidentes los diversos componentes. La mayor parte de los colorantes se emplean en solución acuosa y por ello, para teñir un corte de parafina, es necesario eliminar ésta por medio de un solvente de parafina o agente aclarador, generalmente xilol o toluol. Luego el corte se pasa por concentraciones decrecientes de alcohol antes de teñirlo^{74, 75}.

Los colorantes utilizados son sustancias químicas complejas que se pueden clasificar como generales o específicos, con respecto a las estructuras que colorean⁷⁴.

Los colorantes de uso general pueden ser ácidos o bases, pero de hecho pueden ser sales neutras que tienen radicales tanto ácidos como básicos. Cuando la propiedad colorante del tinte está en el radical básico de la sal neutra se dice que es un colorante básico, y las estructuras que se tiñen con él, se llaman basófilas. Cuando la propiedad colorante está en el radical ácido de la sal neutra se habla de un colorante ácido, y las estructuras que se tiñen con él, se llaman acidófilas. Los colorantes básicos tienen carga positiva y los ácidos tienen carga negativa ⁷⁴.

La hematoxilina, usada por primera vez en 1863, es el colorante básico más usado, su propiedad colorante depende de la presencia en solución de su producto de oxidación, la hemateína. Cuando se tiñen con este colorante los núcleos celulares aparecen azules ^{74, 75}.

La eosina, el ácido pícrico, el cromotropeo, el azul de tripano y el rojo de tripano son colorantes ácidos, los cuales habitualmente se emplean para teñir el citoplasma ⁷⁴.

La mayoría de los cortes histológicos se tiñen con una combinación de colorante, uno básico y uno ácido. La combinación más frecuente es la de hematoxilina y eosina, en la que las estructuras nucleares se tiñen de azul o púrpura oscuras y las estructuras citoplásmicas y las sustancias intercelulares de rosado ⁷⁴.

Montaje. Antes del montaje se elimina del corte el exceso de colorante lavándolo con agua o alcohol, luego se deshidrata pasándolo por concentraciones crecientes de alcohol. Después del alcohol absoluto, el corte se pasa a una solución de agente aclarador. Luego se saca de este agente y se le pone una gota de medio de montaje, se cubre con un cubreobjetos y se deja secar. Cuando el medio de montaje seca la muestra está lista para el estudio al microscopio ⁷⁴.

8. MICROSCOPIA

Para el estudio del material biológico se dispone de varios tipos de microscopios, los cuales, según el tipo de fuente luminosa que emplean, se pueden clasificar en

⁷⁴
:

1) Microscopios que utilizan luz visible, entre los que se encuentran el óptico, el de luz polarizada, el de contraste de fases, el de interferencia y el de campo oscuro; y

2) Microscopios que utilizan luz invisible, que comprenden el de luz ultravioleta, el electrónico, el electrónico de transmisión y el electrónico de centello.

La utilidad de un microscopio depende de sus capacidades de aumento y de resolver detalles. El microscopio más usado es el óptico, que posee un aumento útil de 1500 veces (1500 x). El poder de resolución es la medida de la capacidad del microscopio para separar claramente dos puntos que se encuentran muy juntos ⁷⁴.

El microscopio óptico actúa como un mecanismo de ampliación en dos etapas: primero, la lente del objetivo proporciona el aumento inicial, y segundo, la lente del ocular amplifica la imagen por segunda vez. El aumento total se obtiene multiplicando el poder de ampliación del objetivo por el del ocular. La lente ocular que se usa con mayor frecuencia tiene una ampliación de x 10; el objetivo consta de varias lentes colocadas en un disco giratorio en el extremo inferior del tubo del microscopio, las cuales se pueden intercambiar según se necesite. Los 4 objetivos usados sistemáticamente son ⁷⁴:

1. De pequeño aumento (x 10): da un aumento total de x 100.
2. De mediano aumento (x 25): da un aumento total de x 250.
3. De gran aumento (x 40): da un aumento total de x 400.
4. De inmersión en aceite (x 100): da un aumento total x 1000.

La extensión de lo que se puede ver en un corte histológico disminuye en proporción del aumento que se está utilizando⁷⁴.

También se emplea una lente condensadora, la cual concentra la luz proveniente de la fuente de iluminación en un haz muy brillante que ilumina el objeto. La lente condensadora no influye en el aumento total, pero sí en la calidad de la imagen observada⁷⁴.

9.MÉTODOS

La muestra para este estudio estará formada por 12 ratas Sprague-Dawley, hembras, cuyo peso oscila entre 150 y 250 gramos adquiridas en el bioterio de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco (UJAT) con su correspondiente certificado de procedencia, las cuales se recibieron en el bioterio del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de Nuevo León (Figura 1). El tratamiento se realizó en el incisivo inferior izquierdo y todos los procedimientos realizados en las ratas fueron acordes a la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (Figuras 2, 3).

Se eligió a las ratas Sprague-Dawley ya que su uso en la investigación es múltiple, por que se adapta a las condiciones ambientales dentro de un bioterio, es dócil y se cuenta con amplia información anatómica, fisiológica, y genética de las mismas. Sus etapas embriológicas son similares a la del hombre, los mecanismos y principios de crecimiento en las dos especies son esencialmente parecidos.

Criterios de selección:

Criterios de Inclusión.

- Ratas sin ninguna alteración sistémica o congénita.
- Ratas que al término del proyecto se mantengan sanas.

Criterios de exclusión.

- Ratas que al término del proyecto presenten algún signo de enfermedad o alteración.

Criterios de eliminación.

- Ratas que mueran durante el estudio.

Las ratas de esta raza están suficientemente capacitadas para proveer cantidades adecuadas de tejido para trabajos experimentales, sin necesidad de utilizar grandes muestras de la misma, lo que resulta mucho más económico para la mayoría de los estudios científicos.

Las ratas Sprague – Dawley han sido y siguen siendo utilizadas no solamente en investigaciones genéticas y de reproducción, sino en el área odontológica por su propensión a ser artificialmente sin tener mayores complicaciones.

De acuerdo a la llegada de las ratas Sprague-Dawley de 2 a 3 semanas de adaptación del modelo animal, antes de la pulpotomía se obtuvo el peso de las ratas, se administro anestesia peritoneal, se coloco el animal en una cabina biológica y se realizó la pulpotomía de acuerdo a la técnica de Boj.

