

O. Cortés Lillo<sup>1</sup>  
J.R. Boj Quesada<sup>2</sup>  
C. Canalda Sahli<sup>3</sup>  
C. García Ballesta<sup>4</sup>

## Metodología para estudios histológicos pulpares en ratas

- 1 Prof. Asociada. Universidad de Murcia.  
2 Prof. Titular. Universidad de Barcelona.  
3 Catedrático. Universidad de Barcelona.  
4 Prof. Titular. Universidad de Murcia

**Correspondencia:**

Prof. J.R. Boj Quesada.  
Facultad de Odontología.  
Universidad de Barcelona.  
C/ Feixa Llarga s/n.  
08907 L'Hospitalet (Barcelona)

### RESUMEN

La pulpotomía es uno de los tratamientos más frecuentes en odontopediatría, siendo hasta ahora el formocresol el fármaco más frecuentemente utilizado, pero su uso está siendo discutido debido a su potencial toxicidad. Existen distintas alternativas; agentes como el glutaraldehído y el sulfato férrico, materiales biocompatibles como el colágeno, hueso liofilizado y proteínas morfogenéticas formadoras de hueso, o técnicas como la electrocoagulación o la aplicación de láser. Por ello, son fundamentales, no sólo los estudios clínicos y radiológicos, sino también los estudios histológicos que nos muestran la respuesta del tejido pulpar ante la aplicación de los distintos materiales o técnicas. Estos estudios se realizan con diferentes especies animales y a su vez con distinta metodología.

El objetivo de este trabajo ha sido describir una técnica para realizar estudios pulpares en molares de rata y estudiar la respuesta histológica que se observa en una exposición pulpar con la aplicación posterior de un agente como el hueso liofilizado. Nuestros resultados destacan que la técnica desarrollada para las exposiciones pulpares en ratas

es adecuada y reproducible en otros estudios sobre el efecto de los distintos fármacos en el tejido pulpar.

### PALABRAS CLAVE

Biocompatibilidad; Pulpotomía; Medicaciones pulpares.

### ABSTRACT

*The pulpotomy is one of the most frequent treatments in the primary dentition. Formocresol is still the pulp dressing most frequently utilized in clinical practice but formocresol use is being discussed because of the potential toxic effects. There are different alternatives; some of them are: glutaraldehyde, ferric sulfate, collagen, freeze dried bone, bone morphogenetic proteins, electrosurgical pulpotomy and laser therapy. So, there are not only clinical and radiographic studies but also histological evaluation of the pulp healing process after pulpotomies. These studies use different species and besides a structured methodology.*

**32** *The aim of this study was to describe a method to perform pulpal exposures in molar rats, and assess the pulpal response after applying freeze dried bone. Our results show that this method is suitable for pulpal exposures in molar rats and describes a technique that can be used in other studies.*

#### **KEY WORDS**

*Biocompatibility; Pulpotomy; Pulpal medicaments.*

#### **INTRODUCCIÓN**

La pulpotomía es uno de los tratamientos más frecuentes en odontopediatría, siendo hasta ahora el formocresol el fármaco más frecuentemente utilizado, pero su utilización está siendo discutida debido a su potencial toxicidad<sup>(1-5)</sup>. Existen distintas alternativas; agentes como el glutaraldehído<sup>(6, 7)</sup> y el sulfato férrico<sup>(8, 9)</sup>, materiales biocompatibles como el colágeno<sup>(10, 11)</sup>, hueso liofilizado<sup>(12, 13)</sup> y proteínas morfogenéticas formadoras de hueso<sup>(14, 15)</sup>, o técnicas como la electrocoagulación<sup>(16)</sup> o la aplicación de láser<sup>(17)</sup>. El uso de estos materiales persigue que se permita mantener la vitalidad y función del tejido pulpar remanente así como favorecer su reparación.

Por ello, son fundamentales, no sólo los estudios clínicos y radiológicos, sino también los estudios histológicos que nos muestran la respuesta del tejido pulpar ante la aplicación de los distintos materiales o técnicas, así como los estudios experimentales para conocer sus efectos tóxicos y su farmacocinética (absorción, distribución, metabolización y eliminación).

