

EVALUACIÓN EXPERIMENTAL DE LA COLÁGENA TIPO I DE CERDO VS HIDRÓXIDO DE CALCIO EN LA FORMACIÓN DE PUENTES DENTINARIOS

Enrique Pérez-Guarneros¹
Higinio Arzate²

RESUMEN

Los procesos reparativos del tejido pulpar y la formación de puentes dentinarios de la pulpa expuesta, han sido estudiados extensamente. En estos estudios se ha observado que el problema principal en el tratamiento de la pulpa es estimular la capacidad regenerativa y reparativa de los odontoblastos sin destrucción del tejido, o formación excesiva de tejido duro.

En el recubrimiento pulpar con hidróxido de calcio se presenta la formación de puentes dentinarios. Esta formación dentinaria es iniciada por la acción de un agente irritante (hidróxido de calcio) el cual provoca una necrosis superficial y estimula la llegada de células inflamatorias aguda para controlar y eliminar el agente irritante; en una segunda fase inicia el proceso de reparación, por medio de la migración y proliferación celular con la formación de colágena tipo I y la formación de la cicatriz en el sitio de la lesión, lo cual es una característica del hidróxido de calcio. Por otro lado, existen antecedentes que apoyan la utilización de colágena tipo I de cerdo como material de recubrimiento pulpar, ya que se menciona que es un biomaterial que posee actividad osteo-conductora que permite el establecimiento de una matriz adecuada para la migración y proliferación celular, acelerando el proceso de reparación formando parte del proceso natural de recuperación del tejido y evitando el proceso inflamatorio. El objetivo de este estudio es determinar la efectividad de la colágena tipo I de cerdo en la formación de puentes dentinarios, en comparación con el hidróxido de calcio. Se utilizó colágena tipo I de cerdo vs hidróxido de calcio, los cuales fueron usados como materiales de recubrimiento pulpar en 36 dientes de perro. Ambos materiales fueron colocados en contacto con el tejido pulpar en cavidades clase V con heridas pulpares hechas para tal propósito, colocando una capa de metilcelulosa entre el material de recubrimiento y la curación final a base de IRM para evitar la mezcla entre los materiales. Los dientes tratados fueron observados por examinación histomorfológica y estructural después del recubrimiento pulpar por 7, 14, 21, 28, 40 y 60 días. Después de 14 días se observó una masa de tejido dental y células de tejido reparativo en los dientes tratados con ambos materiales. Después de 28 días, los puentes dentinarios se formaron y aparecieron células degeneradas con la colágena tipo I de cerdo, mientras que con hidróxido de calcio continuaba la masa amorfa de tejido. A los 40 y 60 días se pudieron observar puentes dentinarios densos bien formados con la colágena tipo I, mientras que con hidróxido de calcio continúa la formación de material amorfo. Nuestros resultados sugieren que el uso de la colágena tipo I de cerdo como material de recubrimiento pulpar es más eficaz y promueve la formación de dentina reparativa mejor que el hidróxido de calcio sin irritación del tejido pulpar.

Palabras Claves: *Dentina, pulpa dental, moléculas bioactivas, recubrimiento pulpar, colágena tipo I.*

Experimental evaluation of the pig's collagen type I vs calcium hydroxide on the dental bridges formation

SUMMARY

The reparative processes of the pulp tissue and dental bridges formation of the exposed pulp have been studied widely. In these studies it has been observed that the main problem in the treatment of the pulp is to stimulate the regenerative and reparative capacity of the odontoblast cells without destruction of tissue, or excessive formation of hard tissue.

In the pulp capping with calcium hydroxide, the formation of dental bridges is observed. This dentinal formation begun by the action of an irritating agent (calcium hydroxide) which causes a superficial necrosis and it stimulates the arrival of inflammatory cells to control and to eliminate the irritating agent; in a second phase it begins the reparative process, through of the migration and cellular proliferation with the production of collagen through type I and the formation of the scar in the place of the lesion, which is characteristic of the calcium hydroxide. On the other hand, there are studies that support the use of pig's collagen type I like pulp capping material, since it is a biomaterial that possesses inducible osteogenic activity that allows the establishment of an appropriate for the migration and cellular proliferation, accelerating the natural repair process of the tissue recovery and avoiding the inflammatory process. To determine the effectiveness of pig collagen type I in the formation of dental bridges, in comparison with calcium hydroxide. Pig collagen type I vs calcium hydroxide were used as materials for pulp capping in 36 dog teeth. Both materials were placed in contact with the pulp tissue in cavities class V with wounded pulps made for such purpose, placing a methylcellulose layer between the capping material and the final cure with the help of IRM to avoid the mixture of materials. The treated teeth were analyzed by histomorphological and structural examination after the pulp capping for 7, 14, 21, 28, 40 and 60 days. After 14 days it was observed a mass of dental tissue and cells of reparative tissue in the teeth treatment with both materials. After 28 days, the dentinal bridges were formed and degenerate cells appeared with the collagen pig's type I, while with calcium hydroxide the amorphous mass of tissue continued. At the 40 and 60 days dense dentinal bridges could be observed formed with the collagen type I, while with calcium hydroxide the formation of amorphous material continued. Our results suggest that the use of pig's collagen type I material for pulp capping is more effective and it promotes the formation of reparative dentine better than the calcium hydroxide without irritation of the pulp tissue.

Key Words: *Dentin, Pulp dentin, bioactive molecules, Pulp capping, Collagen type I.*

ARTÍCULO RECIBIDO EL 31 DE ENERO DEL 2006 Y ACEPTADO EL 03 DE AGOSTO DEL 2006.

¹Lab. de Inmunología, U. de Invest. Multidisciplinaria, FES Zaragoza, UNAM.

²Lab. de Biología Molecular, U. de Posgrado, Fac. de Odontología, UNAM.

INTRODUCCIÓN

Los procesos reparativos del tejido pulpar y la formación de puentes dentinarios de la pulpa expuesta, ha sido investigado ampliamente, en ellas, se ha observado que el problema principal en el tratamiento de la pulpa, es estimular la capacidad regenerativa y reparativa de los odontoblastos, sin degeneración del tejido o formación excesiva de tejido duro.

Es a través de un recubrimiento pulpar directo, con productos que contienen hidróxido de calcio principalmente u otros agentes de recubrimiento pulpar; que se presenta la formación de un puente dentinario, producido a través de dentina irritativa, la cual es una característica de la curación de la pulpa dental¹.

