



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO



FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Técnica de evaluación microtomográfica para la formación de puente dentinario para el uso de Theracal LC, Biodentine, NeoMTA e Hidróxido de calcio como recubrimiento pulpar directo en molares de rata *Wistar*

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

ESPECIALISTA EN ODONTOPEDIATRÍA

P R E S E N T A:

ANAIS GABRIELA BRICEÑO ABRAHAM

TUTOR: Mtro. JUAN ENRIQUE CASTRO OGARRIO

ASESOR: Dra. JANETH SERRANO BELLO

TÉCNICA DE EVALUACIÓN MICROTOMOGRÁFICA PARA LA FORMACIÓN DE PUENTE DENTINARIO PARA EL USO DE THERACAL LC, BIODENTINE, NEOMTA E HIDRÓXIDO DE CALCIO COMO RECUBRIMIENTO PULPAR DIRECTO EN MOLARES DE RATA *WISTAR*.

Briceño Abraham Anais Gabriela *, Castro Ogarrío Juan Enrique **, Serrano-Bello Janeth ***.

*Alumno de la Especialidad de Odontopediatría DEPeI UNAM

** Profesor titular de asignatura en Odontopediatría de la DEPeI UNAM

*** Laboratorio de Bioingeniería de Tejidos de la DEPeI UNAM

Resumen

Objetivo: Describir el protocolo operatorio utilizado en ratas macho de la estirpe *Wistar* que fueron sometidas a recubrimiento pulpar directo en los primeros y segundos molares superiores, así como la técnica tomográfica con la que pueda ser posible la evaluación de la respuesta pulpar. **Materiales y métodos:** 4 ratas macho de la estirpe *Wistar* con pesos de 430 gramos. La descripción incluye el instrumental utilizado, la técnica anestésica, el posicionamiento del animal, las etapas de la técnica de recubrimiento pulpar directo y obturación de las cavidades, así como el mecanismo de obtención de las imágenes para su análisis. Las ratas se recuperaron de la anestesia sin complicaciones. **Conclusiones:** Los resultados demostraron que la técnica de aplicación de materiales es reproducible y la realización de estudios imagenológicos para análisis preserva la integridad de la muestra. Esta técnica podría ser empleada para ensayos preclínicos en pequeñas especies.

Palabras clave: Recubrimiento pulpar directo, microtomografía, materiales bioactivos

Summary

Objective: This work describes an operative protocol used in male rats *Wistar* specie that were subjected to direct pulp capping in their first and second upper molars and a tomographic technique suggested for the evaluation of pulp response. **Materials and methods:** 4 male rats *Wistar* specie with weights ranging from 430 grams The description includes the instruments used, anesthetic technique, positioning of the animal, stages of the technique of direct pulp capping and the sealing of the cavities, as well as the mechanism of obtaining the images for analysis. The rats recovered from anesthesia without complications. **Conclusions:** The results showed that the material application technique is reproducible and the conduct of imaging studies for analysis preserves the integrity of the sample. This technique could be used for preclinical trials in small species.

Keywords: *direct pulp capping, microtomography, wistar rats.*

Introducción

La pérdida temprana de órganos dentales trae consigo ciertas complicaciones como alteraciones en la longitud de los arcos dentarios, maloclusiones que pueden ocasionar trastornos de fonación y masticación y problemas estéticos, por lo que mantener la integridad de los órganos dentarios son el objetivo principal de la terapia pulpar conservadora como lo es el recubrimiento pulpar directo.