Estos estudios se realizan con diferentes especies animales y, a su vez, con distinta metodología. A partir de ellos es posible prever la respuesta clínica en la especie humana; aunque con la consideración ampliamente aceptada que las conclusiones obtenidas a partir de estos estudios no pueden ser extrapoladas en su totalidad a las condiciones humanas, puesto que existen diferencias anatómicas y fisiológicas y también metodológicas entre las especies que modifican el

resultado obtenido. No obstante, a pesar de ello, no es posible éticamente iniciar una investigación directamente en la especie humana, por lo que los datos experimentales nos aportan una serie de criterios antes de iniciar las fases clínicas<sup>(18)</sup>.

#### **MODELOS EXPERIMENTALES**

Los modelos animales son útiles en la investigación dental porque se pueden controlar mejor las distintas variables. La selección de la especie apropiada para una investigación es fundamental para establecer un diseño experimental adecuado. Como en otras ramas de la investigación médica hay algunas especies que se utilizan frecuentemente en la investigación dental. Entre ellas se incluyen: monos, cerdos, perros, ratas y hamsters<sup>(19)</sup>.

Se han utilizado diferentes primates en la investigación dental<sup>(6,7,10-12,20)</sup>. Tienen dos pares de dentición, una temporal y otra permanente, y esta última es morfológicamente similar a la de los humanos, excepto en los largos caninos<sup>(21)</sup>. Esta característica permite desarrollar un método muy similar al de los dientes humanos tanto por su acceso y tamaño dental, que permite la utilización de aislamiento con dique, y la no modificación del instrumental y los materiales de que disponemos. También anatómicamente sus dientes y estructuras adyacentes son muy parecidas, aunque bien es cierto que en ocasiones las reacciones que se observan son más severas y extremas que en nuestra especie<sup>(22)</sup>.

Así, dentro de las pulpotomías son varios los estudios realizados con monos para la valoración de la respuesta pulpar con determinados agentes o la aplicación de distintas técnicas. Principalmente han sido utilizados para estudios con materiales biocompatibles como el colágeno<sup>(10, 11)</sup>, hueso liofilizado<sup>(12, 13)</sup> y las proteínas morfogenéticas<sup>(14)</sup>, así como también para técnicas con electrocoagulación<sup>(16)</sup>. En ellos el tiempo máximo de evolución que se establece oscila entre las 6 y las 36 semanas, siendo mayor que en otras especies.

Los perros también han sido utilizados en estudios pulpares, aunque para determinados tratamientos, como las pulpectomías, con menor frecuencia debido a su anatomía dental apical o lámina cribosa que presenta múltiples terminaciones<sup>(23-28)</sup>.

Se ha pensado en el cerdo como animal útil para estudios en ortodoncia, periodoncia, patología y terapéutica pulpar, aunque aún no ha sido ampliamente adoptado como modelo experimental<sup>(29)</sup>. Langeland y cols.<sup>(22)</sup> llevaron a cabo un estudio metodológico comparativo entre dientes humanos, dientes de mono y dientes de cerdo, y observaron que las reacciones pulpares en los dientes de mono y los dientes de cerdo eran más violentas y marcadas, y además con mayores porcentajes de aposición y reabsorción en los dientes de cerdo.

Con menor frecuencia los dientes de cabra también se han empleado en estos estudios sobre patología pulpar. Eronat y cols.<sup>(30)</sup> realizaron exposiciones pulpares en incisivos de cabra con aplicaciones de distintos fármacos y observaron su respuesta, siendo el periodo máximo establecido de 28 días.

En el campo de los tratamientos pulpares y más concretamente de las pulpotomías, las ratas han sido ampliamente utilizadas<sup>(3-5,31-35)</sup>. Son animales adecuados porque son fácilmente disponibles en gran número, manejables y comparativamente económicas. Además, en los estudios llevados a cabo por Ranly<sup>(31)</sup> y Myers<sup>(36)</sup> sobre la distribución sistémica del glutaraldehído, se obtuvieron resultados equiparables a los resultados en perros.