La necrosis provocada por el hidróxido de calcio causa la irritación pulpar y estimula a las células pulpares a defenderse y reparar.

Por esta razón, se busca la aplicación de materiales para uso dental biocompatibles con el tejido pulpar, en especial con la matriz dentinaria, el cual, evite el proceso inflamatorio que produce el hidróxido de calcio, ya que al tener un pH mucho más alcalino que el tejido pulpar vital, y en lugar de fomentar la formación de un puente dentinario de baja calidad, y tomando en consideración que en muchas de las ocasiones también induce a la degeneración pulpar, a través de la irritación del tejido, este sea parte del proceso natural de regeneración de los odontoblastos, mediante la producción de tejidos duros de mayor calidad.

Todo esto, con la finalidad, de dar una mejor oportunidad de recuperación a la pulpa ya irritada por un proceso bacteriano, derivado de los microorganismos formadores de caries y los desechos que producen e irritan al odontoblasto.

La utilización de colágena tipo I de cerdo, como material de recubrimiento del tejido pulpar, ha llamado últimamente la atención, debido a que sus funciones biológicas poseen excelentes propiedades “*in vivo*” como material de implantes, membranas de regeneración y como inductor de la formación ósea.

En procesos de reparación de defectos óseos, mostró capacidad de formación ósea con reemplazo del tejido fibroso²⁻⁵.

En tejido pulpar, se ha visto que induce la formación de dentina reparativa, provocando una respuesta fibroblástica estimulada por la invasión angiogénica de osteopontina-1 y la fibronectina que se unen a las fibras procolágeno que se están produciendo, alterando la cinética de formación de fibrillas en la matriz pericelular, teniendo como resultado tejido pulpar nuevo, por un proceso de neo-formación de tejido parecido al original⁶.

Razón por la cual es finalidad de este estudio, la utilización de bio-materiales como la colágena tipo I de cerdo en las exposiciones pulpares, materiales que tienen la capacidad de inducir los

mecanismos que inician la regeneración del tejido, además de sustituir a los odontoblastos dañados, y controlar y acelerar los procesos inflamatorios, reduciendo los tiempos de recuperación del tejido, para devolverle su capacidad de respuesta, conservando sus propiedades biológicas y neurofisiológicas, traduciéndose todos estos eventos, en una mayor eficacia en la protección pulpar, de la colágena tipo I de cerdo, que el hidróxido de calcio⁶⁻⁸.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se llevó a cabo un estudio experimental en 36 dientes de perros, de raza mestiza de la misma edad, sexo, peso y alojados para cumplir cuarentena y estandarizar alimentación basándose en alimento balanceado a base de croquetas Proplan^{MR}.

En cada perro las arcadas fueron divididas en cuadrantes formando cuatro cuadrantes (superior, inferior, derecho e izquierdo) en donde en cada cuadrante se seleccionaron 3 dientes (12 dientes en total para cada grupo) para el estudio, dejándose los caninos como grupo control sin tratamiento; los 2º premolares como tratamiento (A) hidróxido de calcio y el tratamiento (B) los 1º molares de cada cuadrante para colágena tipo I de cerdo.

Cada espécimen fue sedado (con una dosis de atropina como preanestésico) a una dosis de 0.45 mg./Kg. I.V.; hidrocloreuro de xilazina 0.5mg- 1.0 mg./Kg IM. y pentobarbital sódico 55mg/Kg. IV.

En todos los dientes de cada grupo se prepararon cavidades clase V bucal con una fresa de carburo bola de ½ mm SS White, una pieza de mano de baja velocidad e irrigación con agua destilada resultando una exposición pulpar con destrucción de la capa odontoblástica, para evitar la contaminación con la saliva del perro se realizó aislamiento absoluto.

La hemostasis fue realizada con torundas de algodón estériles y la exposición pulpar fue cubierta para el grupo control solo con metilcelulosa e IRM; y con hidróxido de calcio en polvo mezclado con agua bidestilada y colágena tipo I (Aspid) respectivamente en los grupos con tratamiento A y B.

Las cavidades fueron selladas con una delgada capa metilcelulosa e IRM (Caulk^{MR}) para evitar la mezcla de los materiales en estudio.

Bajo anestesia, los perros fueron perfundidos con una solución de azul de metileno al 1% y paraformaldehído al 4%, para permeabilidad dentinaria, posteriormente los dientes se fijaron en esta misma solución por espacio de 4 hrs.

Los perros fueron sacrificados a intervalos de 2, 4 y 8 semanas obteniéndose muestras dentarias de 7, 14, 21, 28, 40 y 60 días.

Los dientes fueron desmineralizados en EDTA al 10% pH 8.0 a 4°C y agitación durante cuatro semanas, posteriormente lavados en agua destilada y deshidratados en concentraciones

VERTIENTES

ascendentes de alcohol etílico 25%, 50%, 75%, 100% y clareados en Xílol al 100% finalmente las muestras fueron orientadas y embebidas en parafina.

Se obtuvieron secciones de 6 micras de manera longitudinal, y transversal incluyendo el ápice y teñidas con Hematoxilina y Eosina.

Los cortes histológicos realizados fueron evaluados determinando los cambios ocurridos en los dientes tratados con colágena tipo I de cerdo e hidróxido de calcio comparándolos entre sí, y poder establecer las diferencias morfológicas y de formación dentinaria entre ellos, comparándolos a su vez con el grupo control.

Para el diseño estadístico se utilizó el programa SPSS versión 12.0 y se calcularon porcentajes para χ^2 con un nivel de confianza del 95%.

RESULTADOS

Las observaciones microscópicas de las exposiciones pulpares en los dientes controles desde el 7 a los 60 días postoperatorios, revelaron una dentina irritativa amorfa y discontinua. Esto confirma la validez del modelo para evaluar la formación de dentina irritativa (reparativa) como consecuencia de la acción de diferentes bio-materiales.

En los grupos experimentales con tratamiento A (hidróxido de calcio) y tratamiento B (colágena tipo I de cerdo), la formación de dentina reparativa se llevó a cabo hasta la consolidación y mineralización en ambos casos.

En estos grupos (A y B), la formación de dentina reparativa se llevó a cabo una dentinogenesis completa. Sin embargo, basados en los resultados obtenidos, el porcentaje de dientes que presentaron formación de tejido, fue mayor con la colágena tipo I de cerdo⁸⁻¹⁰ (cuadro 1 y gráfico 1).