En la actualidad se cuenta con nuevos materiales dentales que buscan preservar la vitalidad pulpar por medio de la producción de dentina reparativa. La evaluación *In vivo* de la función de los materiales indicados para recubrimientos pulpares directos se realiza con estudios histopatológicos en la mayoría de los casos. (1)

Existen diversos materiales bioactivos de elección para recubrimiento pulpar directo pero la American Academy of Pediatric Dentistry menciona que el hidróxido de calcio y el MTA son los materiales indicados para este fin. (2)

Se han realizado diversos estudios comparativos entre diversos materiales bioactivos para evaluar sus propiedades físicas, propiedades químicas y los efectos que producen en la pulpa dental. Como ejemplo está el estudio realizado por Brizuela, donde comparó el hidróxido de calcio con Biodentine^{MR} y MTA, cementos a base de silicato de calcio, obteniendo como resultado un éxito del 100% para el Biodentine^{MR} y demostró que los dientes tratados con MTA e hidróxido de calcio tuvieron un 13.64% de fallas. (3) En busca de crear nuevos materiales bioactivos, hoy en día han surgido materiales cuya composición es similar a la del cemento Portland, entre ellos se encuentra el Biodentine^{MR}, material biocerámico a base de silicato de calcio. Es un material biocompatible de manipulación más fácil comparado con el MTA, también tiene buenas propiedades físicas y mecánicas. Tiene un pH de 11.7 que se mantiene constante por 28 días.

Se ha observado que las muestras tomadas para los análisis histopatológicos son muy delgadas pudiendo afectar la integridad de la muestra ya que no refleja la estructura de forma completa y puede dar resultados subjetivos. Otro material a base de silicato de calcio que ha demostrado tener propiedades convenientes en el tratamiento pulpar es el TheraCal LC^{MR}.

El TheraCal LC^{MR} está constituido en un 45% de partículas de silicato tricálcico (cemento Portland tipo III), 10% de un componente que lo provee de radiopacidad (estroncio), 5% de un agente que le otorga características hidrofílicas (sílica pirogénica), y un contenido de resina del 45%. El calcio actúa en conjunto con el fosfato presente en la sangre, plasma y fluido dentinario, para promover la precipitación de hidroxiapatita. (Ficha técnica TheraCal LC^{MR})

Recientemente se ha desarrollado un nuevo material llamado NeoMTA Plus^{MR} que parece tener resultados prometedores que favorecerán la regeneración tisular. NeoMTA Plus^{MR} es un nuevo material a base de silicato dicálcico y silicato tricálcico con propiedades químicas similares al MTA. También contiene tantalito, sulfato de calcio y sílica, materiales que le brindan propiedades bioactivas. NeoMTA Plus^{MR} no presenta cambios de coloración debido a que contiene óxido de tantalio como radiopacificador en vez de óxido de bismuto que causa la discromía en el MTA.(4) Tiene buenas propiedades de manejo ya que se mezcla con un gel a base de agua que da la oportunidad de variar la proporción para obtener diversas consistencias; consistencia líquida como sellador o espesa para restaurar perforaciones y demás modalidades de tratamientos. Se ha demostrado que la liberación de iones calcio e hidroxilo es más prolongada con NeoMTA^{MR} comparado con MTA Plus^{MR}. (5)

Otros factores como el ángulo de toma de la muestra pueden alterar los resultados. Actualmente se han introducido análisis de imagen para evaluar materiales de injerto óseo y otros procedimientos de regeneración tisular.(6,7)

Respecto a los materiales dentales, se han hecho estudios para la evaluación de formación de dentina terciaria como respuesta reparativa por

medio de estudios imagenológicos como la microtomografía computarizada. (2,3,8)

Dichos estudios utilizaron imágenes de baja resolución y los cortes obtenidos fueron similares a los de estudios histopatológicos por lo que se sugiere que se requiere de métodos más complejos como lo son las imágenes reconstructivas tridimensionales de la microtomografía computarizada que abarquen la estructura completa de las muestras.

En este estudio se pretende diseñar una técnica para que por medio de la obtención de imágenes constructivas tridimensionales de la microtomografía computarizada, se pueda evaluar la función reparativa usando TheraCal LC^{MR}, Biodentine^{MR}, NeoMTA^{MR} e Hidróxido de calcio, todos indicados como recubrimientos pulpaes directos para estudio en espécimen animal.