Su respuesta histológica es inicialmente severa y continua, con inflamación crónica que persiste. Por otro lado, el tiempo que hemos de esperar para observar el resultado del tratamiento es más corto que en otras especies, así a los 21 días ya es posible valorar un proceso inicialmente reparativo (formación de un puente dentinario) o, por lo contrario, una inflamación severa<sup>(32)</sup>.

Pero en cuanto a técnica y método presenta algunas limitaciones dado el difícil acceso a la cavidad oral, el tamaño pequeño de sus molares y la necesidad de un instrumental y material apropiado para trabajar.

Berman y Massler<sup>(32)</sup> en 1958 publicaron un trabajo sobre las pulpotomías en los primeros molares maxilares de rata.

El objetivo de este trabajo es describir una técnica para realizar estudios pulpares en molares de rata y analizar los cambios pulpares que se producen tras una exposición pulpar con la aplicación posterior de alguno de los productos que se utilizan para los tratamientos pulpares. En este caso en concreto se trabajó con una muestra pequeña y con hueso liofilizado, para valorar la posibilidad de realizar posteriormente una investigación más detallada.

## TÉCNICA EN RATAS

### Procedimiento operatorio

La muestra del trabajo consistió en 4 ratas Sprague-Dawley, macho, de peso aproximado 150-250 gr, en las que se trabajó en el primer molar maxilar superior derecho e izquierdo, debido a que los molares mandibulares quedan en la profundidad del suelo de la boca y su acceso es prácticamente imposible.

Los animales fueron anestesiados por vía intramuscular con Ketamina (Ketolar®) a dosis de 75 mgr/kg y se colocaron en una tabla operatoria. La lengua y la mucosa yugal se separaron del campo operatorio. Las fresas que se utilizaron fueron piriformes de tungsteno de pequeño tamaño (H7-008). Se utilizaron lentes binoculares para una mejor visualización del campo operatorio. El acceso a la cámara pulpar se hizo desde la superficie oclusal (Fig. 1). Se talló una pequeña cavidad próxima a la cámara pulpar para posteriormente realizar la apertura cameral. La irrigación durante todo el procedimiento se hizo con una pequeña jeringa con agua destilada. Se intentó mantener el mismo tamaño en todas las exposiciones y no profundizar en exceso para evitar la perforación del suelo de la cámara pulpar.

Si había un exceso de sangrado se controló con puntas de papel. Algunas exposiciones no sangraron o lo hicieron muy débilmente. Después de realizar la



**Figura 1.** Acceso a la cámara pulpar desde la superficie oclusal del primer molar maxilar.



**Figura 2.** Colocación de la restauración de amalgama.

exposición pulpar se eliminó la pulpa cameral con la fresa y, si quedaba algún resto de tejido pulpar, se eliminaba con una lima de diámetro 50<sup>(22)</sup>.

En cuanto a la aplicación del agente en este caso, al tratarse de un material biocompatible, se preparó una mezcla de hueso liofilizado con suero fisiológico, obteniéndose una pasta que se aplicó sobre la exposición pulpar con ayuda de una espátula-atacador.

Finalmente se aplicó la base sin presionar excesivamente: óxido de zinc-eugenol (proporción polvo/líquido 2:1). Sobre cada una de ellas se colocó amalgama para evitar las filtraciones y la pérdida de la base (Fig. 2).

Los animales permanecieron durante el tiempo del estudio a una temperatura de 20-25°C y con ciclos de luz/oscuridad de 12 horas diarias. A los 45 días las ratas se sacrificaron.

### Técnica histológica

Una vez sacrificadas se realizó la disección de la hemimaxila y se fijó en una solución de formol al 10%. La fijación tiene el objetivo de preservar las estructuras tisulares y celulares de tal forma que muestren el mayor parecido posible a su estado *in vivo*. La fijación con formol no causa una pérdida en el volumen de los tejidos blandos pero en la deshidratación posterior

con alcohol, y al embeberlo en parafina, pueden aparecer contracciones en los tejidos.