El cuadro muestra la frecuencia y el porcentaje de respuesta después de la aplicación de la colágena tipo I de cerdo y el hidróxido de calcio donde se puede observar que la colágena tipo I de cerdo tiene mejor respuesta * $p < 0.05$.

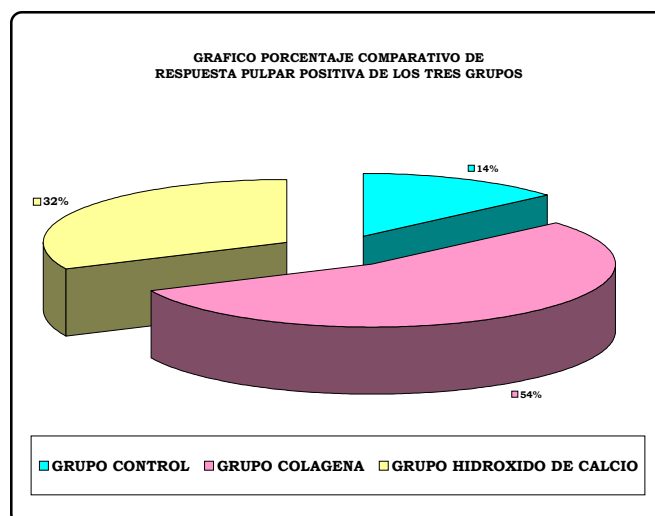


Gráfico 1. Muestra el porcentaje de respuesta pulpar a los diferentes materiales.

En las observaciones histológicas encontramos diferencias importantes en la velocidad de formación, calidad y regeneración del tejido pulpar.

En el tratamiento A.- Se trataron 12 dientes con hidróxido de calcio; el primer efecto sobre las células pulpares fue, la destrucción y necrosis. Observándose en esta zona un edema debido a la presión aplicada y la presión del edema de la zona adyacente, más tarde la zona mostró edema y licuefacción resultando una lesión química con zonas de coagulación y necrosis, llegada de células vasculares e inflamatorias de migración y proliferación para controlar y eliminar el agente irritante que en este caso es el propio hidróxido de calcio¹¹⁻¹³.

Al 7º día, se observa la formación de una capa de colágena adyacente a la zona de necrosis con focos de mineralización en el fondo de la capa haciéndose más homogénea en contacto con tejido vital (Figura. 1 y 2).

Al día 15 se observa aún tejido necrótico, amorfo con infiltrado inflamatorio, crónico, migración y proliferación de células pulpares mesenquimatosas y endoteliales con aumento en la formación de colágena, así como la formación de la cicatriz. (Figura 3.)

Grupo experimental	Frecuencia		Total = 36 (100%)
	No Formo N=15	Si Formo N=21	
Grupo control	9	3	
Porcentaje	75.0%	25.0%	
Trat. A (Hidróxido de calcio)	5	7	
Porcentaje	41.7%	58.3%	
Trat. B (Colágena)	1	11	
Porcentaje	7.7%	92.3%	

Cuadro 1. Formación dentina reparativa por grupo experimental.

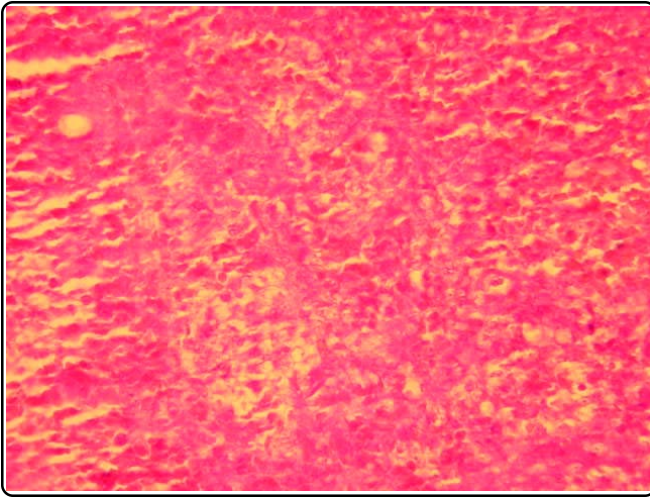


Figura 1. Se observa tejido inflamado.

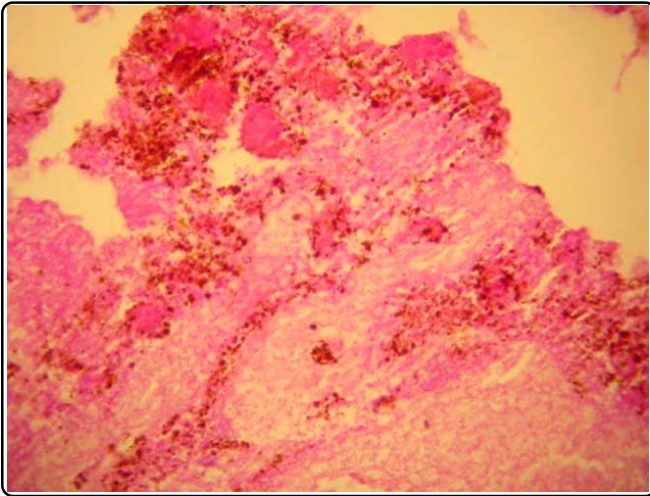


Figura 2. Respuesta inflamatoria aguda y necrosado por acción del hidróxido de calcio. Hiperemia pulpar clásica.

Asimismo, a los 30 días postoperatorios se encontró una barrera consistente de tejido parecido a la predentina en unión con células parecidas a odontoblastos y un infiltrado crónico con una capa de predentina bien definida con abundantes fibras de colágena.

Al día 40, la zona de necrosis pulpar desapareció y en su lugar se encontró tejido parecido a dentina y tejido pulpar bien vascularizado. En algunos especímenes, se encontraron fragmentos de tejido necrótico con formación predentinaria y algunos vasos.

Al día 60, se observó tejido dentinario en dos capas una primera de tejido irregular de dentina bien mineralizada con pocos tubos dentinarios y una línea de nuevos odontoblastos¹³⁻¹⁴.