Debido a la necesidad de realizar ensayos preclínicos en animales para la prueba de materiales dentales, se pretende estandarizar una técnica que sea reproducible de manera sencilla, y con la cual se le pueda dar seguimiento a los resultados a largo plazo.

Materiales y Métodos

Tipo de estudio

Estudio descriptivo de la técnica para realizar un estudio experimental prospectivo longitudinal de tipo ensayo preclínico en espécimen animal.

Pacientes

Cuatro ratas machos de estirpe *Wistar* con peso promedio de 428 gramos (rango de 405 y 455 gramos) fueron solicitadas en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México para realizar la técnica. Las ratas se encontraban en estado óptimo de salud y se evaluaron clínicamente para corroborar la presencia y condiciones de salud de los primeros y segundos molares superiores.

Cabe señalar que dicho proyecto siguió los lineamientos de la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO1999 y la aprobación del CICUAL (Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio) de la facultad de Medicina con número: 027-CIC-2019.

Equipo

Microscopio quirúrgico (OPMI Pico System con cámara), Micromotor quirúrgico con adaptador para fresas de alta velocidad, lámpara de fotopolimerizado, succión, microtomógrafo (μ CT) Albira ARS (Oncovisión/Bruker, España).

Instrumental operatorio

Cuatro losetas de vidrio, cuatro espátulas para cementos, cuatro exploradores tipo OMS, 16 fresas de bola de diamante número 2, dos periostotomos tipo Molt, pinza de curación, fresa de pulido para resina.

Material operatorio

Sonda nasogástrica de calibre 10 Fr, Mycrobrush, puntas de papel de la primera serie de 15 mm, torundas de algodón estéril, jeringa de ácido ortofosfórico al 37%, adhesivo fotopolimerizable de un sólo paso no autograbante, jeringa de resina fluída fotopolimerizable, cuatro cápsulas de Biodentine^{MR} con sus ampollitas de solvente, un frasco de NeoMTA^{MR}, una jeringa de TheraCal LC^{MR}, dos tubos de Dycal^{MR}, agua bidestilada y jeringa de 5 ml (figura 1).

Protocolo anestésico

Las ratas se pesaron y posteriormente se tranquilizaron y sedaron por vía intramuscular con Ketamina (80 mg/kg) y Xilacina (10mg/kg), durante el procedimiento se monitorizó la profundidad anestésica, tomando en cuenta si hay presencia de vocalizaciones, movimientos en respuesta a estimulación, relajación muscular adecuada, patrón y frecuencia respiratoria y color de las mucosas.

Posicionamiento de las ratas

Posterior a la sedación las ratas se colocaron en posición decúbito dorsal sobre una base de madera con aditamentos de caucho que permitieron mantener la boca abierta. Fueron cubiertas con un campo hendido estéril y se utilizó un microscopio quirúrgico con magnificación de 10X (figuras 2 y 3).



Figura 1. NeoMTA^{MR}, Biodentine^{MR}, Dycal^{MR} y TheraCal LC^{MR} con sus respectivas losetas y espátulas en el orden que fueron colocados.

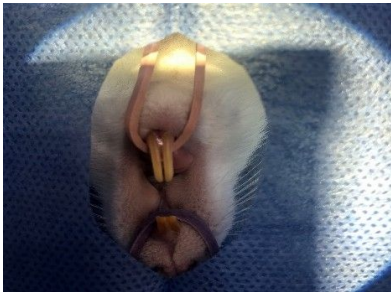


Figura 2. Posicionamiento de la rata.



Figura 3. Posicionamiento del microscopio sobre el campo operatorio.



Figura 4. Retracción de carrillo y observación de los molares superiores.

Técnica quirúrgica

Una vez estando posicionada la rata, se procedió a la retracción de carrillos con la ayuda de dos periostotomos tipo Molt y la colocación de la sonda nasogástrica dentro de la cavidad bucal para la succión y control de humedad (figura 4).

