

# ENDODONCIA EXPERIMENTAL: BASES PARA LA COMPRENSIÓN DEL DOLOR POSTENDÓDONTICO Y SU ANALGESIA

Canzobre, Mariela C.

Cátedra de Histología y Embriología, Fac. de Odontología, U.B.A

Paganelli, Alejandra R. | Ríos, Hugo

Instituto de Biología Celular y Neurociencias "Prof. E. De Robertis". Fac. de Medicina. U.B.A

## INTRODUCCIÓN

En la práctica odontológica es común encontrarse con procesos inflamatorios relacionados con los tratamientos endodónticos. Sin embargo, conociendo el lugar que ocupa el dolor en la práctica odontológica no se comprende completamente la fisiopatología del dolor orofacial, a la vez que el tratamiento del dolor postendodóntico podría no ser el adecuado. (Sessle, 1987; Gerschman, 2000; Okuse, 2007; Spencer and Gremillion, 2007).

A pesar de los numerosos modelos experimentales y trabajos científicos desarrollados en los últimos años en el campo del dolor craneofacial (Sessle, 2000; Park et al, 2001; Sabino et al, 2002; Chudler and Byers, 2005), la endodoncia experimental es un modelo poco utilizado debido a la complejidad de la técnica. No obstante, un correcto manejo de la misma tiene una gran utilidad para estudiar la respuesta, no solo de los tejidos periapicales, sino también del sistema nervioso central (SNC) ya que la sensación displacentera que los animales manifiestan puede ser interpretada como dolor y cuya base neurofisiológica es la activación de la vía nociceptiva.

En la práctica odontológica, durante un correcto tratamiento de las afecciones pulpares, los materiales de obturación endodóntica se encuentran íntimamente relacionados con el ligamento periodontal a través del foramen apical (Mutoh and Tani-Ishii, 2011). Generalmente se produce una inflamación en el tejido conectivo (Kaplan et al, 2003) que induce un aumento en la presión hidrostática del ligamento periodontal. Este estado lleva a la compresión y por lo general a la activación, de las terminaciones nociceptivas A y C de las neuronas aferentes primarias (Marshall and Liesinger, 1993; Gotler et al, 2012).

Esta información sensorial proveniente del periodonto es transmitida al SNC por las ramas maxilar y mandibular del V par craneal generando la liberación de glutamato y sustancia P (SP) a nivel del subnúcleo caudal del trigémino (Vc)

Se describió en la literatura que el Vc topográficamente se divide en cinco láminas y que las proyecciones de las neuronas aferentes primarias, transmiten la información nociceptiva principalmente a las láminas superficiales haciendo sinapsis con neuronas de proyección o secundarias, ubicadas principalmente en la lámina I. Estas propagar la información hacia el tálamo y

hacia otras regiones del encéfalo, participando de la vía nociceptiva ascendente (Woda, 2003; Guy et al, 2005; Basbaum et al, 2009). Las neuronas de la lámina II (sustancia gelatinosa) del Vc, son consideradas interneuronas modulatorias locales importantes en el procesamiento de esta información nociceptiva. (Ichikawa et al, 1996; Craig, 2003; Guy et al, 2005; Sessle, 2005; Canzobre and Ríos, 2011).

Por lo tanto, el SNC de los mamíferos es capaz de cambiar sus funciones y estructuras en respuesta a los estímulos

## *A este tipo de fenómenos se los llama neuroplasticidad y suelen implicar modificaciones en los niveles intracelulares*

internos y externos. A este tipo de fenómenos se los llama neuroplasticidad y suelen implicar modificaciones en los niveles intracelulares de calcio ya sea en neuronas o en células de la glía (Miyamoto, 2006; Latremoliere and Woolf, 2009).

Las proteínas fijadoras de calcio (CaBPs) recibieron especial atención como marcadores selectivos de poblaciones neuronales. Ciertas CaBPs como calmodulina (CaM), calbindina (CB), calretinina (CR), parvalbumina (PV) o la familia de proteínas S100 presentes en astrocitos son consideradas funcionalmente buffers de

calcio. Son capaces de unirse al calcio libre, facilitando la regulación de ciertos mecanismos de homeostasis del calcio en las neuronas (Chard et al, 1993; Blatow et al, 2003; Barria and Malinow, 2005).

En muchas ocasiones, la activación postsináptica por entrada de calcio y posterior producción de mensajeros retrógrados como óxido nítrico (Sessle, 2005; Latremoliere and Woolf, 2009) o incluso aquellos circuitos que involucran a la glía (Vernadakis, 1996; Magistretti, 2006; Alvarez and Sabatini, 2007; Okada-Ogawa et al, 2009; Canzobre and Ríos, 2011) son disparadores de cambios plásticos de largo plazo.

Las modificaciones estructurales y funcionales de los circuitos locales no glutamatérgicos, como por ejemplo el sistema opioide (Kumamoto et al, 2011), no quedan excluidos del concepto de plasticidad y analgesia. El tramadol es un opioide sintético clínicamente usado que actúa como analgésico a nivel del SNC (Kumamoto et al, 2011). Se sabe que el metabolito del tramadol presenta dos mecanismos de acción a nivel central. Un mecanismo corresponde al no opioide con afinidad por receptores monoaminérgicos que inhibe la receptación de serotonina y noradrenalina aumentando así, el efecto inhibitorio de las mismas. Por otro lado, como agonista opioide con afinidad por receptores tipo  $\mu$ , bloquea la transmisión de las aferencias primarias glutamatérgicas por hiperpolarización e inhibición de canales de calcio presinápticos, generando en su conjunto una disminución en la concentración del calcio intracelular (Minami et al, 2007) y posiblemente modificaciones en las proteínas fijadoras del mismo como por ejemplo la calbindina.