Se realizaron 9 pulpotomías en incisivos izquierdos de ratas Sprague-Dawley hembras, las 9 pulpotomías se les realizó con técnica de formocresol y 3 ratas como control (Figura 4).

Las pulpotomías fueron realizadas con formocresol diluido en proporción de 1:5 utilizándose la técnica de 3 a 5 min en caso de pulpa vital.

Las ratas fueron sacrificadas a las 72 horas, 8 y 15 días en grupos de 3 ratas mediante la técnica de sobredosis de anestesia. Serán en total 3 ratas en cada uno de los tiempos, de las cuales 9 pertenecerán al grupo experimentales y 3 al grupo testigo (Figura 5).

Los tiempos en que se sacrificaron las ratas fueron los siguientes:

- Grupo A: se sacrificó a las 72 horas después de la pulpotomía.
- Grupo B: se sacrificó a los 8 días después de la pulpotomía.
- Grupo C: se sacrificó a los 15 días después de la pulpotomía.

Una vez sacrificadas las ratas, se realizó la disección de pulmón y corazón para proceder a su estudio histológico. Se fijarán en una solución de formol al 10%, cada uno debidamente etiquetado según su grupo (Figura 6). La fijación tendrá como objetivo preservar las estructuras tisulares y celulares de tal forma que muestren el mayor parecido posible a su estado in vivo, para su posterior análisis.

Posteriormente se realizó la técnica histológica para obtener las laminillas con los cortes de cada órgano (Figura 7) y finalmente se observaron al microscopio óptico (Figura 8).

Para la lectura con el microscopio óptico se observó con los objetivos panorámicos 4x, 10x y 40x y se procedió al llenado de la ficha de recolección de datos. Los parámetros a evaluar fu los siguientes:

Tabla 2.CRITERIOS DE EVALUACIÓN HISTOLÓGICA (PARA 7, 8 Y 15 DÍAS)
--

Respuesta de células inflamatorias

- | |
|--|
| <ul style="list-style-type: none">- Muy leve: Edema, congestión vascular, ausencia de células inflamatorias en el sitio de reacción.- Leve: Edema, congestión vascular, focos hemorrágicos, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, en el sitio de reacción.- Moderado: Edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico.- Severo: Edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico. |
|--|

Figura 1
Bioterio



Figura 2
Administrando inyección
peritoneal



Figura 3
Cabina Biológica



Figura 4
Realización de pulpotomías

Figura 5
Sacrificio de Rata para obtener corazón y pulmón

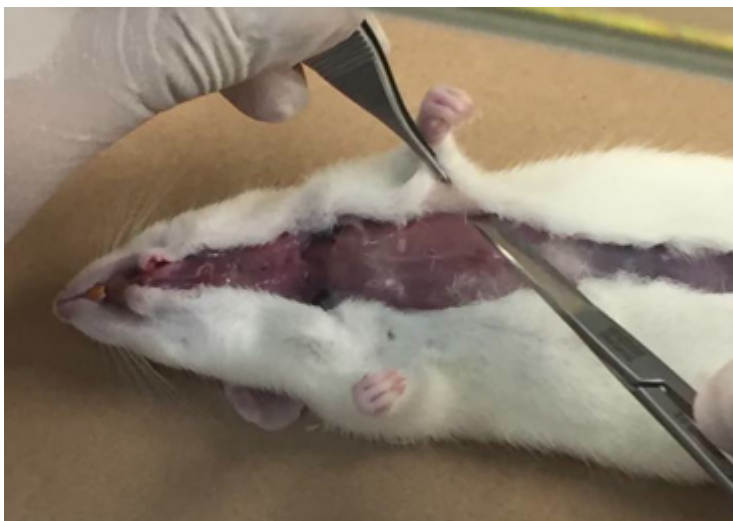


Figura 6
Organos Corazón y Pulmón

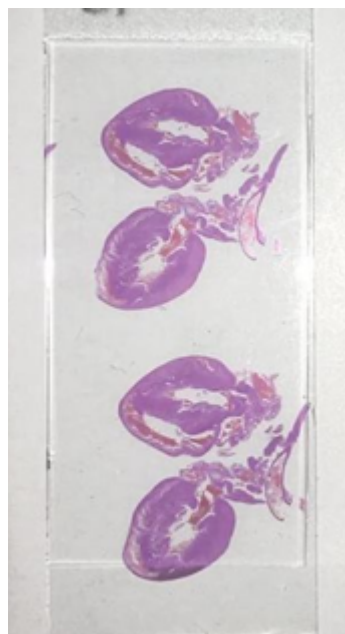


Figura 7
Cortes Histológicos



Figura 8
Observación en microscopio de cortes
histológicos



Figura 9
Caja de laminillas de cortes
histológicos

10.RESULTADOS

La muestra del presente estudio estuvo compuesta por doce ratas Sprague-Dawley, hembras, cuyo peso oscila entre 150 y 250 gramos de peso. Se dividieron de manera aleatoria en cuatro grupos de 3 sujetos cada uno, en los que el cuarto grupo se realizó pulpotomías sin uso de formocresol que sirvió como control. Cada grupo se designó como A, B ó C, representando los períodos de 72 horas, 8 y 15 días respectivamente, en los que se sacrificaron las ratas para obtener las biopsias. Los tejidos obtenidos se procesaron para su estudio histológico, tiñéndose con hematoxilina y eosina. Para el análisis histológico los cortes se observaron con un microscopio a 40 aumentos (40x), se seleccionó la zona en la que la reacción fuese más evidente.

La reacción del tejido se evaluó microscópicamente luego de 72 horas, 8 y 15 días después de la realización de pulpotomías.

Los resultados obtenidos muestran hallazgos de cambios histológicos de los órganos de las ratas tratadas con formocresol en comparación con los órganos de las ratas no tratadas. Se encontraron cambios muy significativos con un alto grado de inflamación.

La figura 10 muestra los cortes histológicos de corazón a las 72 horas observados al microscopio en vistas Panorámica, 10X y 40X en los que se observa tejido muscular normal, presencia de hemorragia, vasos congestionados y extravasación (Leve).

