

MEDICIÓN DE CARIES Y MODIFICACIONES EN PULPAS DE RATAS SOMETIDAS A DIETA HABITUAL Y CARIOGÉNICA TRATADAS CON COLAGENASA TIPO II

CARIOUS MEASUREMENT AND PULPS MODIFICATIONS IN RATS UNDERGOING HABITUAL AND CARIOGENIC DIETS TREATED WITH COLLAGENASE TYPE II

Alicia KOHLI¹; Stella Maris PEZZOTTO²; Leonor POLETTTO²; Hector DÁVILA²

¹Facultad de Odontología, Universidad Nacional de Rosario. Argentina. ²Consejo de Investigaciones, Universidad Nacional de Rosario. Argentina.

RESUMEN

El diente puede enfermar por caries, con destrucción de tejidos duros exponiéndolo a gérmenes, provocando inflamación y dolor, siendo factor de riesgo la dieta cariogénica. Nuestros objetivos fueron visualizar los componentes del órgano pulpodentinal en ratas, comparar métodos de medición de caries y observar modificaciones en pulpas sometidas a dieta cariogénica. Se utilizaron ratas endocriadas líneas "l" y "e" al destete, divididas en dos grupos (-G1 y -G2), alimentadas con balanceado rata-ratón. El -G2 fue suplementado con sacarosa 10% en agua de consumo ad libitum y se sacrificaron secuencialmente. Con lupa, explorador y Rodamina se detectaron caries cavitadas e incipientes. Las mandíbulas fueron separadas quirúrgicamente, fijadas en formol 10%, desmineralizadas en ácido nítrico 8%, tratadas con colagenasa tipo II, incluidas, cortadas a 5 µm, coloreadas y examinadas con microscopio óptico a 100 y 450 aumentos. El infiltrado de zona basal se clasificó como ausente al no visualizarlo, parcial y total al ocupar 75% y 100% del perímetro pulpar. Las diferencias en las frecuencias de caries fueron analizadas con la prueba de chi-cuadrado y nivel de significación 5%. El órgano pulpodentinario permaneció unido, la proporción de caries incipientes fue mayor y la basal pasó de parcial a totalmente infiltrada en línea "e" -G2, lo que podría deberse a factores medio ambientales y a la dieta cariogénica.

Palabras claves: caries, colagenasa, dieta cariogénica, pulpa dental.

ABSTRACT

Tooth can get ill by carious, with destruction of hard tissues exposed to germs, causing inflammation and pain, being the cariogenic diet a risk factor. To visualize the pulpodentinal components complex in rats, to compare measurement carious teeth methods and observe pulps modifications undergoing cariogenic diets. Rats inbred "l" and "e" lines were investigated, separated in G1 and G2 groups, nourished with a balanced rat-mouse diet. -G2 was supplemented with sucrose 10% in water ad libitum and then sacrificed sequentially. With magnifier, explorer and rhodamine cavitated and emerging carious were detected. Jaws were surgically separated, fixed in formalin 10%, demineralized in 8% nitric acid, treated with collagenase Type II, included, cut 5 µm, colored and examined with light microscope 100-450 magnification. The basal area infiltration was considered absent when it was not visible, partial and total when they occupied 75% and 100% of pulp perimeter. Results were analyzed with Chi-square test and significance level 5%. Pulpodentinal complex remained joined, incipient carious proportion was higher and the basal was partial or fully infiltrated in line "e" -G2, what could be due to environmental factors and cariogenic diet.

Keywords: carious, collagenase, cariogenic diet, dental pulp.