Las muestras de las secciones de hemimaxila fueron descalcificadas en una solución de ácido fórmico y ácido clorhídrico (1000 ml agua destilada, 202 ml ácido clorhídrico, 253 ml ácido fórmico, 1.356 ml agua destilada). La descalcificación es un apartado que complica la técnica histológica en los tejidos duros (calcificados). Se realiza con soluciones ácidas que resultan agresivas al tejido y, por tanto, se requiere el tiempo preciso sin excederse. Una vez descalcificadas, las muestras se lavaron con agua abundante y se incluyeron en parafina. El proceso de inclusión en parafina conlleva la sustitución del agua de los tejidos por parafina. Para ello la muestra pasa por una serie de soluciones alcohólicas crecientes, sustituyendo el agua de los tejidos por alcohol y éste por xilol para finalmente reemplazarlo por parafina templada. Ésta se deja enfriar en un molde sobre el que se coloca un cassette y se obtiene un bloque con la muestra.

A continuación se realizaron los cortes con un microtomo con un grosor de 6-8 micras (Fig. 3). Éstos se depositaron en un portaobjetos y se dejaron secar. Una vez eliminada la parafina de los cortes con xilol y una serie de soluciones alcohólicas decrecientes, se realizó la tinción con hematoxilina y eosina. Ésta es la técnica utilizada con más frecuencia en la histología



**Figura 3.** Muestras en bloque de parafina para la sección de los cortes con el microtomo.



**Figura 4.** Microfotografía de la pulpa radicular 45 días después del tratamiento con bueso liofilizado. Pérdida parcial de la restauración. Calcificaciones distróficas. (H&E, 20X).

animal y patológica de rutina. El colorante básico, hematoxilina, tiñe las estructuras ácidas de azul púrpura; por ejemplo los núcleos, debido a su gran contenido de ADN. Por el contrario, la eosina es un colorante ácido que tiñe las estructuras básicas de color rojo o rosa. La mayoría de las proteínas citoplasmáticas son básicas y por lo tanto el citoplasma se suele teñir de rosa o rosado.

### Evaluación histológica

Los cortes de las muestras fueron evaluados en el microscopio óptico para determinar la respuesta pulpar. En cada muestra se analizó el tercio superior, el tercio medio y el tercio inferior de la pulpa radicular. La evaluación histológica la realizó un anatomopatólogo que, en todos los casos, fue el único observador, sin ninguna referencia sobre el agente pulpar utilizado previamente. Para su evaluación se tuvieron en cuenta los criterios de Horsted y cols.<sup>(37)</sup> modificados posteriormente por Fuks y cols.<sup>(38)</sup>. Los criterios fueron los siguientes;

1. Grado de inflamación:
  - a. Ninguna, pulpa vital, ausencia de inflamación.
  - b. Ligera, pocas células inflamatorias.
  - c. Moderada, inflamación evidente pero limitada al tercio coronal de la pulpa radicular.

- d. Severa, inflamación y trastornos circulatorios que afectan la totalidad de la pulpa, también se incluyen los dientes con necrosis parcial.
2. Estado de vitalidad pulpar:
  - a. Vitalidad.
  - b. Necrosis total.
3. Presencia de puente dentinario.
4. Presencia de dentina reparativa a lo largo del conducto.
5. Presencia y regularidad de la capa odontoblástica.
6. Presencia de fibrosis en la pulpa.

### RESULTADOS

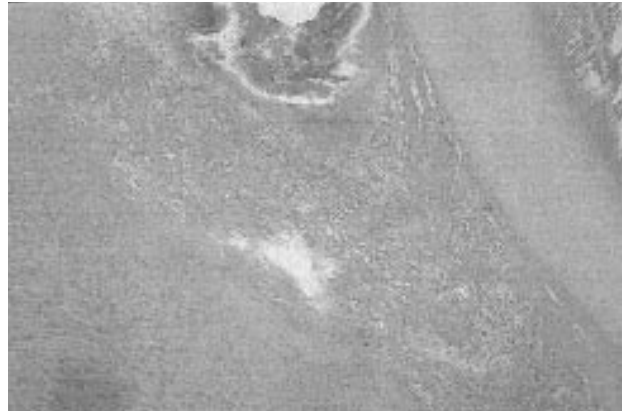
En la exploración clínica de las muestras se observaron 2 dientes con pérdida parcial de la obturación de amalgama y uno de ellos con reabsorción ósea. La valoración histológica de estas muestras mostraba en el lugar de la exposición una amplia zona de necrosis y por debajo un tejido con poca estructura celular, así como calcificaciones distróficas y ausencia de regularidad en la capa odontoblástica. En estos dos dientes no se apreció la formación de un puente dentinario (Fig. 4).