La figura 11 muestra los cortes histológicos de corazón a los 8 días observados al microscopio en vistas Panorámica, 10X y 40X los cuales presentan vasos congestionados, edema y zona de hemorragia que persiste además de presentar disociación (Moderado).

La figura 12 muestra los cortes histológicos de corazón a los 15 días observados al microscopio en vistas Panorámica, 10X y 40X en donde se observa la presencia de sangre entre las fibras, hemorragia, disociación y edema (Severo).

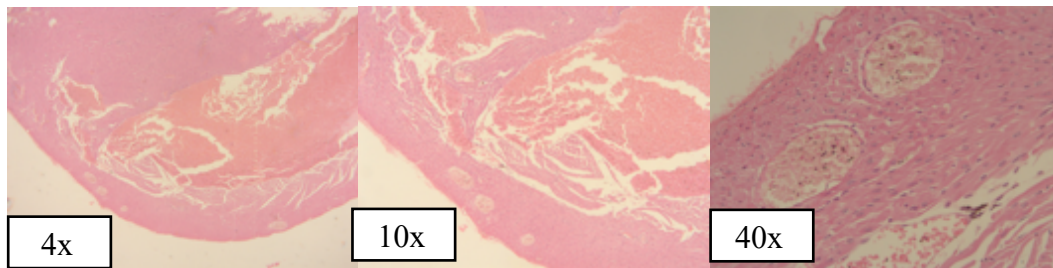


Figura No. 10. Corazón 72 horas. Los cortes histológicos del corazón a las 72 horas muestran tejido muscular normal, se observa presencia de hemorragia, vasos congestionados y extravasación.

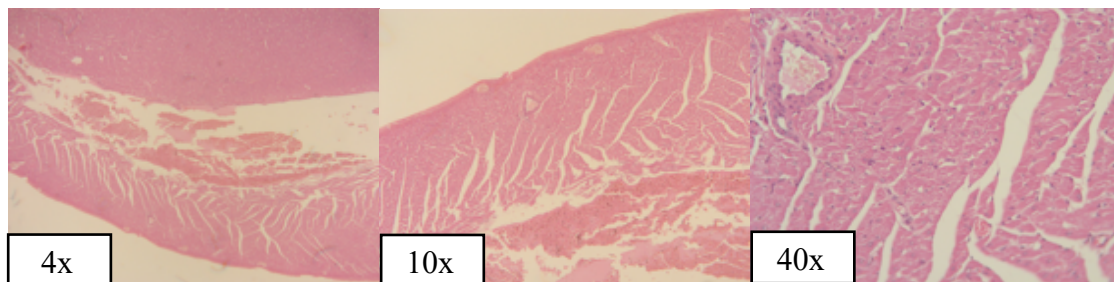


Figura No. 11. Corazón 8 días. Los cortes histológicos del corazón a los 8 días muestran vasos congestionados, presenta edema y escasa zona de hemorragia, pero persistió, no presenta tanta hemorragia ni tanta extravasación, presenta disociación.

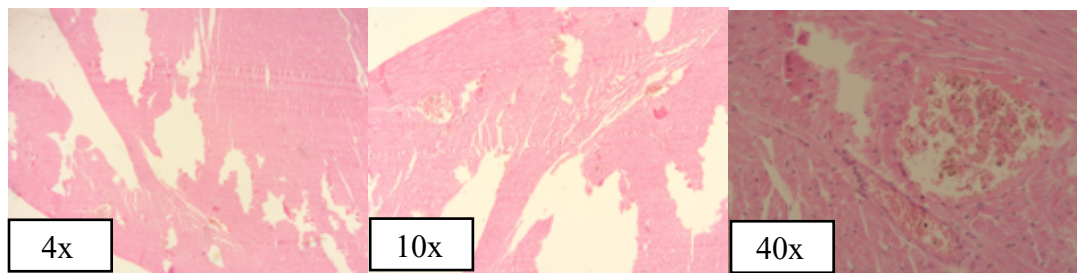


Figura No. 12. Corazón 15 días. Los cortes histológicos del corazón a los 15 días muestran presencia de sangre entre las fibras, escasa hemorragia, disociación y edema.

La figura 13 muestra los cortes histológicos de pulmón a las 72 horas observados al microscopio en vistas 10X y 40X en los que se observa alveolos más amplios, congestión y edema.

La figura 14 muestra los cortes histológicos de pulmón a los 8 días observados al microscopio en vistas 10X y 40X en los que se observa edema y ectasia, se observan los alveolos con roturas.

La figura 15 muestra los cortes histológicos de pulmón a los 15 días observados al microscopio en vistas 10X y 40X en los que se observa presencia de extravasación y congestión vascular.

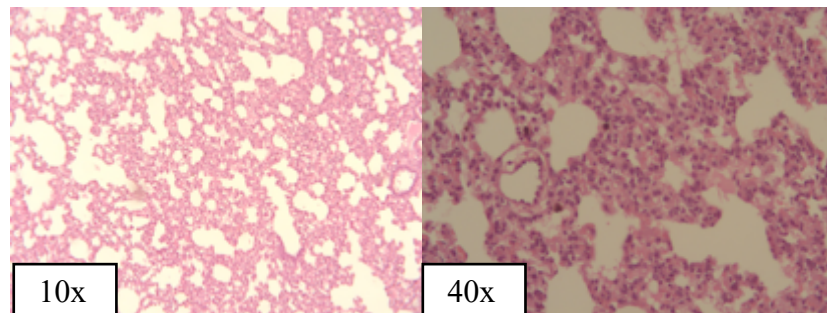


Figura No. 13. Pulmón 72 horas. Los cortes histológicos del pulmón a las 72 horas muestran alveolos mas amplios, congestión y edema.