Recibido setiembre 09, 2013 - Aceptado enero 06, 2014

* Correspondencia de autor: Alicia Kohli. Facultad de Odontología, UNR. Pasaje Rizzuto 3473 Tel. 0341 4612728 (CP 2000). Rosario, Argentina. e-mail: aliciakohli2009@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

La pulpa dental es un tejido conjuntivo blando que se encuentra como componente central del diente rodeado por tejido conjuntivo mineralizado, formando ambos el complejo u órgano pulpodentinario, unidad embriológica, estructural y funcional de la pieza dental. Por las diferencias de consistencia enunciadas, este complejo es de difícil visualización en forma conjunta, por lo que fueron ambos estudiados con diferentes técnicas histológicas y sus resultados analizados separadamente (1). La pulpa clínicamente sana presenta sus componentes en zonas estructuralmente definidas desde afuera hacia dentro. Periféricamente se encuentran los odontoblastos, formando una empalizada denominada membrana de Eboris; por dentro, la basal de Weil o zona pobre en células con notoria ausencia de elementos celulares, atravesada por capilares; luego la zona celular rica en células y por último la central con ramas terminales de vasos y nervios (2).

Debido a su ubicación, la pulpa es de difícil obtención, pero una vez separada puede ser procesada con técnicas de rutina y sometida a coloraciones. La dentina se analiza con técnica por desgaste en su aspecto inorgánico. Algunos autores interesados en la visualización de uno de sus componentes orgánicos, como el proceso del odontoblasto, combinaron criofractura, descalcificación y digestión parcial con colagenasa y lograron describirlos (3).

El diente expuesto al medio bucal es susceptible de enfermar por caries, enfermedad infecciosa compleja caracterizada por desmineralización y destrucción de los tejidos duros del diente que expone la superficie dentinal al medio bucal y a los gérmenes, provocando inflamación, migración celular hacia la zona basal, vasodilatación y exudado, que originan dolor (4, 5).

Siendo un factor de riesgo la dieta cariogénica.

A fin de obtener un modelo que nos permita estudiar las modificaciones que ocasiona el avance de la caries, los objetivos de este trabajo fueron: a) utilizar la combinación de técnicas anteriormente utilizadas que nos permitieran visualizar unidos los componentes del órgano pulpodentinal en ratas; b) comparar los métodos de medición de caries y c) observar las modificaciones en dichas pulpas en ratas sometidas a dieta cariogénica.

MATERIALES Y MÉTODOS

En un trabajo previo aplicamos una combinación de desmineralización y eliminación de fibras colágenas con el uso de la enzima colagenasa tipo II, logrando visualizar el órgano pulpodentinal en dientes humanos con pulpas sanas (6). Continuando con este proyecto de largo alcance, en esta etapa aplicamos la misma técnica para la preparación de las muestras y observamos histológicamente los cambios producidos en pulpas de ratas.

Se utilizaron 27 ratas endocriadas línea "I" al destete, 21 días de edad, divididas en dos grupos -G1 con alimento balanceado rata-ratón y -G2 con igual tipo de alimento suplementado con una solución de sacarosa al 10% diluida en el agua de consumo ad libitum. Se aplicó la misma metodología en 15 ratas endocriadas línea "e". Las ratas de la línea "I" fueron sacrificadas a los 14, 21, 28 días y las de la línea "e" a los 21, 28 y 35 días. Ambas líneas de ratas se obtuvieron en el criadero de la Facultad de Ciencias Médicas de Rosario. Las ratas línea "e" son blancas de menor masa corporal. Las de línea "I" resultaron de la cruce entre una rata "e" preñada accidentalmente por una *Rattus rattus* originando entre sus crías un macho de color negro el que fue apareado con hembras de la línea "e". De estas crías fueron

seleccionadas las negras, de mayor masa corporal y ósea, denominadas línea "1" (7).

Las superficies oclusales de primeros, segundos y terceros molares del maxilar superior y de la mandíbula (en total 12 superficies por rata) fueron examinadas con lupa y explorador dental para la detección de caries cavitadas oclusales (CCO), luego fueron pinceladas con Rodamina y se lavaron las superficies para la detección de caries incipientes (CI). Las mandíbulas fueron separadas quirúrgicamente, fijadas con formol al 10%, desmineralizadas en ácido nítrico al 8%, tratadas con colagenasa tipo II, incluidas en parafina, cortadas a 5 µm de espesor, coloreadas con hematoxilina-eosina y examinadas con microscopio de luz a menor (100X) y mayor (450X) aumentos.