Cabe mencionar que en el 40% de los dientes tratados con hidróxido de calcio se observó solo infiltrado inflamatorio crónico y fragmentos de tejido necrótico (Figura 4 y Gráfico 2). En el tratamiento B, los 12 dientes tratados con colágena tipo I de cerdo, encontramos que el 90% de los dientes tratados

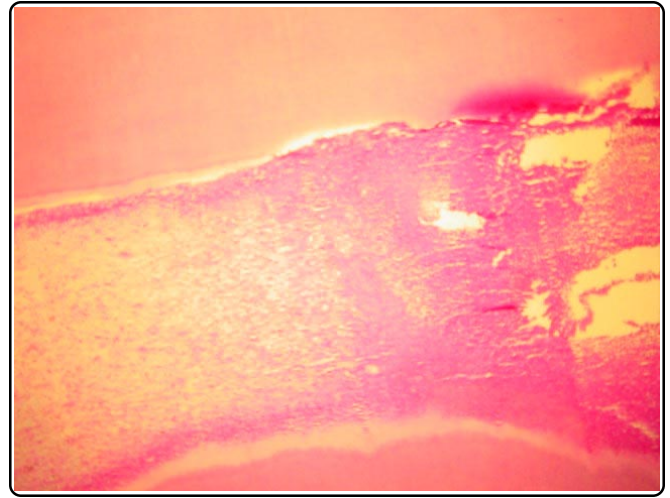


Figura 3. Se observa: 1. La zona de la cavidad de acceso con restos de hidróxido de calcio. 2. Zona de necrosis amplia y severa en la superficie del corte; 3. La reparación en zonas más profundas con formación de dentina reparativa en la zona.

presentaron un grado mayor de formación del tejido pulpar desde el 7° día hasta el 15° día postoperatorio que los dientes tratados con hidróxido de calcio ($p < 0.05$).

En esta fase, se observó tejido pulpar normal con tejido parecido a la predentina, células parecidas a odontoblastos y capa de tejido conjuntivo laxo bien vascularizado con fibroblastos y escasas células inflamatorias con tejido apical conservado.

En los días 40 y 60 se observó tejido conjuntivo fibroso denso, fibroblastos y numerosos vasos sanguíneos con formación de dentina bien mineralizada y pocos túbulos dentinarios. El tejido pulpar normal con su capa de células odontoblasticas.

Al finalizar el período experimental la histología del tejido dental fue muy similar en ambos grupos, pero en los dientes en donde se colocó colágena tipo I de cerdo, la formación de dentina se

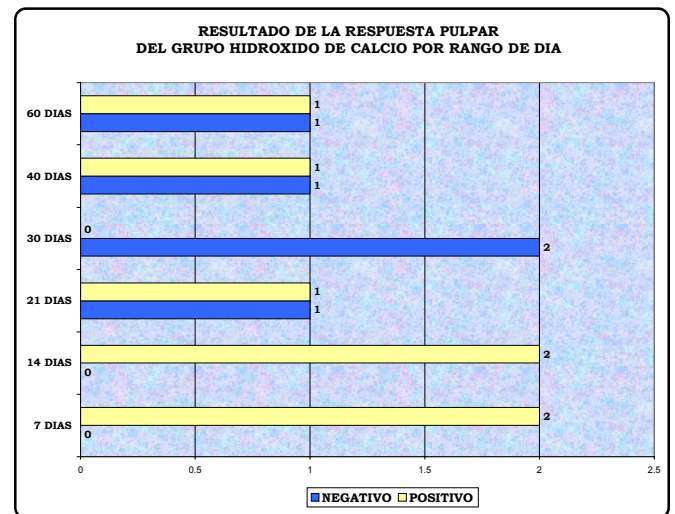


Gráfico 2. Se puede observar el tipo de respuesta a la aplicación del hidróxido de calcio.

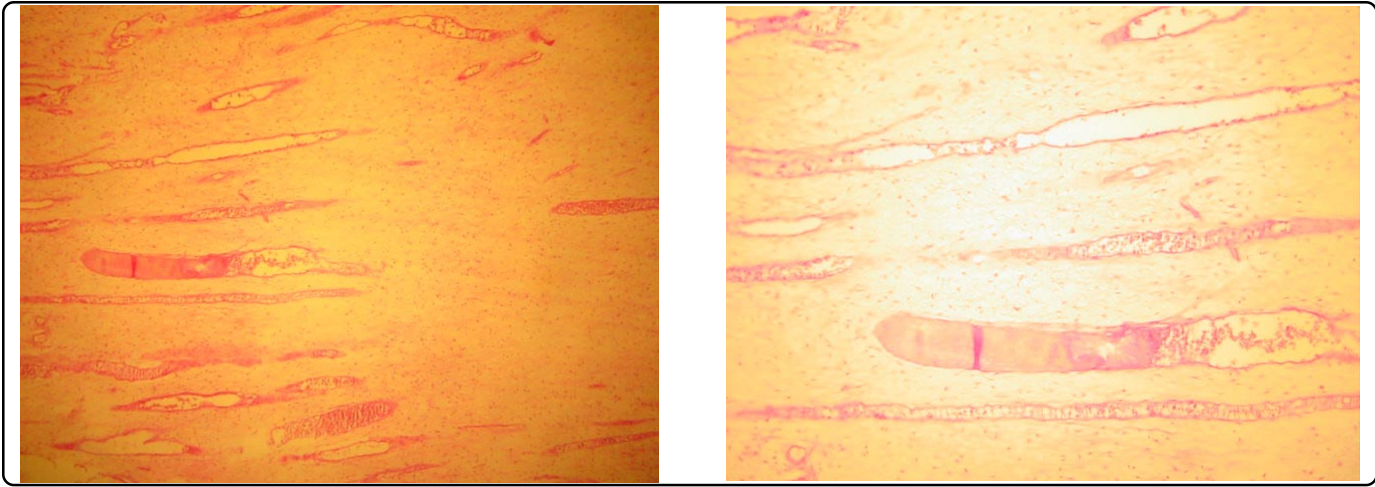


Figura 4. En estas figuras se puede observar el proceso inflamatorio del tejido conectivo pulpar.

observa más densa cuando se compara con el grupo de hidróxido de calcio. Lo cual hace pensar, tomando en consideración la información hasta ahora existente, que la colágena tipo I de cerdo favorece la migración de moléculas inmunoreactivas como la osteopontina y osteonectina acelerando el proceso de reparación dentinaria¹⁵⁻¹⁷ (Cuadro 2) (Figura 5 y 6).

Estadísticamente se pudo comprobar que existe diferencia en los porcentajes de formación de tejido en los dientes tratados en los tres grupos, ($p < 0.05$).