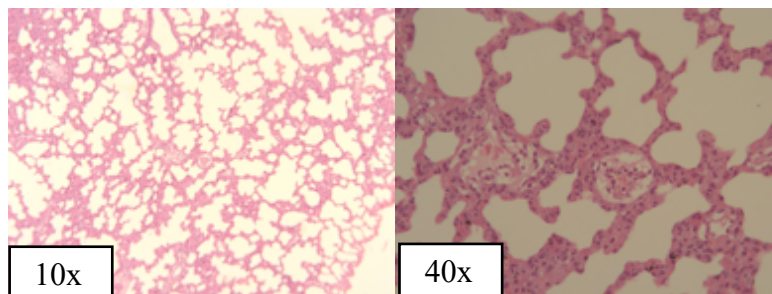


Figura No. 14. Pulmón 8 días. Los cortes histológicos del pulmón a los 8 días muestran edema y ectasia, se observan los alveolos con roturas.

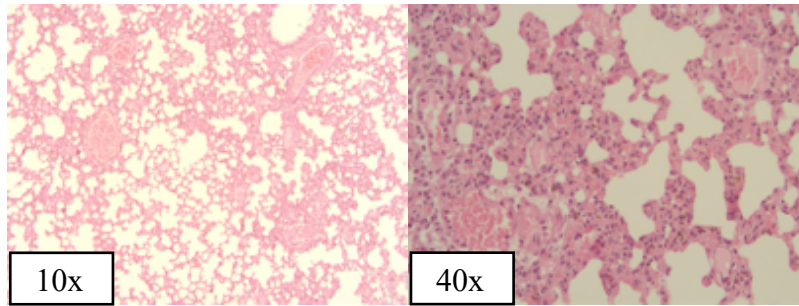


Figura No. 15. Pulmón 15 días. Los cortes histológicos del pulmón a los 15 días muestran presencia de extravasación y congestión vascular

La figuras 15 y 16 muestran los cortes histológicos de corazón y pulmón del grupo control sin tratamiento observados al microscopio en vistas 10X y 40X en los que se observa tejido sano sin hemorragia ni edema.

Grupo control

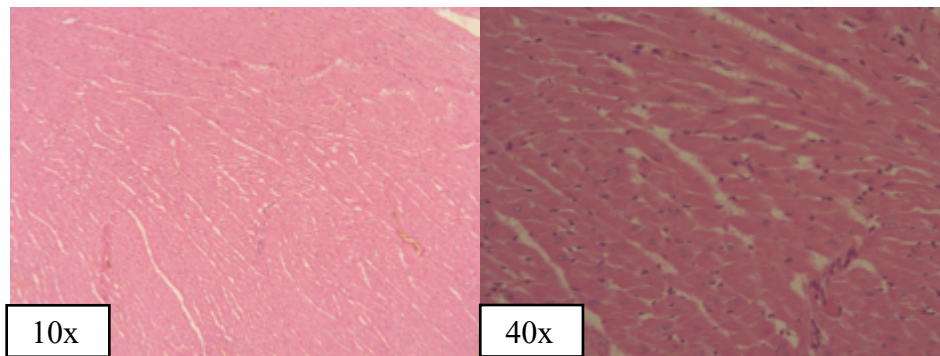


Figura No. 16. Corazón grupo control.

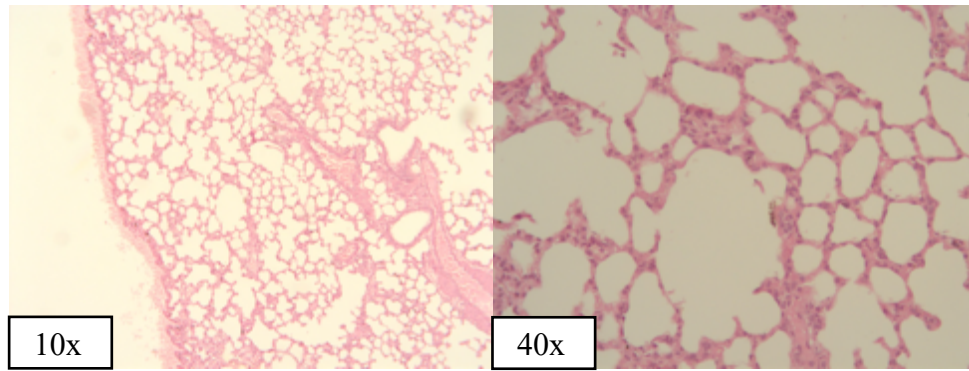


Figura No. 17. Pulmón grupo control.

CRITERIOS DE EVALUACIÓN HISTOLÓGICA (PARA 3, 8 y 15 DÍAS)

Respuesta de células inflamatorias

- - Muy leve: Edema, congestión vascular, ausencia de células inflamatorias en el sitio de reacción.
- - Leve: Edema, congestión vascular, focos hemorrágicos, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, en el sitio de reacción.
- - Moderado: Edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, sobrepasando el sitio de reacción.
- - Severo: Edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, sobrepasando, disociación y necrosis.

La tabla 3 muestra la respuesta histológica de corazón al tratamiento con formocresol.

La primera observación se realizó en 3 ratas (100%) a las 72 horas

1 rata (34%) mostró respuesta muy leve: edema, congestión vascular, ausencia de células inflamatorias en el sitio de reacción.

2 ratas (66%) mostraron respuesta leve: edema, congestión vascular, focos hemorrágicos, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, en el sitio de reacción. Algunas zonas de tejido muscular normal, presencia de hemorragia, vasos congestionados y extravasación.

La segunda observación se realizó en 3 ratas (100%) a los 8 días.