El infiltrado de la zona basal se midió con ambos aumentos clasificándose en ausente al no ser visualizado, parcial al ocupar hasta el 75% y total al extenderse al 100% del perímetro pulpar.

Las comparaciones entre grupos se analizaron

aplicando Pruebas de Chi-Cuadrado. Se trabajó con un nivel de significación del 5%. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa STATA 9.1 (Stata Corp, College Station, Texas, USA, 2005).

RESULTADOS

A menor aumento, los tejidos del órgano pulpodentinario permanecieron unidos y sus componentes pulpares, conservados. A mayor aumento, se observó la unión existente entre pulpa y dentina a través de los odontoblastos de la membrana de Eboris y se visualizó el nacimiento de los procesos (Fig. 1).

Al analizar el total de animales estudiados, se encontró que la proporción de dientes cariados fue del 61% en G1 y del 81% en G2, si bien la diferencia no llegó a ser estadísticamente significativa ($p=0,09$) (Gráfico 1).

De 36 superficies examinadas de molares en la línea "1" en el G1 se lograron analizar 13 pulpas a los 14 días, 12 a los 21 y 22 a los 28. En el G2 fueron 20, 24 y 19 pulpas respectivamente. En línea "e" G1, de 24 superficies de

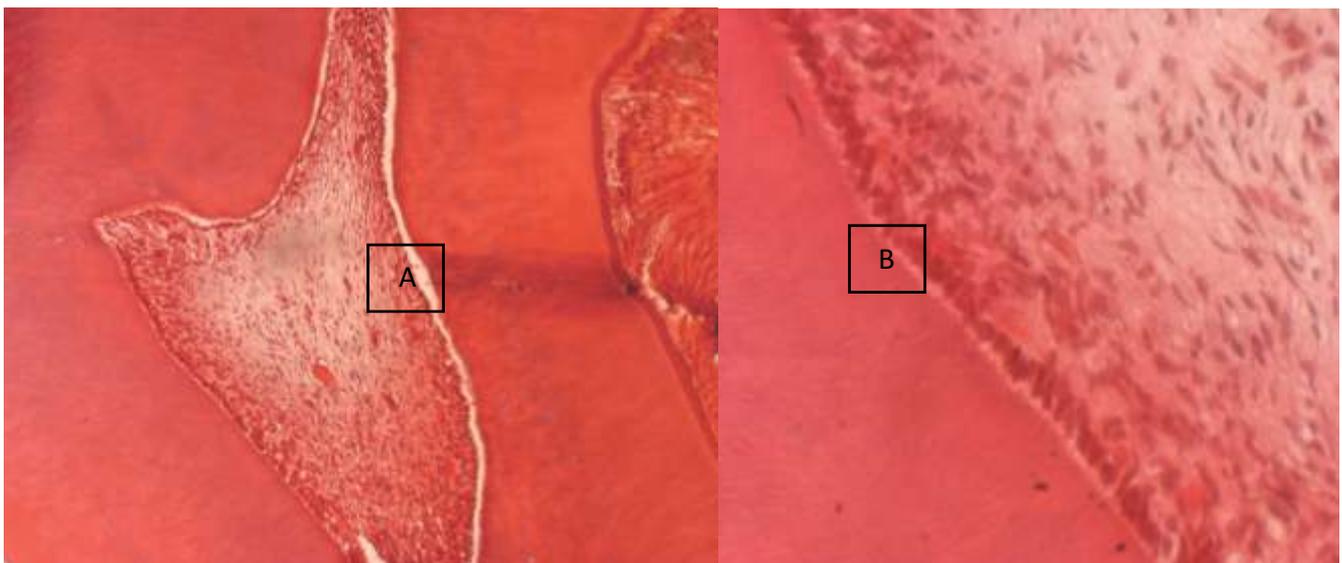


Figura 1. Componentes del órgano pulpodentinario con la técnica de desmineralización y coloración de hematoxilina-eosina, a menor aumento (A) y odontoblastos y procesos a mayor aumento (B)