Por lo tanto, el objetivo general del presente trabajo fue contribuir al esclarecimiento de los circuitos locales del subnúcleo caudal del trigémino, involucrados en el desarrollo de las sensaciones dolorosas provenientes de la clínica endodóntica y su tratamiento

farmacológico mediante opioides.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Estudiar la expresión de la proteína fijadora de calcio calbindina D28k, para profundizar en el comportamiento celular de las neuronas del núcleo espinal del trigémino y su relación con la vía nociceptiva.
- Estudiar el efecto analgésico de drogas de acción central (opioides) y su relación con la expresión de calbindina D28k y la enzima óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn)

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

18 ratas Wistar hembras, de 50 días (peso alrededor de 140-170 gr) y divididos en un grupo control, un grupo experimental con endodoncia (E) y un grupo experimental con endodoncia y tramadol (E/T). Los animales experimentales fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de ketamina (100 mg/kg) y xilazina (14 mg/kg) y se les realizó el tratamiento endodóntico unilateral en el primer molar inferior izquierdo, utilizando un método y una longitud de trabajo previamente estandarizado por nuestro laboratorio en 4 mm (Canzobre and Ríos, 2010; Canzobre and Ríos, 2012). Para la preparación apical de los conductos radiculares mesial y distal, se instrumentó mediante el pasaje de limas K desde el calibre 10 hasta el 25 (Dentsply-Maillefer, Suiza), intercalando lavajes con solución de hipoclorito de sodio al 2.5%. Después de secar con conos de papel estéril, los conductos se obturaron con conos de gutapercha (SureEndo - Excel Dental Supplies Ltd.) y cemento de Grossman (Farmadental) mediante la técnica de condensación lateral. Cada cavidad fue sellada con cemento. En el grupo E/T se aplicó 50mg/kg de tramadol por vía subcutánea a las 0, 24 y 48 horas postendodoncia. Los animales fueron controlados hasta su eutanasia a los 7 días. Después del primer día postoperatorio, todos los animales experimentales volvieron al comportamiento habitual, incluyendo

la alimentación. **IMAGEN 1 (Pág. 16)**

Todos los hemimaxilares también fueron disecados, fijados y radiografiados. Luego se descalcificaron en EDTA/PBS al 10% durante 5 semanas y fueron incluidos en Paraplast (Sigma-Aldrich).

Se realizaron cortes (10µm) longitudinales buco-linguales de la raíz mesial y distal del primer molar inferior izquierdo. Los cortes se colorearon con hematoxilina-eosina para analizar el grado de lesión periapical y la extensión del proceso inflamatorio (**Fig. 1 - Pág. 16**).

La mitad de los animales por grupo fueron utilizados para estudios inmunohistoquímicos y el resto de los animales se utilizaron para el análisis de las proteínas mediante electroforesis e inmunotransferencia (Western Blot). Para la técnica inmunohistoquímica los animales fueron perfundidos transcárdicamente (Gonzalez Aguilar and De Robertis, 1963).

Los troncos encefálicos se disecaron y se congelaron a -20o C para poder realizar cortes transversales del SNC (30 µm) con criostato (Fig. 3) desde el nivel C4 hasta -5,6 (Paxinos and Watson, 2007) y recolectarlos en buffer fosfato salino (PBS) para llevar a cabo nuestro protocolo de la técnica inmunohistoquímica por flotación (Canzobre and Ríos, 2011). Para la inmunomarcación se utilizaron los Anticuerpos primarios anti-calbindina D28k monoclonal (Swant Immunochemicals, 1:1000), y nNOS monoclonal (Sigma-Aldrich, 1:1000).

Para la técnica de Western Blot, los animales fueron decapitados y los troncos encefálicos ipsilaterales y contralaterales (desde los niveles c4 hasta -5.6) fueron seccionados rápidamente y homogeneizados, según la técnica usada y descrita por nuestro laboratorio (Fosser et al, 2013).

La membrana se incubó por 48hs. con distintos anticuerpos primarios

previo bloqueo inespecífico con suero normal de cabra. Los anticuerpos usados fueron: anti- calbindina D28k monoclonal (Swant Immunochemicals, 1:1000), nNOS monoclonal (Sigma- Aldrich, 1:1000) y anti-GAPDH monoclonal (Jackson; 1: 5000), este último como control interno.

Todos los preparados, fueron fotografiados en un microscopio óptico Zeiss Axiophot equipado con set de filtros epifluorescentes para FITC y rodamina. Las microfotografías fueron capturadas usando una cámara Olympus Q-Color 5. El análisis histomorfométrico se realizó

---

**[...] El  
tramadol  
no presenta  
acción  
periférica  
antiinflamatoria.**

---

en base a la inmunoreactividad y a los criterios morfológicos normales de las células analizadas en cada lado y en 3 niveles del subnúcleo caudal. Los datos se cuantificaron mediante el software Image Pro 6 (Media Cybernetics, Silver Springs, MD, USA) en un área de 0.01 mm<sup>2</sup> y se expresaron como media ± error estándar de la media (SEM).

Para el análisis estadístico se utilizó "Graph Pad Prism" (versión 5.03) mediante ANOVA de dos vías seguido de test de Bonferroni.

Para analizar el lado izquierdo (ipsilateral) y el derecho (contralateral) de cada corte del Vc (grupos pareados) se utilizó la prueba t de Student pareada. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa para valores de p<0,05.

**RESULTADOS**

Análisis histológico de los tejidos periapicales

En los animales del grupo control y en los hemimaxilares derechos (sin tratamiento) de los grupos experimentales, los primeros molares mostraron características histológicas normales en la pulpa, dentina, cemento, ligamento periodontal y cortical alveolar con el espacio periapical sano y conservado (**Fig. 1A - Pág16**).

Luego del tratamiento endodóntico en el primer molar inferior izquierdo se estudió la extensión del daño y la reacción inflamatoria (**Fig. 1B y C - Pág16**).