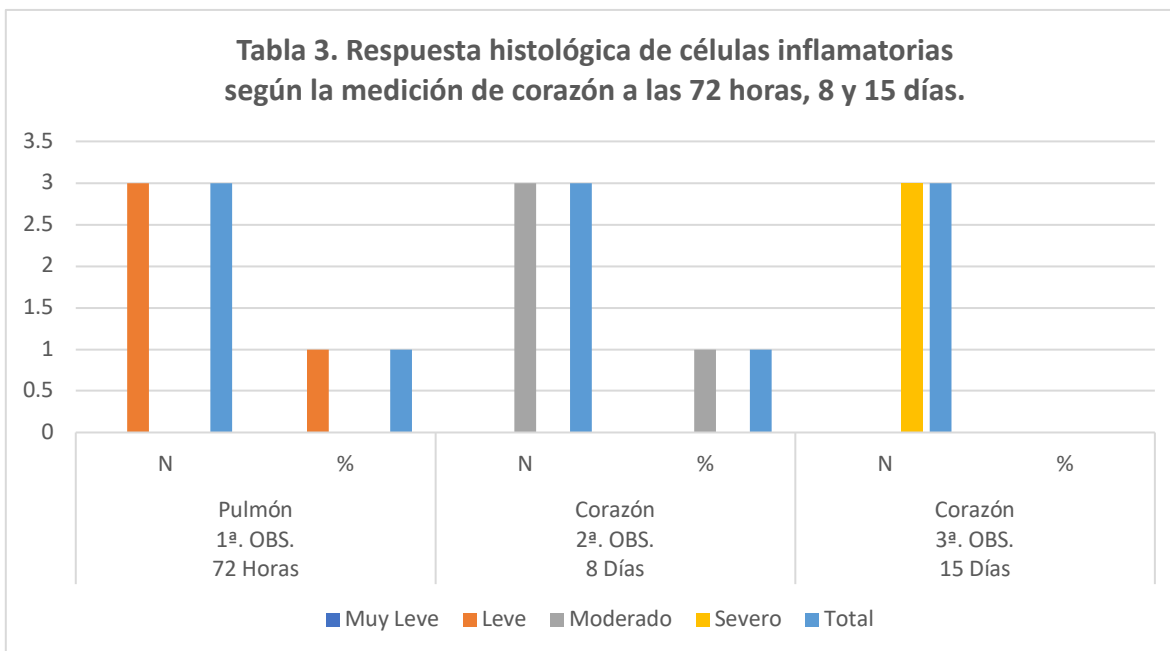
3 ratas (100%) mostraron cambios moderados que incluyen edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares). Zona de hemorragia que persiste, presenta disociación.

La tercera observación se realizó en 3 ratas (100%) a los 15 días.

3 ratas (100%) mostraron cambios severos que incluyen edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico. Presencia de sangre entre las fibras, hemorragia, disociación y edema.

Tabla 3. Respuesta histológica de células inflamatorias según la medición de corazón a las 72 horas, 8 y 15 días.						
Grado de respuesta histológica	Corazón 1ª. Observación 72 Horas		Corazón 2ª. Observación 8 Días		Corazón 3ª. Observación 15 Días	
	N	%	N	%	N	%
Muy leve	1	34%				
Leve	2	66%				
Moderado			3	100%		
Severo					3	100%
Total	3	100%	3	100%	3	100%

Tabla 3. Respuesta histológica de corazón al tratamiento con formocresol



OBS=Observación

La tabla 4 muestra la respuesta histológica de pulmón al tratamiento con formocresol.

La primera observación se realizó en 3 ratas (100%) a las 72 horas.

3 ratas (100%) mostraron respuesta leve: edema, congestión vascular, focos hemorrágicos, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, en el sitio de reacción, muestra también alvéolos más amplios.

La segunda observación se realizó en 3 ratas (100%) a los 8 días.

3 ratas (100%) mostraron cambios moderados que incluyen edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, sobrepasando el sitio de reacción. También se muestra edema y ectasia, se observan los alveolos con roturas.

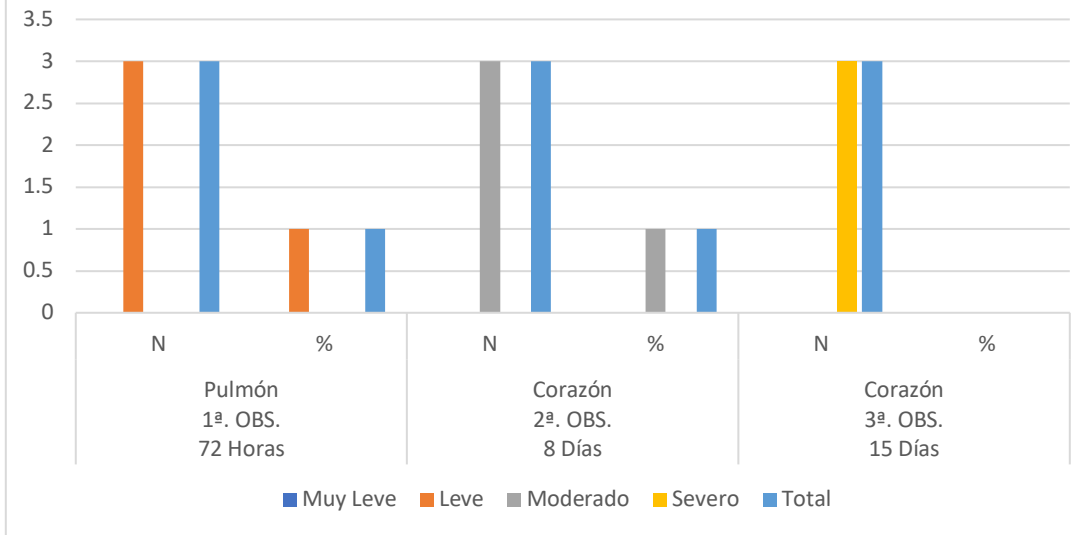
La tercera observación se realizó en 3 ratas (100%) a los 15 días.

3 ratas (100%) mostraron cambios moderados que incluyen edema, congestión vascular, infiltrado agudo (leucocitos polimorfonucleares) o infiltrado crónico, sobrepasando, disociación y algunas zonas con necrosis.

Tabla 4. Respuesta histológica de células inflamatorias según la medición de pulmón a las 72 horas, 8 y 15 días.						
Grado de respuesta histológica	Pulmón 1ª. OBS. 72 Horas		Pulmón 2ª. OBS. 8 Días		Pulmón 3ª. OBS. 15 Días	
	N	%			N	%
Muy leve						
Leve	3	100%				
Moderado			3	100%		
Severo					3	100%
Total	3	100%	3	100%	3	100%

Tabla 4. Respuesta histológica de pulmón al tratamiento con formocresol

Tabla 3. Respuesta histológica de células inflamatorias según la medición de pulmón a las 72 horas, 8 y 15 días.