El resto de los cortes histológicos, de manera general aunque con pequeñas variaciones, presentaban por





**Figura 5.** Microfotografía de la pulpa radicular 45 días después del tratamiento con hueso liofilizado. Reacción inflamatoria y dentina reparativa en las paredes. (H&E, 4 X).



**Figura 6.** Microfotografía de la pulpa radicular 45 días después del tratamiento con hueso liofilizado. Formación de puente dentinario. (H&E, 20X).

debajo del lugar de la exposición pulpar un tejido con inicio de calcificación y, en el tercio medio, una importante proliferación de fibroblastos con un entramado de fibras de colágeno, y una reacción inflamatoria moderada que disminuía hacia el tercio apical (Fig. 5).

En algunas de las muestras se observaba una formación de dentina reparativa a lo largo del canal y la mayoría presentaba irregularidad de la capa odontoblástica con ausencia completa en algunos tramos del conducto (Fig. 6).

## DISCUSIÓN

En este estudio, las ratas han sido el modelo animal utilizado para llevar a cabo el tratamiento pulpar con la aplicación de hueso liofilizado y evaluar su histología. Tienen ventajas puesto que se pueden disponer en gran número y son manejables; además, el tiempo que hemos de esperar para observar el resultado es más corto que en otras especies<sup>(39)</sup>.

Como con el resto de animales utilizados en la experimentación existen unas limitaciones que debemos considerar. El medio bucal, el contenido bacteriano de la placa, las características y comportamiento biológico pulpar, no son iguales en los humanos. Por tanto los datos obtenidos no siempre pueden

extrapolarse al hombre como conclusiones firmes. Además en nuestro estudio hay que añadir otras consideraciones. Las muestras eran dientes de rata sin patología previa diagnosticada que indicase la pulpotomía como tratamiento de elección, es decir, no existía en estos dientes inflamación previa. Por otra parte, en este caso, es más correcto hablar de exposición pulpar, tal como describieron Yamasaki y cols.<sup>(40)</sup> que de pulpotomía, puesto que el pequeño tamaño del diente nos impide realizar una remoción completa de la pulpa cameral. No obstante, teniendo en cuenta las observaciones de Berman y Massler<sup>(32)</sup>, el acceso siempre se hizo desde oclusal ya que permitía mejor control sobre el tamaño y la profundidad. Debido a que los primeros molares mandibulares quedan en la profundidad del suelo de la boca, su acceso es prácticamente imposible, por lo que nos vemos limitados a trabajar en los primeros molares maxilares.

En cuanto al material utilizado se precisa un instrumental adecuado en tamaño así como conseguir un acceso visual que se puede mejorar utilizando lentes binoculares.

La anestesia utilizada en este estudio fue ketamina intramuscular a dosis de 75 mg/kg que, aunque da un tiempo de trabajo bastante limitado, el animal tiene una recuperación rápida y resulta una técnica de fácil

aplicación. Además de este fármaco también se han utilizado en otros estudios con ratas el pentobarbital<sup>(32)</sup> y el éter<sup>(40)</sup>. En animales como los monos y los perros es más frecuente la inducción con ketamina y pentobarbital y, a continuación, la intubación endotraqueal y mantenimiento con halotano y óxido nítrico<sup>(7,11,12,16,26)</sup>.

Referente al método, una vez realizada la exposición pulpar, el hueso liofilizado se aplicó con una pequeña espátula pues se preparó con una consistencia de pasta. No obstante, en caso de agentes líquidos como el formocresol, la técnica más frecuente conlleva la aplicación mediante una punta de papel totalmente impregnada tal como describieron Massler y Mansukhani<sup>(41)</sup>, pues así se evita el exceso de la solución sobre el tejido pulpar. Otros autores aplican directamente la solución sobre el tejido pulpar con la ayuda de una jeringa<sup>(39)</sup>.