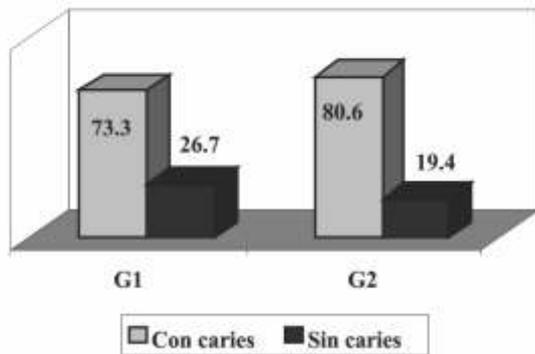


Gráfico 1. Presencia de caries en ambos grupos (%). Prueba Chi- cuadrado: p=0,09

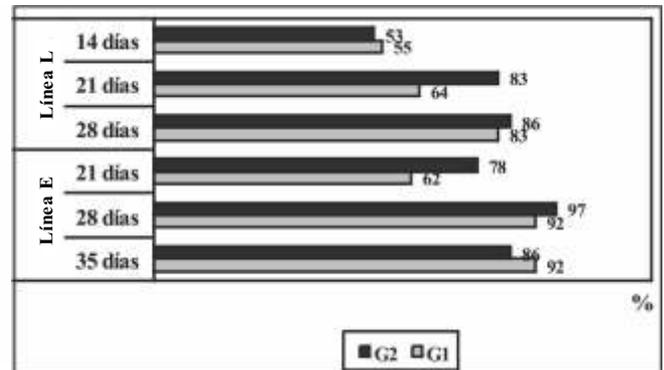


Gráfico 2. Detección de caries en Línea "l" y "e".

molares analizadas se lograron examinar 5, 10 y 10 pulpas. En G2, 17, 17 y 18 pulpas sin dobleces, fracturas ni pérdidas. La proporción de piezas con caries discriminadas según línea, día de evaluación y dieta (Gráfico 2). Si bien ninguna de las diferencias observadas alcanzó significado estadístico.

En Tabla 1 se muestran resultados observados sobre el total de superficies oclusales examinadas en los dientes de ratas "l" y "e". Se cuantificó el número de

caries y se las distribuyó de acuerdo al método de detección utilizado y a la dieta recibida. No se encontraron diferencias significativas en la proporción de lesiones halladas entre G1 y G2. Se observó que en los animales de la línea "l", la proporción de CCO fue significativamente mayor que la de CI, en ambos grupos. La proporción de CI sobre CCO en ratas de la línea "l" mostró diferencia significativa tanto en G1 como G2.

| | G1: Dieta Normal | | | | G2: Dieta Cariogénica | | | |
|------------------|------------------|-------------|--------------|-------------------|-----------------------|-------------|--------------|-------------------|
| | SE | CI n (%) | CCO n (%) | TOTAL lesiones | SE | CI n (%) | CCO n (%) | TOTAL lesiones |
| Línea "l" | | | | | | | | |
| 14 días | 36 | 0 (0,0) | 20 (55,6) | 20 (55,6) | 36 | 0 (0,0) | 19 (52,8) | 19 (52,8) |
| 21 días | 36 | 11 (30,6) | 12 (33,3) | 23 (63,9) | 36 | 13 (36,1) | 17 (47,2) | 30 (83,3) |
| 28 días | 36 | 9 (25,0) | 21 (58,3) | 30 (83,3) | 36 | 10 (27,8) | 21 (58,3) | 31 (86,1) |
| TOTAL | 108 | 20 (18,5) | 53 (49,1) | 73 (67,6) | 108 | 23 (21,3) | 57 (52,8) | 80 (74,1) |
| Línea "e" | | | | | | | | |
| 21 días | 24 | 3 (12,5) | 12 (50,0) | 15 (62,5) | 36 | 13 (36,1) | 15 (41,7) | 28 (77,8) |
| 28 días | 24 | 3 (12,5) | 19 (79,2) | 22 (91,7) | 36 | 14 (38,9) | 21 (58,3) | 35 (97,2) |
| 35 días | 24 | 7 (29,2) | 15 (62,5) | 22 (91,7) | 36 | 13 (36,1) | 18 (50,0) | 31 (86,1) |
| TOTAL | 72 | 13 (18,1) | 46 (63,9) | 59 (81,9) | 108 | 40 (37,0) | 54 (50,0) | 94 (87,0) |