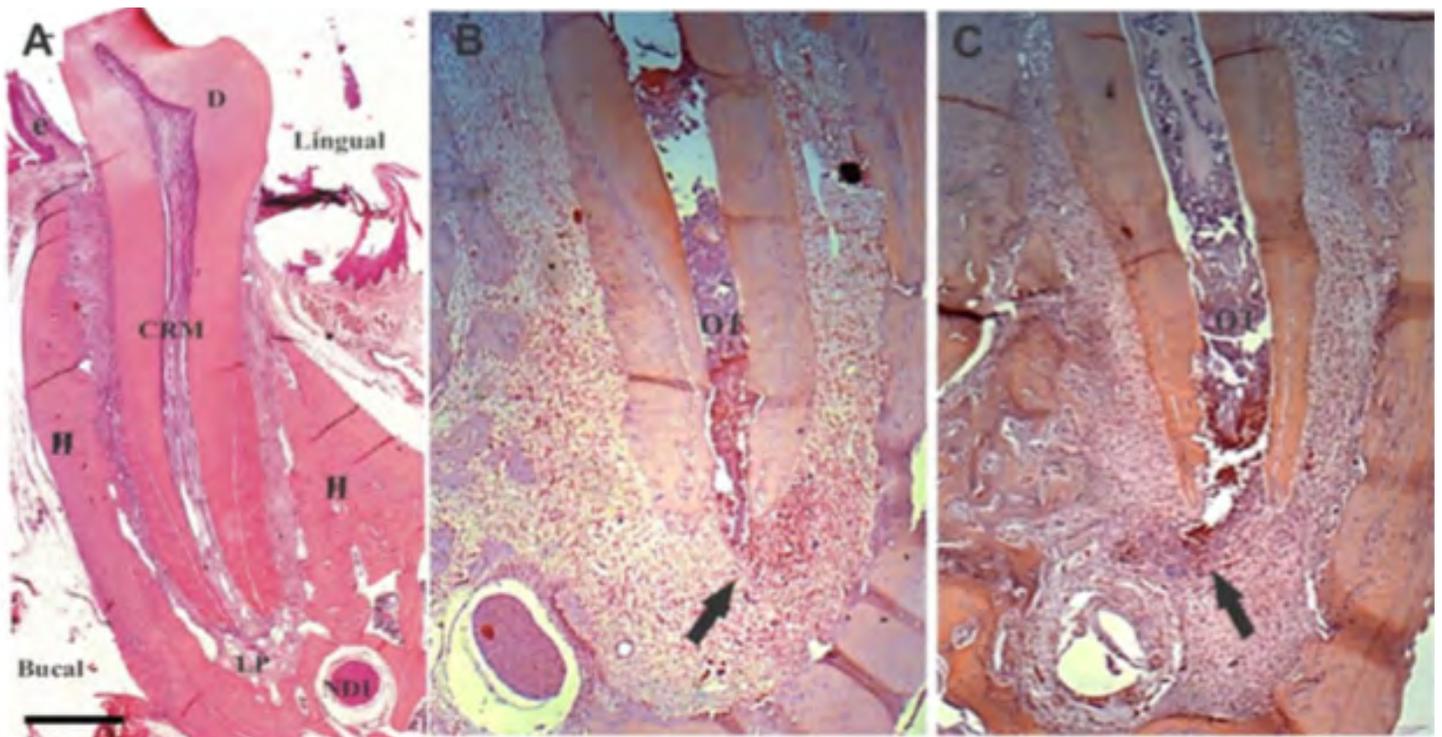
Todos los animales de los grupos experimentales (E y ET) mostraron una reacción periapical con infiltrado inflamatorio agudo en el tejido conectivo del ligamento periodontal en contacto con el material de obturación a los 7 días post endodoncia. Ambas reacciones inflamatorias son similares respecto al volumen y su histología. (Fig. 2A y B). Por lo tanto, inferimos que el tramadol no presenta acción periférica antiinflamatoria. Además se observa que esta reacción es acompañada por un ensanchamiento del espacio periapical posiblemente a expensas de la resorción de la cortical alveolar por observarse la presencia de osteoclastos activos (**Fig. 2C - Pág. 17**).

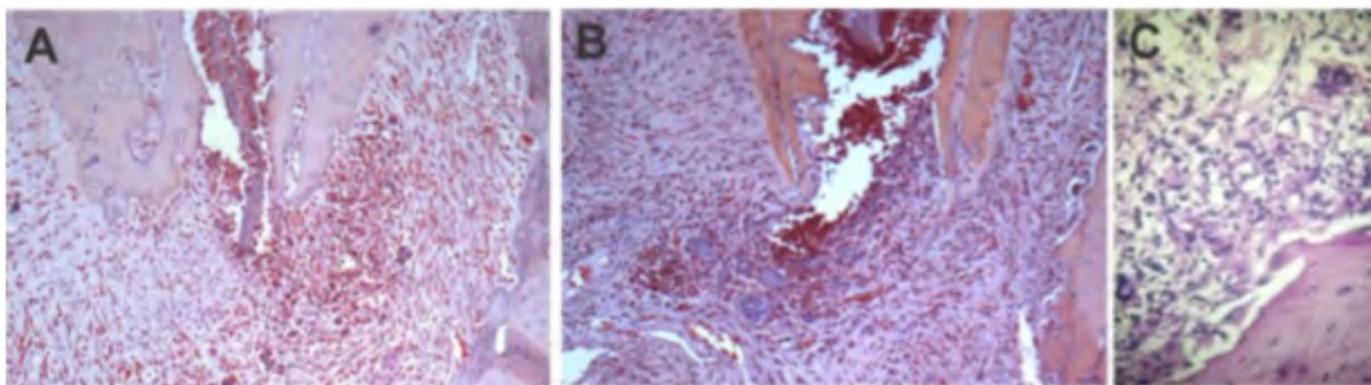
**FIG 1:** Cortes bucolinguales del primer molar inferior coloreadas con HyE. A: grupo control (CRM= canal radicular mesial, e= encía, D= dentina, H= hueso alveolar, LP= ligamento periodontal, NDI= nervio dentario inferior). Aumento 100x B: grupo experimental con endodoncia. C: grupo experimental endodoncia y tramadol. En ambos grupos experimentales se puede observar la obturación endodóntica (OT) en la raíz mesial, el ligamento periodontal levemente ensanchado por la inflamación aguda (flecha) generada por la técnica endodóntica, el hueso alveolar y el nervio dentario.