En cuanto a la técnica histológica, debemos resaltar la complejidad del proceso de descalcificación al tratarse de muestras de tejidos duros calcificados. Este proceso supone la utilización de sustancias ácidas que pueden dañar los tejidos si nos excedemos en su aplicación. Así, en este estudio utilizamos una solución de ácido fórmico y ácido clorhídrico, aunque otros autores también han utilizado soluciones de ácido fórmico y citrato de sodio<sup>(12,14,16,23,25)</sup>, o bien EDTA al 10%<sup>(3,6,10,11)</sup>. Otro problema que contribuye a la difícil interpretación de la histopatología pulpar es la pérdida de la tridimensionalidad por parte del observador. Así, según el corte histológico podemos encontrar a veces una exageración de células que es sólo una falsa impresión que desaparecerá con cortes más profundos.

Teniendo en cuenta estos aspectos y las diferentes poblaciones, metodología y condiciones utilizadas en los distintos estudios, vemos que los resultados no pueden ser siempre comparables.

Se sabe que la pulpa dental tiene el potencial de recuperarse de una herida bajo condiciones favorables. La curación como tal, a nivel histológico, puede evidenciarse con la reducción o resolución de la inflamación pulpar a través de un proceso que transcurre

por una fase de inflamación aguda o inflamación crónica y reparación o cicatrización. La formación de un puente de dentina reparativa sobre la pulpa expuesta es señal de reparación; sin embargo, en ocasiones el remanente pulpar persiste con inflamación crónica y finalmente puede fracasar a pesar de la formación del puente<sup>(42,43)</sup>.

De este modo consideramos que el grado de inflamación pulpar del tejido remanente es más indicativo de su estado tras la pulpotomía, que la presencia o no de un puente dentinario.

En cuanto a los resultados obtenidos con la aplicación de hueso liofilizado, nuestros resultados difieren de los obtenidos en otros estudios, pues la mayoría de nuestras muestras no presentaban signos claros de reparación, pues se mantenía una inflamación moderada en el tejido pulpar y sólo en algunas muestras se insinuaba la presencia de un puente dentinario.

Sin embargo, Fadavi y cols.<sup>(12)</sup>, en un estudio con monos y la aplicación de hueso liofilizado al cabo de 12 semanas, observaron en la mayoría de los dientes tratados, justo por debajo del lugar de amputación, una barrera calcificada, con inflamación leve en el tercio medio y ausencia de ésta en el tercio apical.

Posteriormente, en un estudio con monos realizado por este mismo autor, se corroboraron los resultados anteriores a las 6 semanas del tratamiento con hueso liofilizado<sup>(13)</sup>.

Nuestros resultados sorprenden básicamente porque el hueso liofilizado es un material biocompatible y como tal tiene un potencial reparativo sin los efectos indeseables de otros agentes.

Principalmente hay un punto en el que difiere nuestro estudio respecto a los anteriores realizados con hueso liofilizado y que puede condicionar nuestra respuesta no tan favorable: Fadavi y cols. aplicaron una delgada capa de estaño entre el hueso liofilizado y la base de óxido de zinc-eugenol para evitar cualquier posible inflamación sobre el tejido pulpar, pues el eugenol como tal en contacto directo con el tejido puede dañarlo<sup>(44)</sup>.

Otra de las consideraciones sería el pequeño tamaño del molar que dificulta la aplicación de la restau-

**38** ración de amalgama de manera que no se pierda y evite microfiltraciones.

En cuanto al tiempo de evolución, 45 días en ratas permite desarrollar la respuesta pulpar en su totalidad pues ya Berman y Massler<sup>(32)</sup> observaron que entre 21-28 días se observaba ya la formación de un puente dentinario en los dientes tratados. Por este motivo, en este estudio se decidió ampliar a 45 días el control con la finalidad de confirmar que no existían más cambios en el tejido pulpar. Quizás se deberían establecer los controles a los 15 días, 30 días y 45 días para observar la evolución y progresión de la respuesta pulpar.

Se precisarían más estudios con hueso liofilizado,

pues se trata de un material biológico más aceptable que otros agentes como el formocresol, con una muestra mayor y con la consideración de aplicar una base sin los efectos indeseables del óxido de zinc-eugenol.