Pruebas Chi-cuadrado:
 Total de lesiones línea "l": G1 versus G2 según día: p=0,72
 Total de lesiones línea "e": G1 versus G2 según día: p=0,82
 Total de lesiones ambas líneas: G1 versus G2 según día: p=0,77
 CI versus CCO en G1, línea "l": p=0,002
 CI versus CCO en G2, línea "l": p=0,004
 CI versus CCO en G1, línea "e": p=0,34

TABLA 1. Superficies examinadas (SE) en ambas líneas, número de caries incipientes (CI) y cavitadas (CCO) según día del examen.

Se comparó la proporción de CI detectadas en ambas líneas y grupos los días 21 y 28. En la línea “l” se observó que la proporción de CI en G2 fue mayor. En la línea “e” el G2 mostró mayor proporción de CI tanto a los 21 como 28 días observándose el posible efecto de la dieta azucarada (Gráfico 3).

En Tabla 2 se analizó si fueron igualmente afectadas por la caries maxilar superior y mandíbula en cada grupo. En ambas líneas se comprobó que en el G1 mandíbula y maxilar presentaron esta lesión en forma similar. En cambio en el G2 la frecuencia de caries fue menor en maxilares, sin alcanzar significación estadística.

Con el avance de las semanas, la zona basal parcialmente infiltrada en la línea “l” fue disminuyendo en G2 como resultado del aumento de infiltrado celular. En línea “e” G2, esta zona disminuyó hasta desaparecer en la quinta semana, cuando la basal pasó de ser parcial a totalmente infiltrada (Gráfico 4).

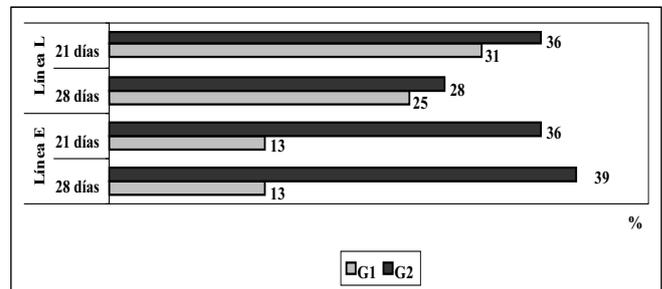


Gráfico 3. Proporción de CI detectadas frente a dieta en ambas líneas, días 21 y 28.

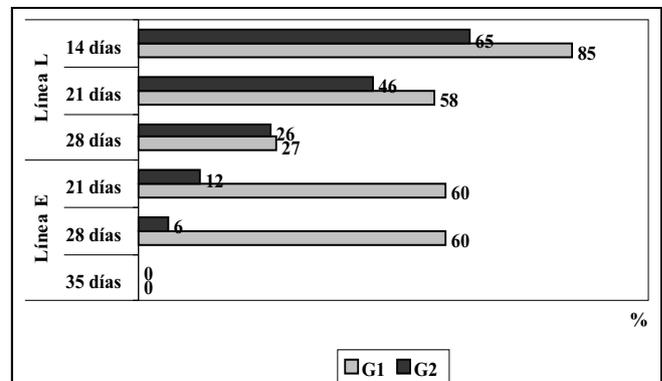


Gráfico 4. Infiltrado parcial de zona basal, ambos grupos por día y dieta.