IMAGEN 1



FIG. 1



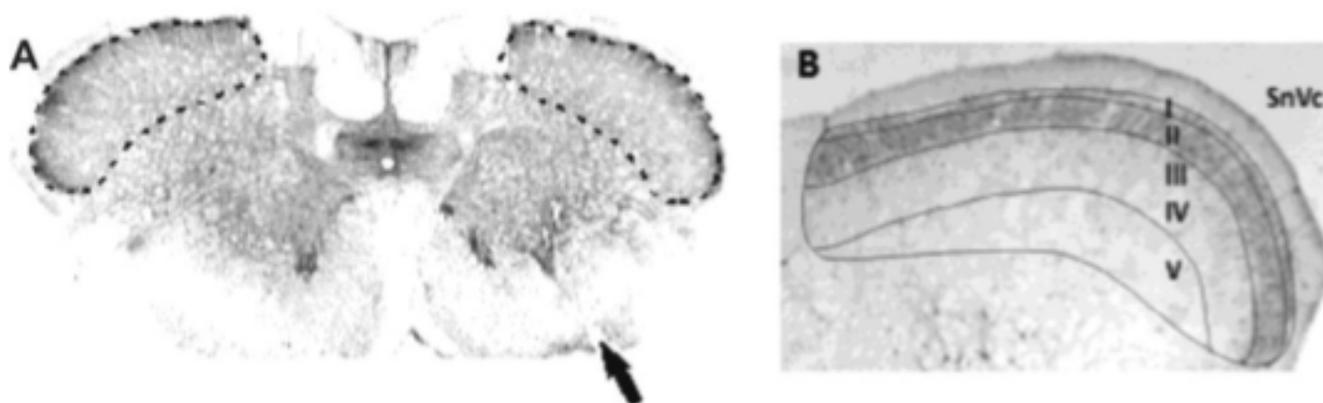


**FIG 2 A y B:**

A mayor aumento (400x) se observa el periápice, de los grupos experimentales y podemos ver que el tramadol no presenta acción antiinflamatoria sobre el infiltrado postendodóntico.

**C:** Imagen que muestra osteoclastos activos sobre la cortical ósea alveolar (1000x). Análisis de la expresión de calbindina-D28k en el subnúcleo caudal luego de la inflamación periapical y el uso de tramadol

Para determinar el número de células inmunorreactivas (IR) en las diferentes láminas de cada corte, se analizó la parte dorsal del Vc (Fig 3), dado que la rama mandibular del nervio trigémino proyecta a la región más dorsal del núcleo espinal del trigémino.

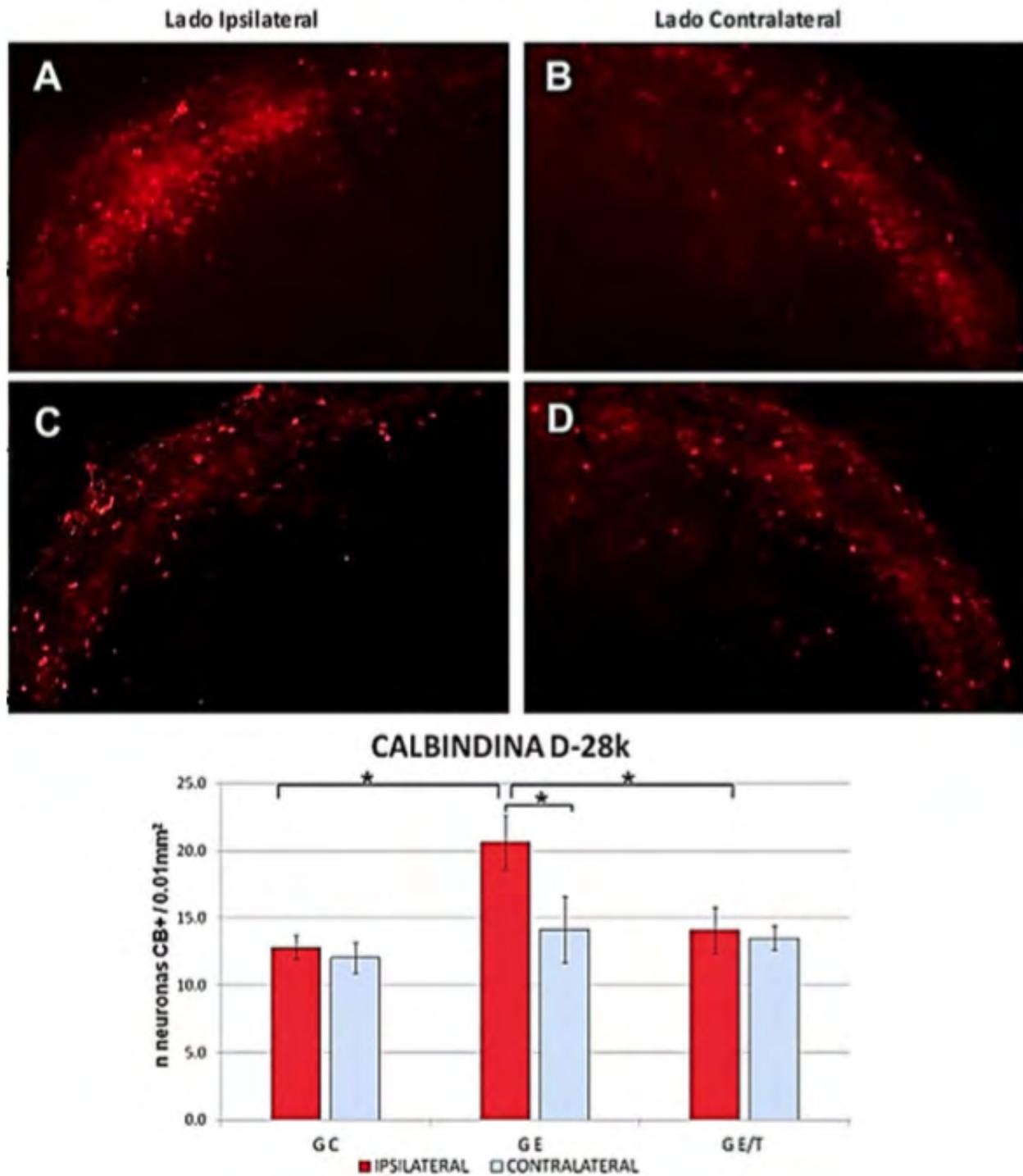


**FIG 3 A:** Corte representativo transversal del encéfalo. Las líneas punteadas delimitan el subnúcleo caudal del trigémino correspondiente al lado izquierdo (ipsilateral) y derecho (contralateral) marcado con una navaja (flecha).