La colágena tipo I de cerdo, demostró tener un 90% mayor grado de efectividad en la formación de tejido (Ver cuadro 1) que el hidróxido de calcio como puede observarse en el gráfico (3 y 4)¹⁷⁻¹⁹.

DISCUSIÓN

La regeneración, es un proceso biológico durante el cual ocurren una serie de procesos en secuencia, que dan lugar a la formación completa de estructuras complejas.

Hidróxido de calcio	Colágena tipo I de cerdo
<p>1ª fase: Destrucción y necrosis. Edema y licuefacción del tejido. Zonas de coagulación Presencia de cel. Inflamatorias agudas.</p>	<p>1ª fase: Formación de tejido amorfo. Expresión de glicoproteínas de alto peso molecular con capacidad inductiva como OPN, OCN y FN.</p>
<p>2ª fase: Células inflamatorias crónicas y síntesis de colágena con formación de la cicatriz.</p>	<p>2ª fase: Expresión de MEC, migración y proliferación de células formadoras de dentina. Mineralización del tejido.</p>

Cuadro 2. Efectos de la colágena tipo I de cerdo e hidróxido de calcio.

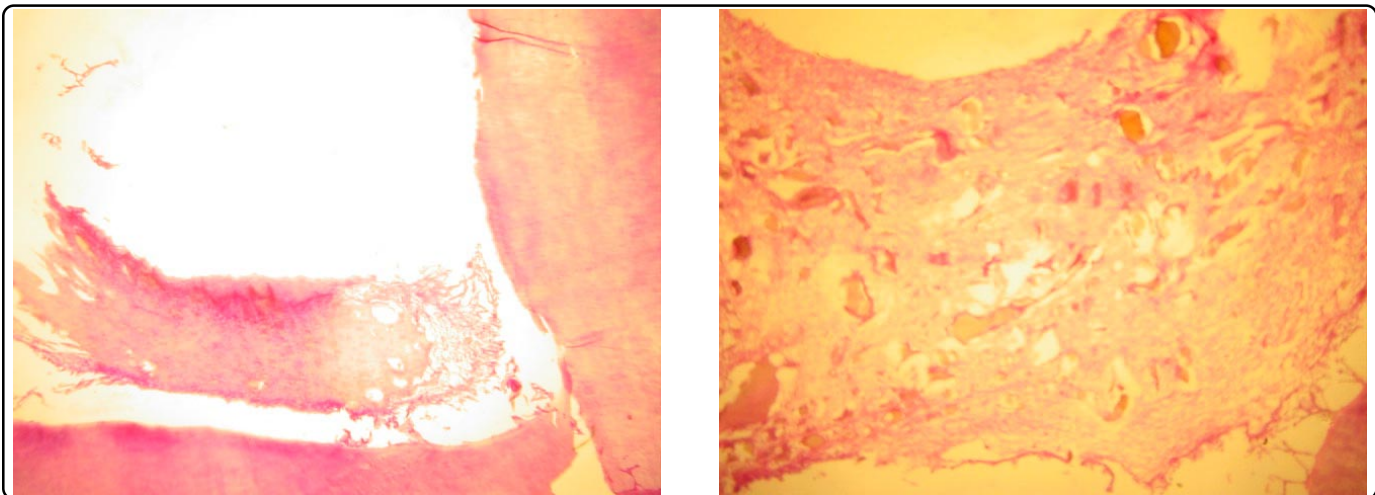


Figura 5. Formación de puente dentinario con aplicación de colágena tipo I de cerdo y reparación del tejido con sugerencia de mineralización.

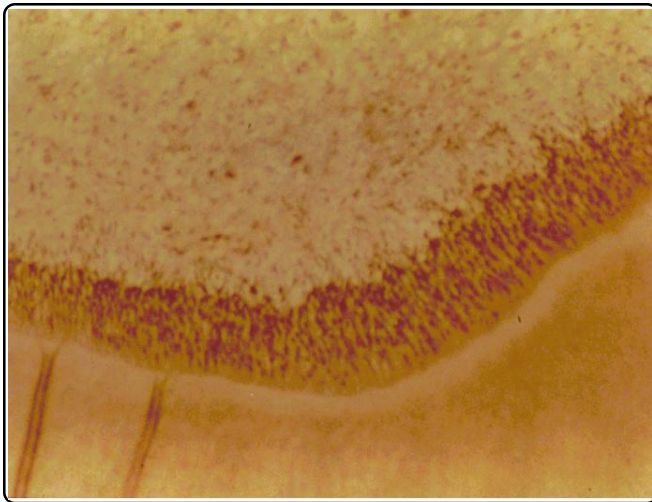


Figura 6. Reparación del tejido pulpar corte a 60 días.

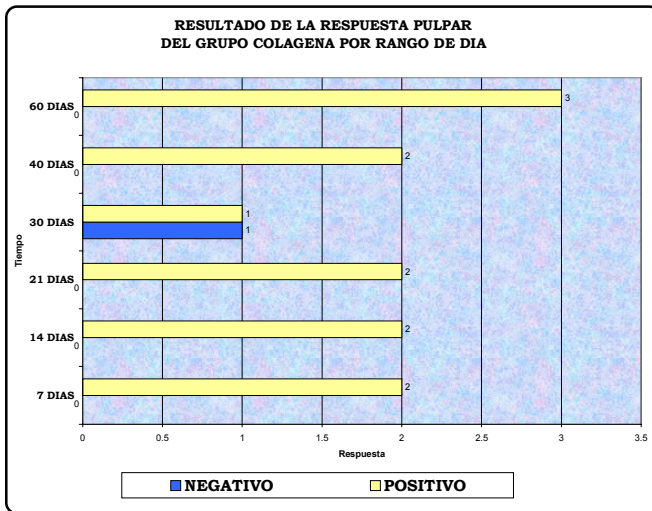


Gráfico 2. Se puede observar el tipo de respuesta a la aplicación del hidróxido de calcio.

En el caso de la dentina, la regeneración se lleva a cabo mediante señales de moléculas inmunoreactivas como: ONC, OPN y FN. Por tanto, en este estudio, la colágena tipo I de cerdo e hidróxido de calcio son considerados como materiales con capacidad osteoconductiva, esto es que permiten el establecimiento de todas las condiciones ambientales para la regeneración pulpar, tales como: la presencia de una matriz extracelular adecuada que favorece la invasión y migración de células progenitoras formadoras de dentina, que surgen de las zonas cercanas a la lesión pulpar²⁰⁻²⁴.