| | G1: Dieta Normal | | | | G2: Dieta Cariogénica | | | |
|------------------|------------------|--------------------|------------------|-------------------|-----------------------|--------------------|------------------|-------------------|
| | SE | Mandíbula n (%) | Maxilar n (%) | TOTAL lesiones | SE | Mandíbula n (%) | Maxilar n (%) | TOTAL lesiones |
| Línea “l” | | | | | | | | |
| 14 días | 36 | 10 (27,8) | 10 (27,8) | 20 (55,6) | 36 | 12 (33,3) | 7 (19,4) | 19 (52,8) |
| 21 días | 36 | 11 (30,6) | 12 (33,3) | 23 (63,9) | 36 | 17 (47,2) | 13 (36,1) | 30 (83,3) |
| 28 días | 36 | 13 (36,1) | 17 (47,2) | 30 (83,3) | 36 | 17 (47,2) | 14 (38,9) | 31 (86,1) |
| TOTAL | 108 | 34 (31,5) | 39 (36,1) | 73 (67,6) | 108 | 46 (42,6) | 34 (31,5) | 80 (74,1) |
| Línea “e” | | | | | | | | |
| 21 días | 24 | 8 (33,3) | 7 (29,2) | 15 (62,5) | 36 | 14 (38,9) | 14 (38,9) | 28 (77,8) |
| 28 días | 24 | 10 (41,7) | 12 (50,0) | 22 (91,7) | 36 | 18 (50,0) | 17 (47,2) | 35 (97,2) |
| 35 días | 24 | 12 (50,0) | 10 (41,7) | 22 (91,7) | 36 | 17 (47,2) | 14 (38,9) | 31 (86,1) |
| TOTAL | 72 | 30 (41,7) | 29 (40,3) | 59 (81,9) | 108 | 49 (45,4) | 45 (41,79) | 94 (87,0) |

Pruebas Chi-cuadrado:
 Mandíbula versus Maxilar en G1, línea “l”: p=0,889
 Mandíbula versus Maxilar en G2, línea “l”: p=0,841
 Mandíbula versus Maxilar en G1, línea “e”: p=0,813
 Mandíbula versus Maxilar en G2, línea “e”: p=0,928

TABLA 2. Presencia de caries por día, línea y arco superior o inferior.

DISCUSIÓN

Aplicando una técnica desarrollada en dientes humanos (6), con la que logramos visualizar estructuras y poner de manifiesto la unión dentinopulpar, vital para la integridad del órgano pulpodentinario y la salud de los dientes, trasladamos esta experiencia a los dientes de ratas. Estos animales fueron sometidos a dieta normal y cariogénica en la cual tratamos de visualizar los cambios producidos en la pulpa. Sabir y colaboradores tallaron bajo anestesia cavidades en dientes de ratas, las que luego fueron sacrificadas, sus mandíbulas extirpadas quirúrgicamente, desmineralizadas con EDTA y teñidas con hematoxilina-eosina obteniendo visualización de elementos de la pulpa y dentina (8). Con nuestra técnica, al realizar la desmineralización con ácido nítrico, los elementos y estructuras de la pulpa se conservaron permitiendo el análisis histológico al microscopio (6).

Nuestro estudio fue realizado en dientes de ratas que soportan estímulos diversos. Entre ellos padecimiento de caries, abrasiones, fracturas y permeabilidad dentinaria que predisponen a la respuesta dentinopulpar (9, 10). En un estudio sobre la distribución de especies de ratas donde se incluyó a la provincia de Santa Fe y a la ciudad de Rosario, se realizó la medición de sus molares hallando diferencias entre grupos en el largo y el ancho de sus caras oclusales (11). En nuestro estudio no hemos realizado la medición del tamaño molar en las líneas incluidas, pero sí comprobamos que si bien no hubo diferencias anatómicas en sus caras oclusales las hubo en el tamaño siendo mayores los molares de ratas línea "I". La población de ratas de nuestro estudio, "e" y "I", estuvo formada por hembras las que desde los 14 hasta los 28 y 35 días de nuestro experimento aún no habían tenido su pico