**B:** Láminas del subnúcleo caudal del trigémino. I y II corresponden a las láminas superficiales (nociceptivas) En el grupo de animales control, la cantidad promedio de neuronas calbindina D28k positivas fue de  $12,83 \pm 0,86$  cel/área en el Vc izquierdo y de  $12,08 \pm 1,11$  cel/área en el derecho; no mostrando diferencias significativas.

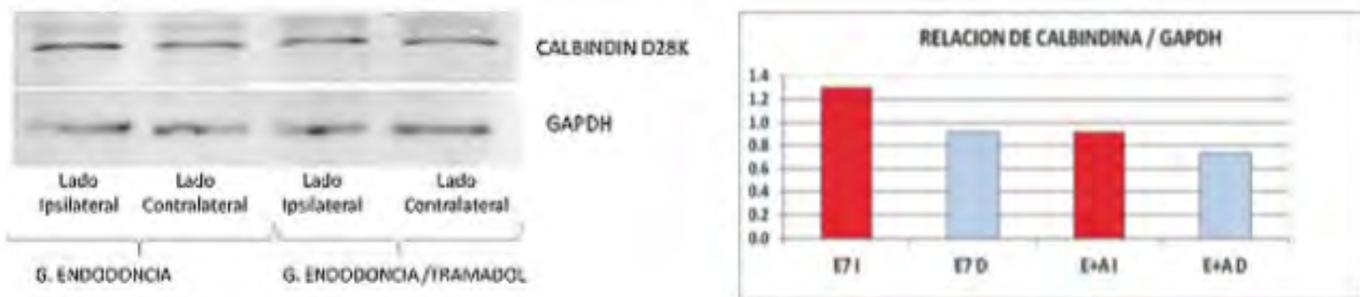
En el grupo experimental endodoncia, el Vc ipsilateral a la lesión mostró un mayor número de células CB  $20,61 \pm 2,03$  cel/área respecto al contralateral  $14,15 \pm 2,43$  cel/área con diferencias estadísticamente significativas  $p=0,03$  (prueba t pareada) y al grupo control (Anova).

Al analizar el grupo de endodoncia tratada con tramadol pudimos observar que en el lado ipsilateral las neuronas CB disminuyen significativamente ( $13,90 \pm 1,61$  cel/área) respecto al mismo lado del grupo experimental sin tramadol (Anova), llegando a niveles de expresión similares al del grupo control. (Fig.4). Estos datos fueron confirmados mediante Western blot (Fig.5).



**FIG 4:** Expresión de calbindina D28K en la zona dorsal del Vc izquierdo (ipsilateral) y derecho (contralateral) de ambos grupos experimentales. A y B: corresponden al grupo Endodencia.

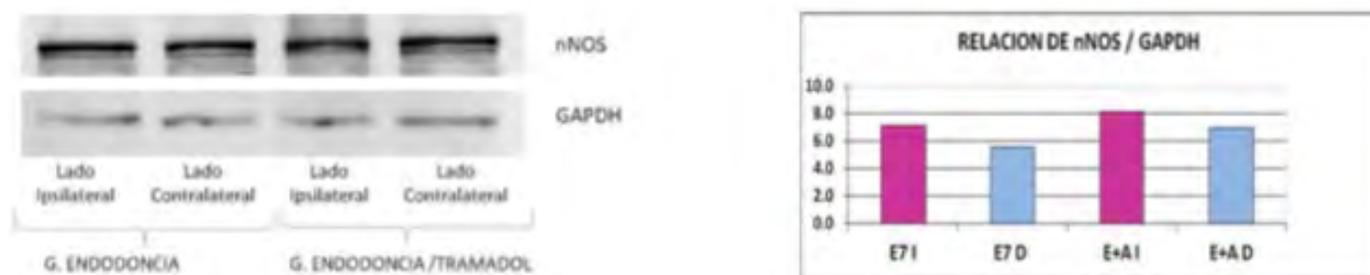
Se observa un aumento en el número de neuronas CB positivas luego de la endodencia. Sin embargo con el uso de tramadol (C y D), el número de neuronas que expresan CB se mantiene en niveles basales similares al lado contralateral y al grupo control como se muestra en el gráfico de barras. GC: grupo control, GE: grupo endodencia y GE/T: grupo endodencia tratado con tramadol. \*  $p < 0,05$ .



**FIG 5:** Western Blot que muestra la relación entre la expresión de la proteína calbindina D28K respecto a la proteína GAPDH usada como control interno en ambos grupos experimentales.

En el gráfico de barras se graficó esta relación para favorecer la interpretación de los resultados. Nótese que al usar el analgésico tramadol (E+A1) la concentración de la proteína calbindina (relación entre la DO observada de calbindina y la DO observada de la enzima GAPDH) disminuye respecto al grupo endodoncia (E7I) Lado ipsilateral/izquierdo; barras rojas; lado contralateral/derecho: barras celestes.