Haciendo referencia a nuestro objetivo del estudio, consideramos que aún siendo una muestra muy reducida ha permitido capacitarnos y mediante la técnica desarrollada establecer un protocolo reproducible para otros estudios sobre el efecto de los distintos fármacos en el tejido pulpar. Nos gustaría que otros investigadores pudieran aprovechar nuestro modelo experimental como punto de partida y mejorarlo, ayudando así al progreso de la investigación en pulpa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Myers DR, Pashley DH, Whitford GM, McKinney RV. Tissue changes induced by the absorption of formocresol from pulpotomy sites in dogs. *Pediatr Dent* 1983;**5**:6-8.
2. Pashley EL, Myers DR, Pashley DH. Systemic distribution of 14C-formaldehyde from formocresol treated pulpotomy sites. *J Dent Res* 1980;**59**:603-608.
3. Ranly DM, Fulton R. Reaction of rat molar pulp tissue to formocresol, formaldehyde and cresol. *J Endod* 1976;**2**:176-181.
4. Ranly DM. Assessment of the systemic distribution and toxicity of formaldehyde following pulpotomy treatment: part one. *J Dent Child* 1985;**52**:431-434.
5. Ranly DM, Horn D. Assessment of the systemic distribution and toxicity of formaldehyde following pulpotomy treatment: part two. *J Dent Child* 1987;**54**:40-44.
6. Lloyd JM, Seale NS, Wilson CF. The effects of various concentrations and lengths of application of glutaraldehyde on monkey pulp tissue. *Pediatr Dent* 1988;**10**:115-119.
7. Fuks AB, Bimstein E, Michaeli Y. Glutaraldehyde as a pulp dressing after pulpotomy in primary teeth of baboon monkeys. *Pediatr Dent* 1986;**8**:32-36.
8. Landau MJ, Johnsen DC. Pulpal response to ferric sulfate in monkeys. *J Dent Res* 1988;**67**:215 Abstract n°822.
9. Fei AL, Udin RD, Johnson R. A clinical study of ferric sulfate as a pulpotomy agent in primary teeth. *Pediatr Dent* 1991;**13**:327-332.
10. Fuks A, Michaeli Y, Sofer Saks B, Shoshan S. Enriched collagen solution as a pulp dressing in pulpotomized teeth in monkeys. *Pediatr Dent* 1984;**6**:243-247.
11. Fuks A, Jones PC, Michaeli Y, Bimstein E. Pulp response to collagen and glutaraldehyde in pulpotomized primary teeth of baboons. *Pediatr Dent* 1991;**13**:142-150.
12. Fadavi S, Anderson A, Punwani I. Freeze dried bone in pulpotomy procedures in monkey. *J Pedo* 1989;**13**:108-121.
13. Fadavi S, Anderson AW. A comparison of the pulpal response to freeze-dried bone, calcium hydroxide, and zinc oxide-eugenol in primary teeth in two cynomolgus monkeys. *Pediatr Dent* 1996;**18**:52-56.
14. Rutherford RB, Wahle J, Tucker M, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1993;**38**:571-574.
15. Nakashima M. The induction of reparative dentine in the amputated dental pulp of the dog by bone morphogenetic protein. *Arch Oral Biol* 1990;**35**:493-497.
16. Shulman ER, McIver FT, Burkes EJ. Comparison of electrosurgery and formocresol as pulpotomy techniques in monkey primary teeth. *Pediatr Dent* 1987;**9**:189-194.
17. Liu JF, Chen LR, Chao SY. Laser pulpotomy of primary teeth. *Pediatr Dent* 1999;**21**:128-129.
18. Sánchez S, Planas E. Contribución de la Unidad de Farmacología a la Facultad de Odontología. *Odontol* 1993;**1**:168-174.
19. Eisenmenger E, Zetner K. *Veterinary dentistry. Society of Veterinary Dentistry*. Philadelphia. Lea and Febiger, 1985; 14-16.
20. Pascon E, Leonardo M, Safavi K, Langeland K. Tissue reaction to endodontic materials: methods, criteria, assessment, and observations. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1991;**72**:222-237.
21. Poole T. *The care and management of laboratory animals*. 6th ed. England: Longman Scientific and Technical, 1987.
22. Langeland K, Guttuso J, Langeland L, Tobon G. Methods in the study of biologic responses to endodontic materials. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1969;**27**:522-542.
23. García-Godoy F, Novakovic DP, Carvajal IN. Pulpal response to different application times of formocresol. *J Pedo* 1982;**6**:176-193.
24. Nakashima M. Dentin induction by implants of autolyzed antigen-extracted allogeneic dentin on amputated pulps of dogs. *Endod Dent Traumatol* 1989;**5**:279-286.