Sin embargo, la respuesta del tejido pulpar, a la colágena tipo I de cerdo, aceleró la formación de tejido dentinario promoviendo a la vez la expresión de glicoproteínas de alto peso molecular como la fibronectina, que tienen un papel importante en la regulación de la adhesión, migración y diferenciación celular durante el desarrollo y reparación del tejido, puesto que es bien conocido que la diferenciación de las células que forman la matriz dentinaria (odontoblastos) es controlada por señales específicas

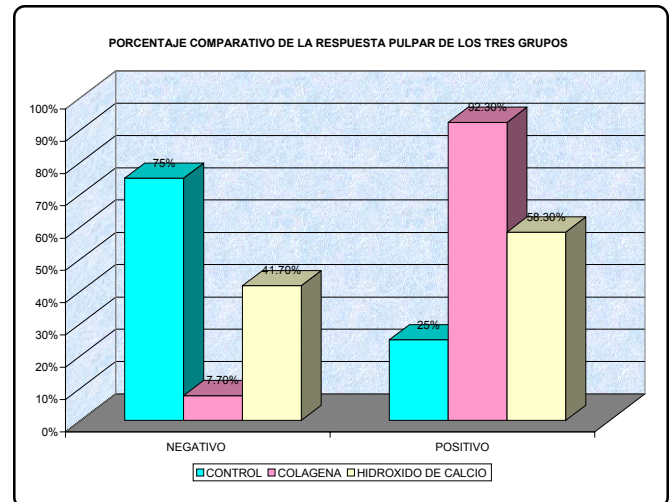


Gráfico 2. Se puede observar el tipo de respuesta a la aplicación del hidróxido de calcio.

de las interacciones entre la matriz dentinaria y células mesenquimatosas ($p \neq 0.05$), en comparación con hidróxido de calcio cuya respuesta reparativa es debido a señales inductivas no específicas que parecen ser mediadas por un aumento progresivo de la síntesis de fibronectina en las células pulpares, en la elaboración de la matriz fibrosa parecida a dentina, durante las reacciones defensivas de la pulpa²⁵⁻³⁰.

El efecto inicial del hidróxido de calcio en pulpas expuestas, es el desarrollo de una superficie de necrosis. El efecto benéfico del hidróxido de calcio, es considerado como resultado de una lesión química causada por iones hidróxido, limitada por una zona de necrosis en el tejido vital, y la tolerancia a los iones Ca^{++} por el tejido.

La secuencia observada de estas reacciones del tejido, es similar al tejido lesionado; en donde la secuencia inicia, con la migración y proliferación de células vasculares e inflamatorias, para controlar y eliminar el agente irritante; seguido del proceso de reparación, incluyendo la migración y proliferación de células endoteliales y mesenquimatosas pulpares con formación de colágena³¹⁻³⁵.

La mineralización de la colágena, inicia con una calcificación distrófica en la zona de necrosis y la capa de células degeneradas en el tejido adyacente, llevando minerales a la colágena nuevamente formada. La presencia de iones Ca^{++} provoca la precipitación de carbonato de calcio en el área de la herida y por ello contribuye al inicio de la mineralización³⁶⁻⁴⁰.

Esta forma de respuesta pulpar, se basa en el pH y la liberación de iones hidróxido y iones calcio. Por ello podemos decir que, los factores que afectan la recuperación y reestablecimiento del tejido pulpar son: el grado de inflamación, el tiempo de irritación e infección y la localización de la exposición.

En contraste con la respuesta a la colágena tipo I de cerdo es

importante hacer notar que esta acelera la formación de tejido dentinario, al estimular la expresión de moléculas que favorecen la formación de matriz dentinaria, lo que sugiere que la colágena tipo I de cerdo podría formar una matriz más adecuada; que favorece la invasión y migración de células progenitoras formadoras de dentina, establece señales específicas y el medio adecuado para la expresión de moléculas que aceleran la síntesis de matriz dentinaria de las células de reemplazo del tejido dañado, formando parte del proceso natural de recuperación del tejido, sin pasar por el proceso inflamatorio en comparación con lo obtenido con el hidróxido de calcio⁴¹⁻⁴⁵.

Finalmente, también podemos concluir que existe diferencia significativa entre los porcentajes de los grupos y que el tiempo y la calidad de la dentina reparativa para la formación de puentes dentinarios es diferente en los tres grupos⁴⁶.

CONCLUSIONES

Se sabe que la colágena tipo I de cerdo, forma un gel a 37 °C, y esto favorece la formación más rápida de la matriz extracelular y la expresión de moléculas como las proteínas morfogénicas de hueso (BMP), a expensas de las cuales inicia el proceso de formación y depósito de dentina⁴⁷⁻⁵⁰.

En cambio, el hidróxido de calcio forma una mezcla de cemento que provoca una reacción similar, pero a expensas de la zona de necrosis, el efecto benéfico del hidróxido de calcio es considerada como resultado de una lesión química, causada por los iones hidroxilo, limitada por una zona de necrosis en el tejido vital, y la tolerancia de iones calcio por el tejido⁵¹⁻⁵⁴.

Tomando en consideración los resultados obtenidos de este estudio, y a través de la comprensión de los distintos procesos biológicos que involucran la reparación y protección del tejido pulpar y considerando que el uso de estos biomateriales como la colágena tipo I de cerdo, tienen potencial de uso en el tratamiento de cavidades expuestas para la protección pulpar, ya que evitan los efectos dañinos de los distintos cementos de hidróxido de calcio, y conservan la integridad del tejido y la pared dentinaria a través, de una dentinogénesis reparativa⁴²⁻⁴⁶.

Se sugiere la aplicación terapéutica de esponjas de colágena tipo I de cerdo en el tratamiento de lesiones pulpares para la conservación de tejido pulpar vital, así como la terapia de conductos radiculares para el sellado del canal radicular. Estableciendo que puede ser el siguiente paso en la clínica dental como un parte aguas entre los tratamientos tradicionales y la nueva era de la estomatología moderna, que amplíe el horizonte en la conservación y regeneración de la pulpa dental y otros tejidos dentarios⁵⁵⁻⁵⁹.