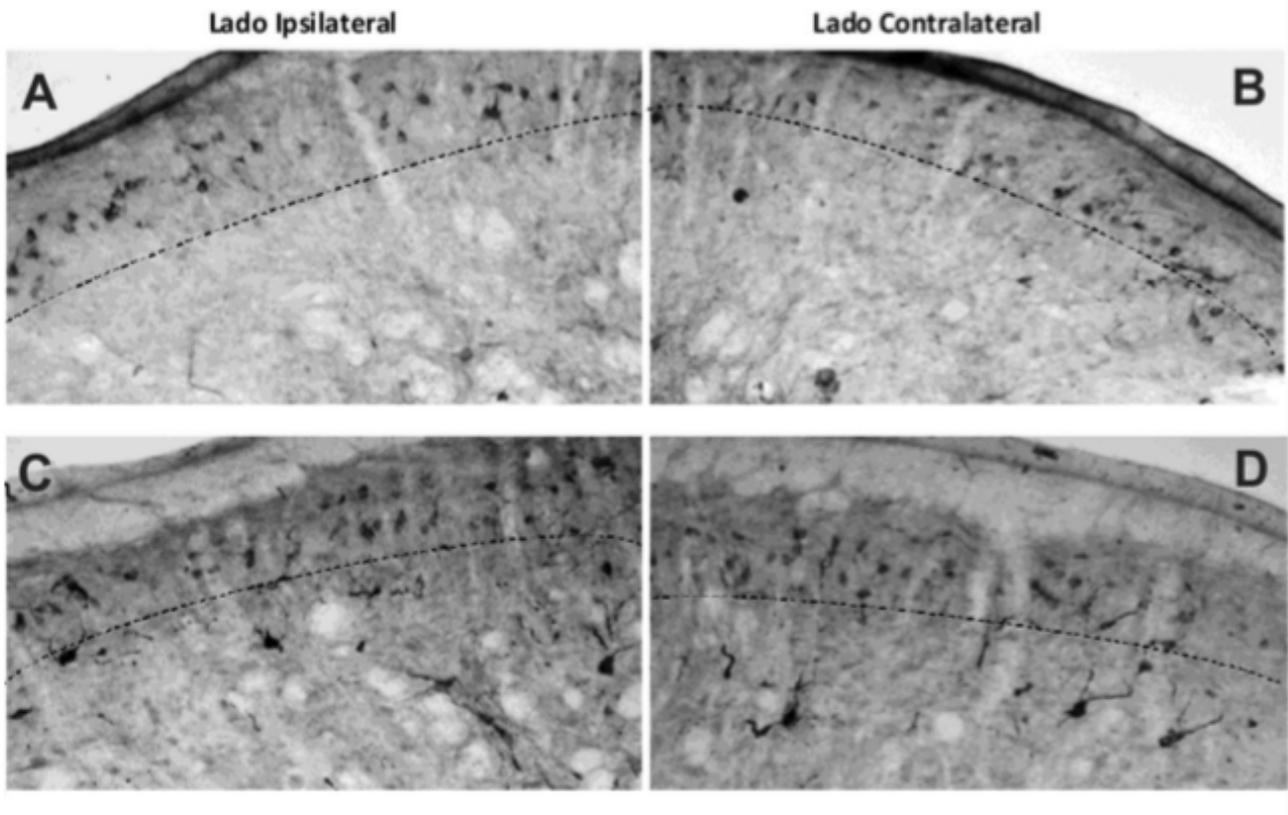
Con el fin de comprobar si el tratamiento con tramadol puede modificar la activación de la vía nitrérgica en el subnúcleo caudal, también se analizó mediante esta técnica de inmunotransferencia, la proteína óxido nítrico sintasa neuronal (NOSn). Los resultados mostraron mayor carga proteica en grupo endodoncia/tramadol respecto del grupo endodoncia. Para el control de carga se empleó la proteína GAPDH. (Fig. 6).



**FIG 6:** Western Blot y gráfico de barras que muestra la relación entre la expresión de la proteína NOSn respecto a la proteína GAPDH usada como control interno en ambos grupos experimentales. Nótese que al usar el analgésico tramadol (E+A1) la relación aumenta respecto al grupo endodoncia (E7I) (Barras violetas). Lado ipsilateral/izquierdo: barras violetas; lado contralateral/derecho: barras celestes.

Dado que a diferencia de calbindina, con NOSn se observó un aumento de la expresión en el grupo que recibió tramadol respecto de grupo endodoncia, analizamos la expresión de NOS neuronal mediante inmunohistoquímica para identificar este posible aumento en los distintos niveles del Vc en ambos grupos experimentales (Fig. 7).

Pudimos observar que este aumento en la expresión de NOSn parece estar relacionado con la presencia de neuronas positivas en láminas más profundas III y IV del grupo tratado con tramadol y que no se alcanzan a observar en el grupo al que solo se le realizó la endodoncia.



**FIG 7:** Expresión de NOS neuronal en la zona dorsal del Vc izquierdo y derecho de ambos grupos experimentales. A y B: corresponden al grupo Endodoncia. C y D: corresponden al grupo Endodoncia y tramadol. La línea punteada indica aproximadamente el límite entre las láminas superficiales (I-II) y las láminas profundas (III-IV) del Vc. Nótese un mayor número de neuronas nNOS positivas luego del tratamiento con tramadol en las láminas profundas (III a IV) respecto al grupo que solo recibió endodoncia.

## DISCUSIÓN

Los procedimientos involucrados en el tratamiento endodóntico, producen reacciones inflamatorias transitorias sobre el ligamento periodontal (Cohen, S., Burns, R. *Vías de la Pulpa*. 7o ed. Mosby, España, 1999; Ingle, J. y Bakland, L. *Endodoncia*, 4o. ed. Ed. McGraw-Hill. México, 1996).

Sin embargo, pueden perpetuarse en caso de que el irritante que las produzca no sea eliminado, lo cual puede suceder en el caso de algunos cementos endodónticos que poseen liberación sostenida de componentes tóxicos, como el eugenol o el formaldehído. Los selladores endodónticos son colocados en los conductos

radiculares recién mezclados, por lo que durante un período después de la aplicación clínica, el material provoca respuestas inflamatorias locales debido a los componentes reactivos (Soares et al, 1990; Leonardo et al, 1998).

Se considera que la respuesta inflamatoria es similar en todas partes del organismo y las diferencias radican en la región corporal donde ocurre el proceso. A nivel del periodonto la respuesta inflamatoria se desarrolla en el espacio periapical, delimitado por cemento y el hueso alveolar, que por ser tejidos mineralizados e inextensibles otorgan características muy particulares a las periodontitis, especialmente en lo que se refiere a la respuesta dolorosa.

Por lo recientemente expuesto el dolor postendodóntico debe considerarse como una parte integral del tratamiento endodóntico en pacientes, siendo importante comprender la vía nociceptiva orofacial y elegir el tratamiento analgésico adecuado. Datos bibliográficos demuestran que los roedores manifiestan una respuesta inflamatoria periapical similar a los humanos (Murazabal et al, 1966; Yu and Stashenko, 1987; Akamine et al, 1994), por lo cual consideramos que el tratamiento endodóntico en ratas es un buen modelo experimental para estudiar las respuestas biológicas y el sistema nociceptivo orofacial.

Nuestro laboratorio desde el año 2011 comenzó a emplear el modelo

de endodoncia experimental para analizar cambios en la expresión de diferentes proteínas presentes en neuronas y células gliales en el subnúcleo caudal del trigémino (Vc) como consecuencia de una inflamación postendodóntica periodontal.