Se procedió con la apertura de la cavidad del primer molar superior derecho utilizando el micromotor quirúrgico con un adaptador para fresas de alta velocidad y fresa de bola de diamante del número 2.

Una vez que se realizó la comunicación en la cámara pulpar e identificado el sangrado de color rojo brillante se procedió a enjuagar la cavidad con solución fisiológica estéril, posteriormente se hizo compresión con una torunda de algodón estéril hasta lograr la hemostasia (figuras 5 y 6). Por otro lado se realizó la mezcla del NeoMTA^{MR} proporción 2:1 sobre loseta de vidrio estéril. Con ayuda de un explorador tipo OMS se llevó el material a la cavidad colocándolo en el punto de exposición pulpar y se dejó fraguar por 5 minutos. Se continuó con el grabado ácido de las paredes de la cavidad por 15 segundos se enjuagó por 30 segundos con solución estéril. Se procedió a secar la cavidad con una torunda de algodón estéril para eliminar el exceso de agua y con puntas de papel 15 mm para lograr un mayor control de humedad.

Con ayuda de un Mycrobrush^{MR} se llevó el agente adhesivo a la cavidad y se frotó por 10 segundos, se fotopolimerizó por 20 segundos y se concluyó con la colocación de resina fluída para la obturación fotopolimerizando 30 segundos.

Con ayuda de una fresa de pulido las cúspides de los dientes antagonistas fueron desgastadas para minimizar las fuerzas oclusales y no interferir en su alimentación ni estado de ánimo (figuras 7 y 8).

Se realizó el mismo protocolo de acceso a la cavidad, control de hemorragia y humedad, así como los mismos pasos de grabado ácido, adhesión y obturación de la cavidad en todos los molares tratados. Las variaciones fueron a la hora de mezclar y colocar los materiales. Para el segundo molar superior derecho se utilizó Biodentine^{MR}, se abrió la cápsula y se le colocó la ampolleta de solvente, posteriormente fue llevada al amalgamador por 30 segundos.

La pasta fue retirada de la cápsula con ayuda de una espátula estéril y utilizando un explorador tipo OMS se llevó al punto de exposición pulpar y se dejó fraguar por 5 minutos, posteriormente se continuó con la obturación de la cavidad (figuras 9 y 10).

Para el primer molar superior izquierdo se utilizó Dycal, el cual se preparó según las instrucciones del fabricante en proporción 1:1 utilizando una loseta de vidrio y espátula estéril. Fue llevado a la cavidad con ayuda de un explorador tipo OMS y se dejó fraguar por 3 minutos para continuar con la colocación de la obturación.

Por último, se trabajó con el segundo molar superior izquierdo en el cual se colocó TheraCal LC^{MR} que debido a su presentación en jeringa se colocó de forma directa en la cavidad y se fotopolimerizó por 20 segundos y se concluyó con el protocolo de obturación.



Figura 5. Acceso a la cavidad pulpar.

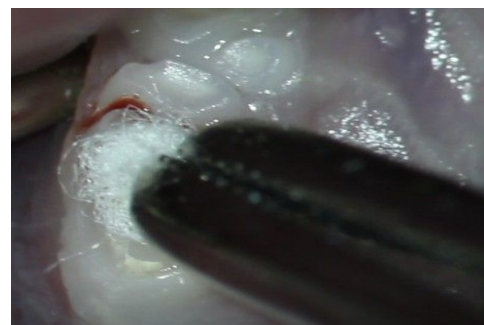


Figura 6. Secado de la cavidad y control de la hemorragia.

Para cada molar se utilizó una fresa nueva estéril. Para cada material se utilizó una loseta y una espátula independiente. Se siguió el mismo protocolo en cada una de las ratas hasta concluir con la número 4. Se llevó un registro de los pesos para monitorear cualquier cambio en la alimentación provocado por un mal ajuste oclusal de los materiales (figuras 11 y 12).



Figura 7. Colocación de NeoMTA en la cavidad.