máximo de crecimiento somático, el que se alcanza aproximadamente a los 70 días; lo mismo pudo ocurrir con la maduración esquelética (12). Nuestro estudio se extendió en línea "e" hasta los 35 días, por lo tanto todos nuestros animales fueron jóvenes y en desarrollo con alta movilización de calcio y fosfatos para la formación de huesos y dientes. Estos animales se alimentaron con dieta rata-ratón sin el agregado de ingesta láctea y sin la suplementación de calcio y fosfatos, hecho que pudo haber influido en el avance de la caries debido a la mayor susceptibilidad por menor mineralización de los cristales de hidroxiapatita del esmalte por escasez de estos elementos, naturalmente aportados por la leche materna (13).

Se observó que con el método de evaluación para cuantificar las caries no hubo diferencias significativas en la proporción de lesiones halladas entre G1 y G2. No obstante, con el transcurrir de las semanas de tratamiento, en los dientes en ambos grupos la caries estuvo en franco avance siendo siempre levemente mayor en el grupo tratado con agua azucarada. Las caries, tanto en ratas con dieta habitual como las que recibieron dieta cariogénica, podrían ser explicadas parcialmente por la anatomía de las caras oclusales de los molares cuyas cúspides de forma serrada y fisuras profundas serían más retentivas del alimento ingerido (10). El mayor porcentaje de caries en el grupo con dieta azucarada es coincidente con el hallado en las que consumieron leche y agua endulzada con diferentes azúcares entre ellos sacarosa, la que fuera utilizada en este trabajo, efecto que adicionado a la morfología de los dientes y consistencia de la dieta estándar produjo mayor porcentaje de caries (9, 14). En las ratas que recibieron dieta cariogénica la frecuencia de caries fue menor en maxilares respecto a mandíbula hecho que podría deberse a que el alimento

con la saliva se torna adhesivo pegándose a las ranuras de los molares mandibulares donde por gravedad es más difícil de eliminar.

En cuanto a la visualización de la zona oligocelular de Weil en las pulpas de ambos grupos hubo infiltración parcial indicando inflamación de tipo moderado la que siempre fue mayor en el grupo de ratas que recibió tratamiento. Este resultado concuerda con lo hallado en pulpas de ratas en las que se tallaron cavidades y se observó una respuesta inflamatoria moderada con infiltración parcial de la zona de Weil. Suponemos que el infiltrado inflamatorio en estas pulpas fue resultado de la respuesta defensiva de las mismas ante el avance de la caries (8). Pero no desconocemos que los animales de este bioterio viven en jaulas sin lecho, expuestas a agentes infecciosos que no forman parte de su flora normal y son capaces de infectarlos. Además, como se demostrara en un estudio realizado con ratones, este medio ambiente generaría en ellos una respuesta inmune innata o adquirida que condicionaría su resistencia a los gérmenes de su hábitat (15). No se descarta su infestación la que podría contribuir a la infiltración celular de la zona basal observada pero, en este trabajo, se debería tener presente que la comprobación del avance de caries podría deberse al efecto del azúcar en el agua de consumo utilizada, que sin aditamento lácteo es gran productora de caries como lo comprobara Bowen (13). Se debe considerar que las caries es una enfermedad infecciosa multifactorial cuyo desarrollo se realiza por la acción conjunta entre esmalte, dieta, tiempo de interacción y

huésped susceptible, es decir con gérmenes cariogénicos como lo son estreptococos mutans, lactobacilos y actinomicetes, desconociendo la presencia de los patógenos bucales de estos animales (16). Además los patógenos activan a los macrófagos pulpares, productores de óxido nítrico implicado en múltiples procesos inflamatorios el que se comporta como un radical libre cuya presencia en exceso produce daño tisular (15, 17). El óxido nítrico de origen endógeno, molécula intracelular mensajera, cumpliría funciones cardiovasculares, neurológicas e inmunológicas, y su aumento en pulpas inflamadas junto a mediadores químicos contribuiría a la vasodilatación, mediando la respuesta inmunológica inflamatoria y actuando como neurotransmisores entre nervios y vasos durante el proceso patológico pulpar (18).