En trabajos previos ya habíamos demostramos un incremento en el número de neuronas calbindina-D28K inmunoreactivas (CB) en el Vc del lado ipsilateral en respuesta a la apertura de la cámara pulpar y describimos diferentes subtipos de neuronas CB según su morfología y distribución en las láminas superficiales o profundas del Vc.

En el presente trabajo, y en concordancia con nuestros resultados previos y los de otros investigadores (Ma et al, 2005; Egea et al, 2011) también observamos un incremento de neuronas CB-IR luego de la activación de la vía nociceptiva post tratamiento endodóntico.

Para evaluar si estos cambios plásticos observados en el Vc son reversibles en presencia de una droga analgésica tratamos a los animales experimentales con un opioide sintético, tramadol.

Este opioide tiene ventajas en la clínica ya que presenta menor riesgo de desarrollar dependencia respecto a otros opioides, probablemente relacionado con su menor afinidad por los receptores que la morfina (Mattia and Coluzzi, 2005). Su mecanismo de acción requiere de un segundo mecanismo relacionado con la inhibición de la recaptación de monoaminas (Minami et al, 2007).

Nuestros resultados luego del tratamiento con tramadol, muestran una disminución en la expresión de calbindina, con el consiguiente aumento del calcio iónico (Chard et al, 1995).

Según datos de la bibliografía, su metabolito M1 por activación de receptores opioides inhibe la liberación de glutamato desde las neuronas

aferentes primarias C y A luego de una lesión periférica (Kumamoto et al, 2011).

Si bien, los autores no encontraron una acción directa del M1 sobre los receptores glutamatérgicos (NMDA) de las neuronas postsinápticas podemos inferir que al disminuir el glutamato hay una menor activación de la vía nociceptiva y probablemente menor número de neuronas (de proyección o interneuronas) que expresan calbindina D28k en el Vc ipsilateral como demostramos en nuestros resultados.

Asimismo, estudiamos el sistema nitrérgico en el cual la activación de receptores por acción de agonistas opioides, induce un incremento en los niveles de ARNm NOS y en la expresión de NOS neuronal, estimulando la producción del neuromodulador óxido nítrico (Cury et al, 2011).

En un estudio previo nuestro grupo demostró que el óxido nítrico participa en la sensibilización central de la vía nociceptiva (Canzobre and Ríos, 2011). Sin embargo, en el presente trabajo observamos que con el uso de tramadol la expresión de nNOS en las láminas III y IV aumenta.

Esto concuerda con la controversial teoría del doble rol del óxido nítrico en la transmisión (hiperalgésico) o control (analgésico) del dolor (Cury et al, 2011). Estos resultados nos impulsan a continuar con el estudio del sistema nitrérgico luego del uso de drogas terapéuticas que podrían actuar como inhibidoras de la vía nociceptiva.

Actualmente estamos analizando otros mecanismos celulares del circuito nociceptivo, asociados a la astrogliá y circuitos neuronales que involucran a los neurotransmisores GABA y serotonina, los que nos permitirán mejorar nuestros conocimientos del mecanismo analgésico del tramadol.