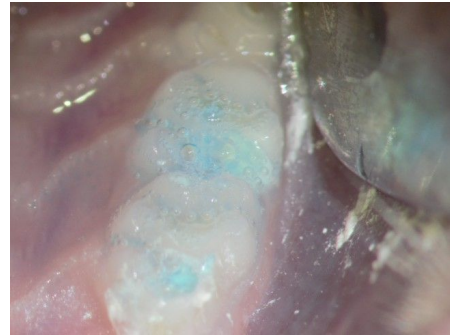


Figura 9. Grabado con ácido ortofosfórico al 37%.



Figura 8. NeoMTA colocado en el piso de la cavidad.

Postoperatorio

Se realizó seguimiento clínico posquirúrgico durante 15 días, valorando una serie de parámetros clínicos: estado general del animal, aspecto de la zona intervenida, sangrado, exudado y peso.

Las ratas permanecieron en condiciones de fotoperiodo de 12 horas y una humedad relativa al 50% y se alimentó con rodent diet 5001 ad libitum.

Estudio de μ CT

A los 15 días postquirúrgicos, se adquirieron imágenes microtomográficas en el equipo μ CT Albira ARS, ubicado en el Laboratorio de Física Médica e Imagen Molecular del Instituto Nacional de Cancerología.

Las ratas fueron sedadas por vía inhalatoria con isoflurano (Lisorane, Baxter International Inc.) en una concentración de 2/100 de oxígeno, posteriormente se colocarán en el equipo, centrando el campo de visión (FOV) en la zona de los molares superiores a boca abierta, con los parámetros de adquisición de 1000 proyecciones, con voltaje de 45 Kv y una corriente de 0.4 mA (figuras 11 a 17).

Cabe resaltar que se acomodaron las extremidades y se cerraron los ojos para la protección del animal (figura 18).

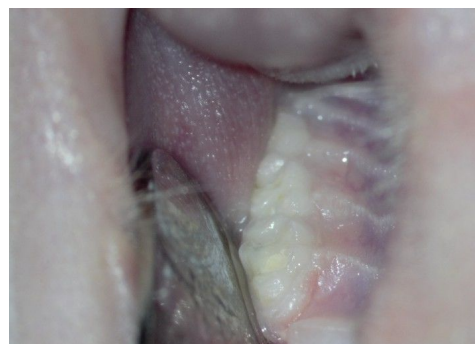


Figura 10. Cavidad obturada con resina fluída.



Figura 11. Interior del microtomógrafo.

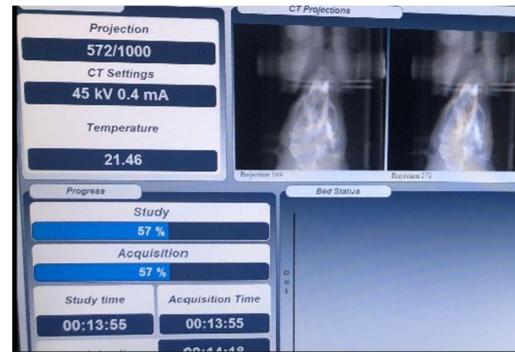


Figura 14. Estudio microtomográfico en proceso.



Figura 12. Cámara del microtomógrafo



Figura 13. Rata consciente previo a la sedación.



Figura 15. Administración de Óxígeno e Isoflurano



Figura 16. Posterior a la administración de Óxígeno e Isoflurano.



Figura 17. Colocación de la rata dentro de la cámara del microtomógrafo y suministro de Óxígeno e Isoflurano.



Figura 18. Posicionamiento de la rata en la cámara del microtomógrafo.



Figura 19. Reconstrucción en 3D de la cabeza.

Resultados

La técnica anestésica utilizada fue correcta debido a que las cuatro ratas recuperaron la conciencia en el tiempo esperado y sin complicaciones.

Se logró realizar los accesos en los molares creando la comunicación con la cámara pulpar sin perforaciones de furca.