OBS=Observación

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Por las condiciones de la variable a evaluar del tipo cuantitativa (Caries dental y determinantes sociales), donde además, se trata de una población infinita se estima el tamaño de la muestra con la aplicación de la siguiente fórmula general:

$$n = \frac{z^2 pq^2}{e^2}$$

n= Tamaño de la muestra.

z= Probabilidad de encontrar la variable presente en la muestra.

p= Probabilidad de encontrar la variable presente en la muestra.

q= Probabilidad de no encontrar la variable presente en la muestra.

e= Error de muestreo que está dispuesto a aceptar en el estudio.

Probabilidad de ocurrencia:

z= 1.96 para 95% confiabilidad

p= 0.12

q= 0.88

e= 0.15

$$n = \frac{z^2 pq^2}{e^2}$$

12. DISCUSIÓN

Por años el formocresol ha sido propuesto para el tratamiento de pulpas vitales expuestas por caries en piezas infantiles o en piezas permanentes. Su uso clínico lo han evaluado como una opción mas para los tratamientos pulpares, sabiendo las reacciones tisulares que provoca.

Debido a su aparente éxito clínico, el formocresol es el agente preferido, para la realización de las pulpotomías en dientes temporales. El formocresol fue introducido por Buckley en 1904, en 1923 Sweet abogo por una pulpotomía en 5 citas, la cual subsecuentemente se modificó a un procedimiento de 3 citas. En la actualidad se realiza la pulpotomía en una cita, con resultados igualmente satisfactorios, y es el uso común de hoy en día, pero sus daños tisulares son desconocidos para algunos.

En nuestro estudio realizado, la evaluación histológica del corazón y pulmón después de la pulpotomía realizada con formocresol en ratas Sprague-Dawley a los 72 horas, 8 y 15 días, y muestra diversos resultados, como células inflamatorias en respuesta histológica para el corazón y pulmón causadas por lo irritante que es el líquido como parte del tratamiento de pulpotomía para momificar la pulpa, de la misma manera que Loos, Straffon y Han en 1973 encontraron evidencia de que el formocresol en concentración pura, puede producir un daño irreparable a algunos tejidos conectivos y ciertamente retrasar la recuperación de las actividades biológicas normales de las células afectadas del tejido conectivo.

Hernández et al. (2005) evaluó con la prueba de Ames en ratones, la actividad mutagénica del formocresol, cresol, formaldehído y glutaraldehído; concluyendo que el formocresol induce a una clara mutagenicidad mientras que el formaldehído y el glutaraldehído dieron respuesta mutagénica y genotóxica, y el cresol dio resultado negativo a esta prueba. Coincidimos en la gran alteración celular observada a nivel histológico causada por el formocresol en tratamientos de pulpotomías tanto en periodos de 72 horas, 8 y 15 días de tratamiento.

Dentro de los resultados histológicos se muestra una agresión al corazón y pulmón.

En este estudio se avaluó los cambios histológicos en los órganos corazón y pulmón de 72 horas, 8 y 15 días en ratas Sprague-Dawley realizándole pulpotomías en sus incisivos inferiores. En las reacciones se encontraron edema, congestión vascular, hemorragia, vasos congestionados, extravasación y disociación. Fuks et al, evidenció en un estudio que un 29% de los dientes presentó inflamación severa 4 semanas después de pulpotomías con formocresol; los resultados del estudio a los 30 días fue del 42.9%

Hay gran variedad de materiales dentales que se pudieran utilizar para la realización de pulpotomías, lo cual aún se sigue buscando cual seria el ideal, es importante que en el área de investigación se visualice la posibilidad de proyectos futuros para encontrar un material dental sin provocar alteraciones en el uso de tratamientos pulpares.

Este estudio demuestra que los materiales colocados en el tejido pulpar vital pueden ser absorbidos dentro de la circulación sistémica. Esto debe considerarse cuando se seleccionan agentes para terapias de pulpas vivas.

13. CONCLUSIONES

Después de realizar las observaciones se concluye lo siguiente:

El formocresol desarrolla alteraciones en los órganos de corazón y pulmón que fueron observados a las 72 horas, 8 y 15 días del tratamiento pulpar.

Los agentes alternativos para pulpotomías deben ser igual o más efectivos que el formocresol y con un mayor margen de seguridad.

En los grupos se encontraron zonas con edema, congestión vascular, hemorragia, vasos congestionados, extravasación y disociación. De acuerdo con los criterios, se evidenció histológicamente que el formocresol si causa daño histológico en corazón y pulmón en comparación con el grupo control.

Todos los resultados encontrados fueron evidencias histológicas.

14. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Aguilar F, Duarte C, Eduviges M, Serrano R, Pinzón A. Prevalencia de caries de la infancia temprana y factores de riesgo asociados. *Acta Pediatr Mex.* 2014;35:259-266.
- 2 Molina F, Dúran D, Castañeda E, Juárez L. La caries y su relación con la higiene oral en preescolares mexicanos. *Gac Med Mex.* 2015;151:485-490.
- 3 Ramón R, Castañeda Ma, Hortensia M, Estrada G, Quinzán A. Factores de riesgo de caries dental en escolares de 5 a 11 años. *Medisan.* 2016;20(5):604.
- 4 Del Carmen E, Rocha M, Martínez A. Éxito y fracaso de tratamiento de pulpotomía en órganos dentarios permanentes. *Revista ADM.* 2013;70(5): 246-250.
- 5 Yousef H. Pulpotomy Medicaments used in Deciduous Dentition: An Update. *The Journal of Contemporary Dental Practice.* 2015;16(6):486-503.
- 6 Pérez A. ¿Es la caries dental una enfermedad infecciosa y transmisible?. *Rev Estomatol Herediana.* 2009;19(2):118-124.
- 7 Ramón R, Castañeda Ma, Hortensia M, Estrada G, Quinzán A. Factores de riesgo de caries dental en escolares de 5 a 11 años. *Medisan.* 2016;20(5):604
- 8 Fuks AB, Papagiannoulis L. 2006. Pulpotomy in primary teeth: review of the literature according to standardized criteria. *Eur. Arch. Paediatr. Dent.* 7:64-71
- 9 Bowen WH. Dental caries- not just holes in teeth! A perspective. *Mol Oral Microbiol.* 2016;31(3):228-233.
- 10 Paul SP, Chopra J, Dey I. Dental Caries: A Disease Which Needs Attention. *Indian J Pediatr.* 2018 Apr;85(4):327-328.