25. García-Godoy F. A comparison between zinc oxide-eugenol and polycarboxylate cements on formocresol pulpotomies. *J Pediatr Dent* 1982;**6**:203-217.
26. Seow WK, Thong YH. Evaluation of the novel anti-inflammatory agent tetradrine as a pulpotomy medicament in a canine model. *Pediatr Dent* 1993;**15**:259-266.
27. Wu MK, Wang ME. Antibody formation to dog pulp tissue altered by a paste containing paraformaldehyde. *Int Endod J* 1989;**22**:133-137.
28. García-Godoy F, Olivo MA. Reacciones pulpares al formocresol diluido. *Rev Dent* 1977;**20**:15-27.
29. Saiz ML, García de Osmo JL, Campairo FC. *Animales de laboratorio. Cría, manejo y control sanitario*. Madrid, 1983.
30. Eronat N, van Mullen PJ, Wijnbergen M. An enzyme histochemical study of the influence of formocresol and calcium hydroxide on dental pulp. *Endod Dent Traumatol* 1988;**4**:37-43.
31. Ranly DM, Horn D, Hubbard GB. Assessment of the systemic distribution and toxicity of glutaraldehyde as a pulpotomy agent. *Pediatr Dent* 1989;**11**:8-13.
32. Berman DS, Massler M. Experimental pulpotomies in rat molars. *J Dent Res* 1958;**37**:229-242.
33. Ranly DM, Fulton R. An autoradiographic of the response of rat molar pulp to formocresol using <sup>3</sup>H-thymidine. *Pediatr Dent* 1983;**5**:20-24.
34. Ranly DM, Horn D. Distribution, metabolism and excretion of <sup>14</sup>C-glutaraldehyde. *J Endod* 1990;**16**:135-139.
35. Ranly DM, Amstutz L, Horn D. Subcellular localization of glutaraldehyde. *Endod Dent Traumatol* 1990;**6**:251-254.
36. Myers DR, Pashley DH, Lake FT, Burnham D, Kalathour S, Waters R. Systemic absorption of <sup>14</sup>C-glutaraldehyde from glutaraldehyde treated pulpotomy sites. *Pediatr Dent* 1986;**8**:134-138.
37. Horsted P, El-Ahark K, Langeland K. Capping of monkey pulps with dycal and a Ca-eugenol cement. *Oral Surg Oral Med Oral Path* 1981;**52**:531-553.
38. Fuks AB, Bimstein E, Michaeli Y. Glutaraldehyde as a pulp dressing after pulpotomy in primary teeth of baboon monkeys. *Pediatr Dent* 1986;**8**:32-36.
39. Ranly DM, Fulton R. Reaction of rat molar pulp tissue to formocresol, formaldehyde and cresol. *J Endod* 1976;**2**:176-181.
40. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *J Endod* 1994;**20**:13-17.
41. Massler M, Mansukhani N. Effects of formocresol on the dental pulp. *J Dent Child* 1959;**26**:277-282.
42. Hammersen F. *Histología. Atlas en color de citología, histología y anatomía microscópica*. 2ª ed. Barcelona: Salvat, 1982; 1-5.
43. Kopel HM. Considerations for the direct pulp capping procedure in primary teeth: a review of the literature. *J Dent Child* 1992;**59**:141-149.
44. Gulati N, Chandra S, Aggarwal PK, Jaiwal JN, Singh M. Cytotoxicity of eugenol in sealer containing zinc-oxide. *Endod Dent Traumatol* 1991;**7**:181-185.