Se obtuvo la hemostasia deseada en los primeros minutos posteriores a la comunicación pulpar con irrigación de solución fisiológica y compresión con torunda de algodón estéril.

La manipulación de los materiales fue la ideal adquiriendo la consistencia deseada para cada uno de ellos, lo que facilitó su colocación dentro de la cavidad en el punto de comunicación.

El uso de resina fluida redujo el tiempo de aplicación para la obturación debido a su presentación en jeringa.

El control de la humedad se logró exitosamente gracias al uso de la sonda nasogástrica como eyector, ya que es flexible, de fácil colocación y doble absorción ya que contaba con doble perforación de salida.

Las imágenes obtenidas de microtomografía y la reconstrucción de las mismas, ayudan al diagnóstico, ya que se puede observar desde la cabeza completa (figura 19), al ser de alta calidad, las hace una buena opción para el estudio de materiales dentales en especímenes animales, ya que se pueden realizar reconstrucciones avanzadas para visualizar los molares específicamente y medir la profundidad de la cavidad, la comunicación pulpar, la cantidad del material, distancia de furca, lesiones periapicales, sellado de los materiales, entre otros. (figuras 19-21).



Figura 20. Reconstrucción avanzada de la zona molar superior izquierda.

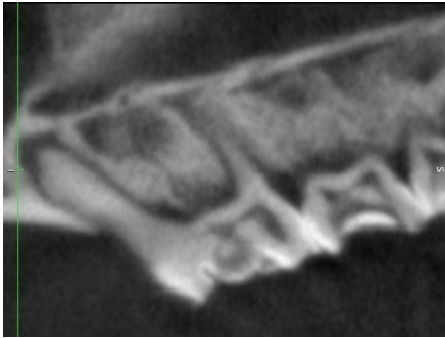


Figura 21. Imagen radiográfica del primer y segundo molar superior izquierdo donde se puede observar la presencia de NeoMTA (primer molar) y Biodentine (segundo molar) con obturación de resina.

En la imagen 3D se observa la estructura completa de los primeros y segundos molares, se puede modificar el posicionamiento del corte para poder observar diferentes planos de la imagen. Una vez identificada la zona deseada se procede a visualizar la imagen en radiografía para ver el interior de los molares y con ello observar los materiales colocados.

Discusión

Los avances en los materiales bioactivos brindan un mayor número de alternativas para tratamientos conservadores ya que presentan la capacidad de regenerar dentina, presentan tiempos de fraguado cada vez más cortos, mantienen su pH en un valor biocompatible con los tejidos dentales y la mayoría son radiopacos, lo que permite identificarlos fácilmente en estudios imagenológicos.

El recubrimiento pulpar directo es un tratamiento que utiliza la capacidad regenerativa de la pulpa dental para producir dentina a través la inducción provocada por un material bioactivo (1).

La selección del uso de NeoMTA^{MR}, Biodentine^{MR}, TheraCal LC^{MR} e hidróxido de calcio en este trabajo fue debido a su alta promoción y a sus beneficios reportados utilizándolos como recubrimientos pulpares directos en diversos estudios.

El procedimiento debe ser estandarizado para que se pueda reproducir en otras investigaciones en especies animales pequeñas. Ya que una de las complicaciones más frecuentes en este tipo de procedimientos es el compromiso de vías aéreas, debido a la posición de la rata, en decúbito supino, presentando dificultad para respirar, por lo que es de suma importancia tener cuidado con la tracción de la lengua y un buen sistema de succión para evitar obstruir la vía aérea, pero sobretodo una base que cuente con una concavidad para que no haya riesgos de broncoaspiración o atragantamiento de la lengua. También se tiene que prestar atención a la coloración de las mucosas durante el proceso operatorio. Cuando se presenta cianosis en mucosas orales se detiene el procedimiento y se coloca a la rata en posición decúbito prono hasta retomar la coloración rosa de la mucosa.