BIBLIOGRAFÍA

- Oguntelo B R, Heaven T, Clark A E, Pink E.F. Quantitative assessment of dentin bridge formation following pulp-capping in miniature swine. *J. Endo* 1995; 21:79-82.
- Sena M, Yamashita Y, Nakano Y, Ohgaki M, Nakamura S, Yamashita K, Takagi Y. Octacalcium phosphate-based cement as a pulp-capping agent in rats. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2004; 97: 749-755.
- Heys D.R., Cox C.F., Heys R.J., Avery J.K. Histological considerations of direct pulp capping agents. *J Dent Res* 1981; 60:1371-1379.
- Tzaifas D, Kolokoris I. Inductive influences of desmineralized dentin and bone matrix on pulp Cells: an approach of secondary dentinogenesis. *J Dent Res* 1990; 69:75-81.
- Pereira J.C., Bramante C.M., Berberi A., Mondelli J. Effects of calcium hydroxide in powder or in paste form on pulp-capping procedures: histologic and radiographic analysis in dog's pulp. *Oral Surg* 1980; 50:176-186.
- Goldberg M., Smith A. J. Cells and extracellular matrices of dentin and pulp. A biological basis for repair and tissue engineering. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2004; 15:13-27.
- Schröder U. Effects of calcium hydroxide-containing pulp-capping agents on pulp cell migration proliferation, and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64 :541-548. The Biology of Dentin and Pulp Proceeding of an international Workshop at the University of North Carolina Charlotte, North Carolina.
- Horstedp., Attar El., Langeland K., Denmark A., Farmington. Capping of monkey pulps with dycal and a calcium-eugenol cement. *Oral Surg* 1981; 52: 531-553.
- Tzaifas D., Panagiotakopoulos N., Komnenou A. Immunolocalization of fibronectin during the early response of dog dental pulp to demineralized dentine or calcium hydroxide-containing cement. *Arch. Oral Biol* 1995; 40:23-31.
- Almazán D.A., de la Cruz G.J., Lira R.J., Arrelin G., Chimal M.J., Díaz L.L., Furuzawa C.J., Krötzch G. F., Investigación experimental de la regeneración ósea en fémures de rata después de la aplicación de colágena I polimerizada: Estudio radiológico, histológico e histoquímico. *Rev. Mex Ortop Traum* 1996;10:142-152.
- Asish K. Ghosh. Factors involved in the regulation of type I collagen gene expression: Implication in fibrosis. *Exp Biol and Med* 2002; 227: 301-314.
- Maglorie H., Joffre A., Bleicher F. An in vitro model of human dental pulp repair. *J. Dent Res* 1996; 75: 1971-1978.
- Rutherford B., Fitzgerald M. A new biological approach to vital pulp therapy. *Crit Rev in Oral Biol Med* 1995; 6:218-229.
- Dominguez M.S., Witherspoon D.E., Gutmann J.I., Opperman A. Histological and scanning electron microscopy assessment of various pulp-therapy materials. *J. Endodontics* 2003; 29: 324-333.
- Tzaifas D. Basic mechanisms of cytodifferentiation and dentinogenesis during dental pulp repair. *Int J Dev Biol* 1995 ; 39: 281-290.
- Schuurs AHB, Gruthuysen RJM, Wesslink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. calcium hydroxide. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16: 240-250.
- Lara V.S., Figueiredo F., da Silva T.A., Cunha F.Q. Dentin-induced in vivo inflammatory Response and in vitro activation of murine macrophages. *J Dent Res* 2003; 82: 460-465.
- Amemiya K., Kaneko Y., Muramatsu T., Shimono M., Inoue T. Pulp cell responses during hypoxia and reoxygenation in vitro. *Eur J*

Oral Sci 2003; 111: 332-338.

19. Kinney J.H., Habelitz S., Marshall S.J., Marshall G. W. The importance of intrafibrillar mineralization of collagen on the mechanical properties of dentin. *J Dent Res* 2003; 82: 957-961.

20. Golberg M., Six N, Decup F, Lasfargues JJ, salih E, Tompkins K, Veis A. Bioactive molecules and the future of pulp Therapy. *Am J Dent.* 2003 ; 16: 66-76.

21. Kuo MY, Lan WH, Lin SK, Tsai KS, Hahn Lj. Collagen gene expression in human dental pulp cell cultures. *Arch Oral Biol.* 1992 ; 37:945-952.

22. Palosaari H, tasanen K, Risteli J, Larmas M, Salo T, Tjäderhane L. Baseline expresión and effect of TGFbeta 1 on type I and III collagen mRNA and protein synthesis in human odontoblasts and pulp cells in vitro. *Calcif Tissue Int.* 2001; 68: 122-129.

23. Scarano A, Manzon L, Di Giorgio R, Orsini G, Tripodi D, Piattelli A. Direct capping with four different materials in humans: histological analysis of odontoblast activity. *J. Endo* 2003; 29: 729-734.

24. Kirk E, Lim KC, Khan M.O.G. A comparison of dentinogenesis on pulp capping with calcium hidroxide in paste and cement form. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 68: 210-218.

25. Aeinehchi M, Eslami B, Ghanbariha M, Saffar A. S. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod Journal* 2002; 36: 225-231.

26. Telles S, Hanks, Machado, Nör J.E. Lipoteichoic acid up-regulates VEGF expression in macrophages and pulp cells. *J Dent Res* 2003; 82: 466-470.

27. Higashi T. Okamoto H. Electron microscopic study on Interodontoblastic collagen fibrils in amputated canine dental pulp. *J. Endodontics* 1996; 22: 116-119.

28. Palosaari H, Pennington CJ, Larmas, Edwards M, Tjäderhane L, Salo T. Expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of MMPs in mature human odontoblasts and pulp tissue. *Euro J Oral Sci* 2003; 111: 117-127.

29. Tziafas. D The future role of a molecular approach to pulp-dentinal regeneration. *Caries Res* 2004; 38:314-320.

30. Kalajzic Z, Liu P, Kalajzic I, Du Z, Braut A, Mina M, Canalis, E, Rowe DW. Directing the expression of a green fluorescent protein transgenic in differentiated osteoblasts: comparison between rat type I collagen and rat osteocalcin promoters. *Bone* 2002 ; 31:654-660.

31. Maglorie H, Romeas A, Melin M, Couble ML, Bleicher F, Farges JC. Molecular regulation of odontoblast activity under dentin injury. *Adv Dent Res* 2001; 15:46-50.

32. Tjäderhane L, Palosaari H, Wahlgren J, Larmas M, Sorsa T, Salo T. Human odontoblast culture method: the expression of collagen and matrix metalloproteinases (MMPs). *Adv Dent Res* 2001; 15:55-58.