- 11 Conrads G, About I. Pathophysiology of Dental Caries. *Monogr Oral Sci.* 2018;27:1-10.
- 12 Gao X, Jiang S, Koh D, Hsu CS. Salivary Biomarkers for dental caries. *Periodontol 2000.* 2016;70(1):128-41.
- 13 Huil T, Wang C, Chen D, Zheng L, Huang D, Ye L. Epigenetic regulation in dental pulp inflammation. *Oral Dis.* 2017; 23(1): 22–28.
- 14 Oliveira J, Bravo P, Mendoza A. Algunas técnicas alternativas al formocresol en las pulpotomías de dientes temporales. *Pol.Con.* 2017;12(2):3-13.
- 15 Morotomi T, Washio A, Kitamura C. Current and future options for dental pulp therapy. *Jpn Dent Sci Rev.* 2019 Nov;55(1):5-11.
16. Lecszy N. Tratamientos pulpares en dientes temporales. In *Conceptos Básicos Odontología Pediátrica.*: Disinlimed C.A.; 1996. 319-58.
17. Liewehr D. Estructura y funciones del complejo dentinopulpar. Stephen Cohen KM. *Vías de la pulpa.* 9th ed. Madrid: Elsevier; 2007. 469-522.
18. Gómez de Ferraris M. Complejo Dentino- Pulpar I: Pulpa Dental. *Histología y Embriología Bucodental.* Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana; 2001. 175-93.
- 19 Bjørndal L, Simon S, Tomson PL, Duncan HF. Management of deep caries and the exposed pulp. *Int Endod J.* 2019 Jul;52(7):949-973.
- 20 Morales R, Trujillo E, Cantín M. Caracterización Estereológica de Odontoblastos en Pulpas Dentarias Humanas Sanas y con Pulpitis Reversible. *J.Morphol.* 2014;32(1):154-160.

21 Cardoso M, Aguirre M, Quintero G, Nora C. Toxicidad *in vitro* del formocresol y sulfato férrico sobre macrófagos murinos. *Odontol Pediatr.* 2009;17(3):153-162.

22 Smaïl-Faugeron V, Glenny AM, Courson F, Durieux P, Muller-Bolla M, Fron Chabouis H. Pulp treatment for extensive decay in primary teeth. *Cochrane Database Syst Rev.* 2018 May 31;5(5):CD003220.

23 Gadallah L, Hamdy M, El Bardissy A, Abou El Yazeed M. Pulpotomy versus pulpectomy in the treatment of vital pulp exposure in primary incisors. A systematic review and meta-analysis. *F1000Res.* 2018 Sep 26;7:1560.

24 Cushley S, Duncan HF, Lappin MJ, Tomson PL, Lundy FT, Cooper P, Clarke M, El Karim IA. Pulpotomy for mature carious teeth with symptoms of irreversible pulpitis: A systematic review. *J Dent.* 2019 Sep;88:103158.

25 Barbería-Leache E. 2001. *Odontopediatría. Odontopediatría, 2ªed.* Barcelona: Masson.

26 Chen Y, Chen X, Zhang Y, Zhou F, Deng J, Zou J, Wang Y. Materials for pulpotomy in immature permanent teeth: a systematic review and meta-analysis. *BMC Oral Health.* 2019 Oct 23;19(1):227.

27 Jordon M. 1934. *Tratamiento odontológico de la infancia.* Barcelona: Ed. Labor.

28 Nunn JH. 1996. The development of formocresol as a medicament for primary molar pulpotomy procedures. *J Dent Child,* 63(1):51-3.

29 Sweet C. 1937. Treatment for deciduous teeth with exposed pulps. *Mich St Dent J,* 19:13.

30 Waterhouse PJ. 2000. Primary molar pulp therapy. *Int J Paediatr Dent* histological evaluation of failure. , 10(4):313-21.

31 Li Y, Sui B, Dahl C, Bergeron B, Shipman P, Niu L, Chen J, Tay FR. Pulpotomy for carious pulp exposures in permanent teeth: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2019 May;84:1-8.

32 Alqaderi H, Lee CT, Borzangy S, Pagonis TC. Coronal pulpotomy for cariously exposed permanent posterior teeth with closed apices: A systematic review and meta-analysis. *J Dent.* 2016 Jan;44:1-7.

33. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and young permanent teeth. *Clinical guidelines.* 2009; 30(7).

34 Chakraborty A, Dey B, Jana S. A Nonconventional Approach to Formocresol Pulpotomy. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2018 Nov-Dec;11(6):490-495.

35 Trujillo Z, Camacho V, Antezana F. Medicamento alternativo al uso de formocresol en tratamiento de pulpotomía en niños de 3 a 9 años que acudieron al bus y a la clínica odontológica univalle durante la gestión 2012. *Revista de Salud.*2015;25(10):4-10.

36 Chandrashekhar S, Shashidhar J. Formocresol, still a controversial material for pulpotomy: A critical literature review. *Journal of Restorative Dentistry.* 2014;2(3):114-124.

37. Patchett CL, Srinivasan V, Waterhouse PJ. Is there life after Buckley's formocresol? Part II – Development of a protocol for the management of extensive caries in the primary molar. *Int J Paediatr Dent* 2006; 16(3):199-206

38. Cortes O, Boj J, Canalda C. Estado actual de los distintos fármacos utilizados en pulpotomías en dentición primaria. *Rev Endodoncia* 1995; 13(4):178-85

39 Morales M, Cabañas C, Ramos L. Uso de formocresol diluido en dientes temporales. *Rev Cubana Estomatol.* 1998;35(1):5-10.