El exceso de humedad es otro problema que podría presentarse durante el tiempo operatorio, lo cual podría llevar al desalajo de los materiales por defectos en la adhesión. Por lo que es importante tener un buen sistema de succión y utilizar aditamentos como torundas de algodón estéril y puntas de papel para mantener la cavidad en óptimas condiciones y favorecer la adhesión.

El medio bucal, el contenido bacteriano de la placa y las características biológicas de la pulpa son factores a considerar ya que no son iguales en los humanos por lo que no siempre se podrá atribuir los mismos resultados en el ser humano.

De acuerdo al estudio realizado por Berman y Massler (20) y los resultados obtenidos, el acceso se realizó desde la cara oclusal ya que esto permite un mejor control del tamaño y la profundidad de la cavidad.

La anestesia utilizada en este estudio fue ketamina intramuscular a dosis de 80 mg/kg y Xilacina 10 mg/kg que da un tiempo de trabajo corto lo que ayuda a que el animal se recupere de forma rápida, a diferencia de otros estudios que utilizan éter (21) o pentobarbital (22).

A diferencia de Cortés y cols. que utilizó lentes binoculares, en este estudio se utilizó un microscopio quirúrgico con cámara para tener un mejor campo de visión y obtener imágenes de alta calidad (23).

Se decidió colocar resina fluida como material de obturación debido a su radiopacidad moderada. En otros estudios se ha utilizado amalgama (23) sin embargo, su radiopacidad es mayor, lo que podría opacar la visibilidad de los materiales utilizados como recubrimientos pulpaes.

El uso de imágenes como las microtomográficas en pequeñas especies para ensayos preclínicos, es esencial en la investigación sobre todo para probar materiales que traerán beneficios a la salud a largo plazo, ya que, con el mismo grupo de animales, se pueden realizar estudios de imagen a diferentes tiempos, logrando reducir la variabilidad biológica y reducir el número de animales, así como disminuir otro tipo de tratamientos por ejemplo extracciones de los dientes tratados, o bien segmentar el maxilar o la mandíbula para cada periodo de tiempo establecido. Dando como opción la realización de imágenes a diferentes tiempos y cortes histológicos únicamente al finalizar el estudio para comparar y ratificar lo observado en los estudios de imagen.

Como perspectiva a este estudio, se podrían realizar imágenes microtomográficas de PET (Tomografía por Emisión de Positrones) y SPECT (Tomografía por Emisión de Fotón único), usando terapia molecular para poder observar *in vivo* características como, grado de inflamación, proliferación celular en la zona de la comunicación, y por consiguiente evaluar la actividad metabólica de la zona a diferentes periodos de tiempo, en el mismo animal. Lo cual genera información científica que en un futuro pueda complementar los estudios preclínicos.

Conclusiones

El estudio de materiales bioactivos por medio de imagenología, como lo es la microtomografía, es una excelente alternativa debido a que es un procedimiento sencillo y su análisis no pone en riesgo la muestra, ya que no se requiere de su modificación para obtenerla. El trabajo operatorio para la colocación del recubrimiento pulpar directo y su obturación es similar al realizado en el ser humano, lo que lo hace un protocolo fácilmente reproducible. De acuerdo a los resultados del estudio, mediante la técnica de imagen, se estableció un protocolo reproducible para otros estudios sobre el efecto de diferentes fármacos en el tejido pulpar, sobretodo en la evaluación de la formación de puente dentinario o regeneración tisular.