Hubiera sido de interés tener en cuenta el efecto genético de la especie previo al diseño del experimento, considerando no sólo la exposición del animal a su medio ambiente sino además, poder diferenciar el efecto de la flora cariogénica desarrollada por la presencia del azúcar (14).

Se puede suponer que el avance de la caries en estos animales es el resultado de la sumatoria de efectos como lo son el menor grado de mineralización de las piezas dentales, el agua azucarada, la dieta pastosa y la anatomía dentaria. La desaparición paulatina de la zona basal en ambos grupos de ratas podría deberse a factores medio ambientales en concurrencia con el efecto de dieta cariogénica. Sería de interés profundizar en estos aspectos en futuros trabajos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Avery JK, Chiego DJ (2007) Principios de Histología y Embriología bucal con orientación clínica. Edit. Elsevier, 3ª Edición, Michigan, EEUU.
2. Yamada T, Nakamura K, Iwaku M, Fusayama T (1983) The extent of the odontoblast process in normal and carious human dentine. J Dental Rest 62(7): 798-802.

3. D'souza R, Bachman T, Baumgardner K, Butler W, Litz M (1995) Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res* 74(2): 702-709.
4. Bjordal L, Darvann T, Thylstrup A (1998) A quantitative light microscopic study of the odontoblast and subodontoblastic reactions to active and arrested enamel caries without cavitation. *Caries Res* 32(1): 59-69.
5. Miyauchi M, Takata T, Ito H, Kobayashi J, Nikai H, Ijuhin N (1996) Immunohistochemical demonstration of prostaglandins E(2)F-2 alpha, and 6-keto-prostaglandin F-1-alpha in rats dental pulp with experimentally induced inflammation. *J Endodontics* 22(11): 600-602.
6. Kohli A, Postiglione G, Pezzotto SM, Poletto L (2004) Coloraciones para visualizar el proceso odontoblástico. *Rev Asoc Odont Argentina* 92: 229-233.
7. Garroco O (2004) División Biología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Rosario. *Anuario Fundación Dr. JR Villavicencio* 12: 026-029.
8. Sabir A, Tabbu C, Agustiono P, Sosroseno W (2005) Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci* 47(3): 135-138.
9. Mjör IA (2009) Dentin permeability: The basis for understanding pulp reactions and adhesive technology. *Braz Dent J* 20(1): 3-16.
10. Keyes P (1958) Dental caries in the molar teeth of rats. *J Dent Res* 37(6): 1088-1098.
11. Voglino D, Pardiñas U, Teta P (2004) *Holochilus chacarius chacarius* (Rodentia, Cricetidae) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Mastozool Neotrop*, 11(2): 243-247.
12. Cossio-Bolanos M, Gomez-Campos R, Pilco-Quesada S, Lancho-Alonso J, de Arruda M (2012) Propuesta de una ecuación lineal para valorar la velocidad de crecimiento somático a partir de la masa corporal de ratas machos Wistar. *An Fac Med* 73(2): 93-100.
13. Bowen WH, Pearson SK (1993) Effects of the milk in the cariogenesis. *Caries Research* 27: 461-466.
14. Chung CS, Larson RH (1967) Factors and inheritance of dental caries in the rat. *J Dent Res* 46(3): 559-564.
15. Hinrichsen L, Di Masso R (2010) Empleo de un modelo murino original de Argentina en la caracterización de fenotipos complejos. *J Basic & Applied Genetics* 21(2): 1-12.
16. García Barbero J (1997) *Patología y Terapéutica Dental*. Editorial Síntesis; Madrid, España.
17. JOE Editorial Board (2008) Pulpal and periradicular diagnosis: an online study guide. *J Endod* 34(5 Suppl): 45-52.
18. Nucci L, Mardegan J, Aparecida E (2008) Action of Nitric Oxide on healthy and inflamed human dental pulp tissue. *Micron* 39: 797-801.