---

**AGRADECIMIENTOS:**

***Este trabajo contó  
con subsidios de  
la Universidad***

***de Buenos***

***Aires: UBACyT***

***20020120100006***

***y UBACyT***

***200201203000047.***

---

## REFERENCIAS

1. Akamine,A., Anan,H., Hamachi,T. & Maeda,K. (1994) A histochemical study of the behavior of macrophages during experimental apical periodontitis in rats. *J.Endod.*, 20, 474-478.
2. Alvarez,V.A. & Sabatini,B.L. (2007) Anatomical and physiological plasticity of dendritic spines. *Annu.Rev.Neurosci.*, 30, 79-97.
3. Barria,A. & Malinow,R. (2005) NMDA receptor subunit composition controls synaptic plasticity by regulating binding to CaMKII. *Neuron*, 48, 289-301.
4. Basbaum,A.I., Bautista,D.M., Scherrer,G. & Julius,D. (2009) Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-284.
5. Blatow,M., Caputi,A., Burnashev,N., Monyer,H. & Rozov,A. (2003) Ca<sup>2+</sup> Buffer Saturation Underlies Paired Pulse Facilitation in Calbindin-D28k-Containing Terminals. *Neuron*, 38, 79-88.
6. Canzobre, M. C. and Rios, H. Experimental Endodontics: Expression of calbindin in neurons of the trigeminal subnucleus caudalis. *J Dent Res* 91, 55. 2012.
7. Canzobre,M.C. & Ríos,H. (2010) Pulpar tooth injury induces plastic changes in S100B positive astroglial cells in the trigeminal subnucleus caudalis. *Neuroscience Letters*, 470, 71-75.
8. Canzobre,M.C. & Ríos,H. (2011) Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate/neuronal nitric oxide synthase-positive neurons in the trigeminal subnucleus caudalis involved in tooth pulp nociception. *Journal of Neuroscience Research*, 89, 1478-1488.
9. Chard,P.S., Bleakman,D., Christakos,S., Fullmer,C.S. & Miller,R.J. (1993) Calcium buffering properties of calbindin D28k and parvalbumin in rat sensory neurones. *J.Physiol*, 472, 341-357.
10. Chard,P.S., Jordan,J., Marcuccilli,C.J., Miller,R.J., Leiden,J.M., Roos,R.P. & Ghadge,G.D. (1995) Regulation of excitatory transmission at hippocampal synapses by calbindin D28k. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 5144-5148.
11. Chudler,E.H. & Byers,M.R. (2005) Behavioural responses following tooth injury in rats. *Arch.Oral Biol.*, 50, 333-340.
12. Craig,A.D. (2003) PAIN MECHANISMS: Labeled Lines Versus Convergence in Central Processing. *Annual Review of Neuroscience*, 26, 1-30.
13. Cury,Y., Picolo,G., Gutierrez,V.P. & Ferreira,S.H. (2011) Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric.Oxide.*, 25, 243-254.
14. Egea,J., Malmierca,E., Rosa,A.O., del Barrio,L., Negredo,P., Nuñez,A. & López,M.G. (2011) Participation of calbindin-D28K in nociception: results from calbindin-D28K knockout mice. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology*, 463, 449-458.
15. Fossier,N.S., Ronco,L., Bejarano,A., Paganelli,A.R. & Ríos,H. (2013) Calbindin-D28k and calcitonin in chicken inner retina during postnatal development and neuroplasticity by dim red light. *Devel Neurobio*, n/a.
16. Gerschman,J.A. (2000) Chronicity of orofacial pain. *Ann.R.Australas.Coll.Dent.Surg.*, 15, 199-202.
17. Gonzalez Aguilar,F. & De Robertis,E. (1963) A formalin-perfusion method for histophysiological study of the central nervous system with the electron microscope. *Neurology*, 13, 758-771.
18. Gotler,M., Bar-Gil,B. & Ashkenazi,M. (2012) Postoperative Pain after Root Canal Treatment: A Prospective Cohort Study. *International Journal of Dentistry*, 2012.
19. Guy,N., Chalus,M., Dallel,R. & Voisin,D.L. (2005) Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *Eur.J.Neurosci.*, 21, 741-754.
20. Ichikawa,H., Deguchi,T., Fujiyoshi,Y., Nakago,T., Jacobowitz,D.M. & Sugimoto,T. (1996) Calbindin-D28k-immunoreactivity in the trigeminal ganglion neurons and molar tooth pulp of the rat. *Brain Res.*, 715, 71-78.
21. Kaplan,A.E., Ormaechea,M.F., Picca,M., Canzobre,M.C. & Ubios,A.M. (2003) Rheological properties and biocompatibility of endodontic sealers. *Int.Endod.J.*, 36, 527-532.
22. Kumamoto,E., Mizuta,K. & Fujita,T. (2011) Opioid Actions in Primary-Afferent Fibers: Involvement in Analgesia and Anesthesia. 4.
23. Latremoliere,A. & Woolf,C.J. (2009) Central Sensitization: A Generator of Pain Hypersensitivity by Central Neural Plasticity. *The Journal of Pain*, 10, 895-926.
24. Leonardo,M.R., Almeida,W.A., da Silva,L.A. & Utrilla,L.S. (1998) Histological evaluation of the response of apical tissues to glass ionomer and zinc oxide-eugenol based sealers in dog teeth after root canal treatment. *Endod.Dent Traumatol.*, 14, 257-261.
25. Ma,W.L., Zhang,W.B., Feng,G. & Cai,Y.L. (2005) Calbindin D28k-containing neurons in the paratrigeminal nucleus receive convergent nociceptive information and project to nucleus of the solitary tract in rat. *Brain Res*, 1038, 132-140.
26. Magistretti,P.J. (2006) Neuron-glia metabolic coupling and plasticity. *J.exp.Biol.*, 209, 2304-2311.
27. Marshall,J.G. & Liesinger,A.W. (1993) Factors associated with endodontic posttreatment pain. *Journal of Endodontics*, 19, 573-575.
28. Mattia,C. & Coluzzi,F. (2005) tramadol. Focus on musculoskeletal and neuropathic pain. *Minerva Anestesiol.*, 71, 565-584.
29. Minami,K., Uezono,Y. & Ueta,Y. (2007) Pharmacological aspects of the effects of tramadol on G-protein coupled receptors. *J Pharmacol.Sci*, 103, 253-260.
30. Miyamoto,E. (2006) Molecular Mechanism of Neuronal Plasticity: Induction and Maintenance of Long-Term Potentiation in the Hippocampus. *Journal of Pharmacological Sciences*, 100, 433-442.
31. Murazabal,M., Erasquin,J. & Devoto,F.H. (1966) A study of periapical overfilling root canal treatment in the molar of the rat. *Arch.Oral Biol.*, 11, 373-383.

32. Mutoh,N. & Tani-Ishii,N. (2011) A biocompatible model for evaluation of the responses of rat periapical tissue to a new zinc oxide-eugenol sealer. *Dental Materials Journal*, 30, 176-182.
33. Okada-Ogawa,A., Suzuki,I., Sessle,B.J., Chiang,C.Y., Salter,M.W., Dostrovsky,J.O., Tsuboi,Y., Kondo,M., Kitagawa,J., Kobayashi,A., Noma,N., Imamura,Y. & Iwata,K. (2009) Astroglia in medullary dorsal horn (trigeminal spinal subnucleus caudalis) are involved in trigeminal neuropathic pain mechanisms. *J Neurosci.*, 29, 11161-11171.
34. Okuse,K. (2007) Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 490-496.
35. Park,S.J., Chiang,C.Y., Hu,J.W. & Sessle,B.J. (2001) Neuroplasticity induced by tooth pulp stimulation in trigeminal subnucleus oralis involves NMDA receptor mechanisms. *J.Neurophysiol.*, 85, 1836-1846.
36. Paxinos,G. & Watson,C. (2007) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates* Academic Press.
38. Sessle,B.J. (1987) Neurophysiology of orofacial pain. *Dent.Clin.North Am.*, 31, 595-613.
37. Sabino,M.A., Honore,P., Rogers,S.D., Mach,D.B., Luger,N.M. & Mantyh,P.W. (2002) Tooth extraction-induced internalization of the substance P receptor in trigeminal nucleus and spinal cord neurons: imaging the neurochemistry of dental pain. *Pain*, 95, 175-186.
39. Sessle,B.J. (2000) Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. *Crit Rev.Oral Biol.Med.*, 11, 57-91.
40. Sessle,B.J. (2005) Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. *Minerva Anesthesiol.*, 71, 117-136.
41. Soares,I., Goldberg,F., Massone,E.J. & Soares,I.M. (1990) Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. *Journal of Endodontics*, 16, 166- 169.
42. Spencer,C.J. & Gremillion,H.A. (2007) Neuropathic orofacial pain: proposed mechanisms, diagnosis, and treatment considerations. *Dent.Clin.North Am.*, 51, 209-24, viii.
43. Vernadakis,A. (1996) Glia-neuron intercommunications and synaptic plasticity. *Prog.Neurobiol.*, 49, 185-214.
44. Woda,A. (2003) Pain in the trigeminal system: from orofacial nociception to neural network modeling. *J Dent.Res.*, 82, 764-768.
45. Yu,S.M. & Stashenko,P. (1987) Identification of inflammatory cells in developing rat periapical lesions. *Journal of Endodontics*, 13, 535-540.