Referencias

1. Iohara K, Nakashima M, Ito M, Ishikawa M, Nishida A, A. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2. *J Dent Res*. 2004;83:590–585.
2. Ominsky MS, Boyd SK, Varela A, Jolette J, Felix M, Doyle N, Mellal N, Smith SY, Locher K, Buntich S, Pyrah I, BR. Romosozumab improves bone mass and strength while maintaining bone quality in ovariectomized cynomolgus monkeys. *J Bone Min Res*. 2017;32.
3. Chen X, Wang C, Zhang K, Xie Y, Ji X, Huang H, YX. Reduced femoral bone mass in both diet-induced and genetic hyperlipidemia mice. *Bone*. 2016;93:104–12.
4. Abu STNMA. Chemistry and Bioactivity of NeoMTA Plus™ versus MTA Angelus® Root Repair Materials. *J Spectrosc*. 2017;2017:9.
5. Pinheiro LS. Cell Viability and Tissue Reaction of NeoMTA Plus: An InVitro and InVivo Study. *J Endod*. 2018;44(7):6.
6. Al-Hezaimi K, Salameh Z, A-FK et al. Histomorphometric and micro-computed tomography analysis of pulpal response to three different pulp capping materials. *J Endod*. 2011;37:507–12.
7. Lee W, Oh JH, Park JC, Shin HI, Baek JH, Ryoo HM, WK. Performance of electrospun poly(ϵ -caprolactone) fiber meshes used with mineral trioxide aggregates in a pulp capping procedure. *Acta Biomater*. 2012;8:2986–2995.
8. Fuks AB, Guelmann M, Kupietzky a, RI, Costa CAS. Current developments in pulp therapy for primary teeth. *Endod Top*. 2012;23:50–72.
9. American Academy of Pediatric Dentistry. Guideline on pulp therapy for primary and immature permanent teeth. *Pediatr Dent*. 2014;37(6):212–9.
10. Brizuela C, Ormeño A, Cabrera C, Cabezas R, Silva CI, Ramírez V, et al. Direct Pulp Capping with Calcium Hydroxide, Mineral Trioxide Aggregate, and Biodentine in Permanent Young Teeth with Caries: A Randomized Clinical Trial. *J Endod*. 2017;43(11):10–4.
11. Karadas M, Cantekin K, Gumus H, Ate?? SM, Duymu?? ZY. Evaluation of the bond strength of different adhesive agents to a resin-modified calcium silicate material (TheraCal LC). *Scanning*. 2016;38(5):403–11.
12. Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, Itoh S, Ono M, Kuboki T, Kamioka H, YT. Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. *Top Appl lithium chloride pulp induces dentin Regen*. 2015;10.
- 13.13.
14. Soares G. El escenario. In: Panamericana EM, editor. *Endodoncia Técnica y fundamentos*. 3rd ed. 2002. p. 3–4.
15. Stanley HR. Pulp capping : Conserving the dental pulp-Can it be done ? Is it worth it ? 1985;
16. Min K-S et al. Effect of Mineral Trioxide Aggregate on Dentin Bridge Formation and Expression of Dentin Sialoprotein and Heme Oxygenase-1 in Human Dental Pulp. *J Endod*. 34(6):666–70.
17. Grech L, Mallia B, CJ. Characterization of set Intermediate Restorative Material, Biodentine, Bioaggregate and a prototype calcium silicate cement for use as root-end filling materials. *INT Endod J*. 2013;46:632–41.
18. Laurent P, Camps J, About I. Biodentine TM induces TGF-??1 release from human pulp cells and early dental pulp mineralization. *Int Endod J*. 2012;45(5):439–48.
19. Verbeeck SR• LCM• RGECC• RMH. Biodentine™ material characteristics and clinical applications: a review of the literature. *Eur Acad Paediatr Dent*. 2014;
20. Berman DS, Massler M. Experimental pulpotoomies in rat molars. *J Dent Res* 1958;37:229-242.

21. Yamasaki M, Kumazawa M, Kohsaka T, Nakamura H, Kameyama Y. Pulpal and periapical tissue reactions after experimental pulpal exposure in rats. *J Endod* 1994;20:13-17.
22. Ranly DM, Fulton R. Reaction of rat molar pulp tissue to formocresol, formaldehyde and cresol. *J Endod* 1976;2:176-181.
23. Cortés O, Boj JR, Canalda C, García C. Metodología para estudios histológicos pulpares en ratas. *Endo* 2001;19:31-37.