33. About I, Camps J, Burger AS, Mitsiadis TA, Butler WT, Franquin JC. Polymerized bonding agents and the differentiation in vitro of human pulp cells into odontoblast-like cells. *Dent Mater* 2005; 21: 156-163.

34. Tziafas D. Veis A. Alvanou A. Inability of calcium hydroxide to induce reparative dentinogenesis at non-peripheal sites of dog dental pulp. *Eur. J. Oral Sci* 1996; 104:623-6.

35. About I, Bottero MJ, de Denato P, Camps J, Franquin JC, Mitsiadis TA. Human dentin production in vitro. *Exp Cell Res* 2000 10; 258:33-41.

36. Mizuno M, Miyamoto T, Wada K, Watatani S, Zhang GX. Type I collagen regulated dentin matrix protein-1 (Dmp-1) and osteocalcin (OCN) gene expression of rat dental pulp cells. *J Cell Biochem* 2003 15; 88:1112-1119.

37. Gracia JM, Martins MD, Jaeger RG, Marques MM. Immunolocalization of bone extracellular matrix proteins (type I collagen, osteonectin and bone sialoprotein) in human dental pulp and cultured cells. *Int Endod J* 2003; 36:404-410.

38. Golberg M, Six N, decup F, Bourd K, Palmier K, Salih E, veis A, Lasfargues JJ. Mineralization of the dental pulp: contributions of tissue engineering to tomorrow's therapeutics in odontology. *Pathol Biol* 2002; 50:194-203.

39. Tziafas D, kalyva M, Papadimitriou S. Experimental dentin-based approaches to tissue regeneration in vital pulp therapy. *Connect Tissue Res* 2002; 43:391-395.

40. Goldberg M, Six N, Decup F, Buch D, Soheili Majd E, Lasfargues JJ, Salih E, Stanislawski L. Application of bioactive molecules in pulp-capping situations. *Adv Dent Res* 2001; 15:91-95.

41. Tzaifas D, Belibasakis G, Veis A, Papadimitriou S. Dentin regeneration in vital pulp therapy: design principles. *Adv. Dent Res* 2001; 15:96-100.

42. Nakao K, Itoh M, Tomita Y, Tsuji T. FGF-2 potently induce both proliferation and DSP expression in collagen type I gel cultures of adult incisor immature pulp cells. *Biochem Biophys Commun* 2004 325:1052-1059.

43. Liesi P, Kauppila T. Induction of type IV collagen and other basement-membrane-associated proteins after spinal cord injury of the adult rat may participate in formation of the glial scar. *Exp Neurol* 2002; 173:31-45.

44. Tziafas D. Alvanou A. Panagiotakopoulos N. Smith AJ. Lesot H. Komnenou A. Ruch JV. Induction of odontoblast-like cell differentiation in dog dental pulps after in vivo implantation of dentine matrix components. *Arch. Oral Biol* 1995; 40: 883-893.

45. About I, Mitsiadis Ta. Molecular aspects of tooth Pathogenesis and repair: in vivo and vitro models. *Adv Dent Res* 2001; 15:59-62.

46. Ritchie HH, Liu J, Kasugai S, Moller P. A mineralizing rat dental pulp cell sub line expressing collagen type I and dentin sialoprotein-phosphophoryn transcripts. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 2002; 38:25-29.

47. Shiba H, Fujita T, Doi N, Nakamura S, Nakanishi K, Takemoto T, Hino T, Noshiro M, Kawamoto T, Kurihara H, kato Y. Differential effect of various growth factors and cytokines on the syntheses of DNA, type collagen, laminin, fibronectin, osteonectin/secreted protein, acidic and rich in cysteine (SPARC), and alkalina phosphatase by human pulp cells. *Physiol* 1998; 174:194-205.

48. Grande JP, Melder DC, Zinsmeister Ar. Modulation of collagen gene expression by cytokines: stimulatory effect of transforming growth factor-beta-1, with divergent effects of epidermal growth factor and tumor necrosis factor-alpha on collagen type I and collagen type IV. *J Lab Clin Med* 1997; 130:455-458.

49. Demon S, Shimokawa H, Yamaguchi S, Soma K. Temporal and

VERTIENTES

spatial mRNA expression of bone sialoprotein and type I collagen during rodent tooth movement. *Euro J Orthod* 2001; 23:339-348.

50. Breaut A, Edward J, Kollar. Mina, Mina. Analysis of the odontogenic and osteogenic potentials of dental pulp in vivo using a Col1a1-2.3-GFP transgenic. *Int J Dev Biol* 2003; 47:281-292.

51. Mina M, Braut A. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgen. *Cells tissues Organs* 2004; 176:120-133.

52. Italo Madeiros Faraco Junior, Holland Roberto. Histomorphological response of dogs' dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004;15:1-9.

53. Chimal-Monroy J, Bravo-Ruiz T, Krötzsch-Gómez F. E., Diaz de León, Arrellin G. Collagen-PVP accelerates new bone formation of experimentally induced bone defects in rat Skull and promotes the expression of osteopontin and sparc during bone repair of rat femora fractures. *Ann New York Acad Sci* 1998; 857:232-236.

54. Keni Gu, Richard H. Smoke, R. Bruce Rutherford. Expression of genes for bone morphogenetic proteins and receptors in human dental pulp. *Arch. Oral Biol* 1996; 41: 919-923.

55. Levy JR, Schoen FJ, Sherman FS, Nichols J, Hawley Ma, Lu SA. Calcification of subcutaneous implanted type 1 collagen sponges. *Am J Pathol* 1986 ; 122:71-82.

56. Shimizu Y., mavimoto, Teramatsu T., Okamura S., Hino T. Studies on composites of collagen and synthetic polymer. *Biomat. Med. Dev. Art. Org* 1978; 6: 375-391.

57. Murray PE, Hafez AA, Smith AJ, Cox CF. Hierarchy of pulp capping and repair activities responsible for dentin bridge formation. *Am J Dent* 2002; 15:236-243.

58. Tziafas et. Al. Role of exogenous TGF-beta in induction of reparative dentinogenesis in vivo. *Eur. J. Oral. Sci* 1998; 106 1:192-6.

59. Subay R, Demirci M. Pulp tissue reactions to a dentin-bonding agent as a direct capping agent. *J Endod* 2005; 31:201-20.