- 40 Durán CBE. 2008. Eficacia clínica del formocresol en pulpotomías de dientes primarios. *Revista ADM LXV(3):117-120*
- 41 Athanassiadis B, George G, Abbott P, Wash L. A review of the effects of formaldehyde release from endodontic materials. *International Endodontic Journal*. 2015;48: 829–838.
- 42 Gaioso A, Rosenblatt A, Da Silva M, Da Silva C, Santos N. Genotoxic effect of formocresol pulp therapy of deciduous teeth. *Elsevier*. 2012;747:93-97.
- 43 Jiménez J, Betancourt D, Carranza P, Viveros E, Guzmán E, López F, Morán J. Formaldehyde Induces DNA Strand Breaks on Spermatozoa and Lymphocytes of Wistar Rats. *Cytology and Genetics*. 2017;51(1):65–73.
- 44 Cohen S, Burns R. 2004 *Vías de la pulpa. Endodoncia pediátrica: tratamiento endodóntico en dentición temporal y permanente joven*. Madrid, España.
- 45 Lewis R. 1998. Formaldehyde in dentistry: a review for the millennium. *J Clin Pediatr Dent*, 22(2):167-77.
- 46 Boj JR, Catalá M, García Ballesta C, Mendoza A. 2007. *Odontopediatría*. 1ª Ed. España: Masson.
- 47 Bossù M, Iaculli F, Di Giorgio G, Salucci A, Polimeni A, Di Carlo S. Different Pulp Dressing Materials for the Pulpotomy of Primary Teeth: A Systematic Review of the Literature. *J Clin Med*. 2020 Mar 19;9(3):838.
- 48 Fuks A. Assessment of a 2% buffered glutaraldehyde solution in pulpomized primary teeth of school children. *Journal Pedon*. 10: 323-30 1986.
- 49 Stein, S. Collagen sponge as a topical hemostatic agent in mucogingival surgery. *Journal Perio*. Jan 1985; 35.

50 Landau Mj and Johnsen Dc. Pulpar responses to ferric sulfate in monkeys. *Pediatric Dentistry* 10:115-120 June 1980.

51 Amazon K. Ferrugination caused by monsel's solution. Clinical observation and experimentation. *Am. Dermopathology* 2: 197-205. 1980.

52 Fei Ay - Luen., Udin Richard D, Jonhson Ronald. A clinical study of sulfato férrico as a pulpotomy agent in primary teeth. *Pediatric Dentistry*. 13: 327-32. 1991.

53 Olatosi O, Sote EO, Orenuga OO. Effect of mineral trioxide aggregate and formocresol pulpotomy on vital primary teeth: A clinical and radiographic study. *Nigerian Journal of Clinical Practice*. 2015;18(2):292-296.

54 Al-Haj S, Al-Jundi S, Ditto D. In vitro toxicity of formocresol, ferric sulphate, and grey MTA on human periodontal ligament fibroblasts. *Eur Arch Paediatr Dent*. 2015;16:51-55.

55 Taha NA, Khazali MA. Partial Pulpotomy in Mature Permanent Teeth with Clinical Signs Indicative of Irreversible Pulpitis: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2017 Sep;43(9):1417-1421.

56 Stringhini Junior E, Dos Santos MGC, Oliveira LB, Mercadé M. MTA and biodentine for primary teeth pulpotomy: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Clin Oral Investig*. 2019 Apr;23(4):1967-1976.

57 Musale PK, Kothare SS, Soni AS. Mineral trioxide aggregate pulpotomy: patient selection and perspectives. *Clin Cosmet Investig Dent*. 2018 Feb 28;10:37-43.

58 Yousef H. Pulpotomy Medicaments used in Deciduous Dentition: An Update. *The Journal of Contemporary Dental Practice*. 2015;16(6):486-503.

59 Taha NA, Abdulkhader SZ. Full Pulpotomy with Biodentine in Symptomatic Young Permanent Teeth with Carious Exposure. *J Endod*. 2018 Jun;44(6):932-937.

60 Taha NA, Abdelkhader SZ. Outcome of full pulpotomy using Biodentine in adult patients with symptoms indicative of irreversible pulpitis. *Int Endod J.* 2018 Aug;51(8):819-828.

61 Combrisson H. Expérimentation animale, peut-on s'en passer ? [Animal experiment, can we replace?]. *Transfus Clin Biol.* 2017 Sep;24(3):93-95.

62 Andersen ML, Winter LMF. Animal models in biological and biomedical research - experimental and ethical concerns. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91

63 Lewis DI. Animal experimentation: implementation and application of the 3Rs. *Emerg Top Life Sci.* 2019 Nov 27;3(6):675-679.

64 Fernandez R. Wilber et al.El 1, 2, 3 de la experimentación con animales de laboratorio.*Rev. perú. med. exp. salud publica.* 2016, vol.33, n.2, pp.288-299.

65 Turner PV, Barbee RW. Responsible Science and Research Animal Use. *ILAR J.* 2019 Dec 31;60(1):1-4.

66 Blake, J. (2001). Moral and ethical considerations for the use of animals. (en línea).

67 Canete R. Animales utilizados en experimentación, necesidad de su protección. *Rev.Med.Electrón.* 2016, vol.38, n.4, pp.612-616.

68 Bailey, M (s.f). Ethics and animal use in research. (en línea). Canadá.

69 Rodríguez E. Ética de la investigación en modelos animales de enfermedades humanas. *Acta bioeth.* 2007; 13(1): 25-40.

70 Suckow MA, Turner PV. Pain as a Clinical Factor and Experimental Variable in Research Rodents. *Comp Med*. 2019 Dec 1;69(6):441-442.

71 OPS (Organización Panamericana de la Salud). (1974). Manual para técnicos en animales de laboratorio. Buenos Aires, Argentina: Oficina Sanitaria Panamericana. pp.101-110,166-175,215-235.

72 Tsuda MC, Mahdi S, Namchuk A, Wu TJ, Lucki I. Vendor differences in anxiety-like behaviors in female and male Sprague Dawley rats. *Physiol Behav*. 2020 Dec 1;227:113131.

73 Di Mazzanti M. Declaración de Helsinki, principios y valores bioéticos en juego en la investigación médica con seres humanos. *Rev Col Bioética*. 2015; 6:125-45.

74. Leeson, T.; Leeson, R. y Paparo, A. (1990). Texto atlas de Histología. Trad. Carlos Hernández Zamora. México: McGraw-Hill Interamericana. Pp. 1-19,127-158.

75. Manual of histologic and special staining technique. (1960). 2 ed. USA: McGraw-Hill Book Company. Pp 1-32.