



**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA  
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**

**Dentina terciaria o de reparación inducida por  
extracto de *CALÉNDULA OFFICINALIS LINN.*  
europea en molares de ratas *Norvegicus Albinus***

**TESIS DOCTORAL**

**M<sup>a</sup> EUGENIA CABRERA DOMÍNGUEZ**

**DIRECTORES**

**Profa. Antonia Domínguez Reyes  
Prof. David Rivero Tames  
Dr. Eugenio Pedro Cabrera Suárez**

**Sevilla 2008**

# ÍNDICE

## I. INTRODUCCIÓN

I.1. El complejo dentino-pulpar. Generalidades .....	01
I.2. El complejo dentino-pulpar frente a la agresión.....	15
I.3. Recubrimiento pulpar directo .....	21
I.3.1. Definición del RPD .....	21
I.3.2. Indicaciones y contraindicaciones del RPD.....	25
I.3.3. Técnica del RPD.....	31
I.4. Materiales en el recubrimiento pulpar directo.....	33
I.4.1. RPD con hidróxido de calcio.....	34
I.4.2. RPD con óxido de zinc-eugenol.....	49
I.4.3. RPD con agregado trióxido mineral (MTA).....	56
I.4.4. RPD con sistemas adhesivos y composites.....	61
I.4.5. Otros materiales empleados en el RPD.....	70
I.5. Las plantas como recurso terapéutico .....	81
I.5.1. Breve resumen histórico. Generalidades .....	81
I.5.2. Plantas en el RPD y otros usos médicos y odontológicos.....	87
I.6. La Caléndula Officinalis Linné Europea .....	93
I.6.1. Caléndula: aspectos botánicos, bioquímicos y farmacológicos .....	94
I.6.2. Formas en las que puede aplicarse .....	101
I.7. La rata Norvegicus Albinus .....	106

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....

109

<b>III. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	112
III.1. Material .....	112
III.2. Método.....	114
III.2.1. Obtención del extracto de caléndula off. Linn. europea .....	116
III.2.2. Obtención del hidróxido de calcio puro pro-análisis.....	118
III.2.3. Técnica del RPD en el animal de experimentación.....	118
III.2.4. Realización y preparación de los cortes histológicos .....	121
III.2.5. Análisis Anatómico-Patológico de los cortes histológicos .....	122
III.2.6. Método estadístico.....	122
<b>IV. RESULTADOS</b> .....	125
IV.1. Descripción del comportamiento de la pulpa dental frente al extracto de caléndula e hidróxido de calcio (efectos de ambos materiales) .....	126
IV.2. Materiales, animales de experimentación y variables según días de sacrificio .....	130
IV.3. Comparación del comportamiento pulpar por variables.....	131
IV.4. Análisis global del RPD con extracto de caléndula e hidróxido de calcio en molares de ratas <i>Norvegicus Albinus</i> .....	136
<b>V. DISCUSIÓN</b> .....	138
V.1. El por qué de un estudio con esta planta en esta técnica .....	142
V.2. Análisis de los resultados obtenidos en el presente estudio.....	146
<b>VI. CONCLUSIONES</b> .....	156
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	158

# I. INTRODUCCIÓN

## I. 1. EL COMPLEJO DENTINO-PULPAR. GENERALIDADES

Debido a las fundamentales implicaciones clínicas que ello tiene, muchos son los trabajos que, en los últimos años, han tenido como base el mejor conocimiento de esa vital estructura que hoy conocemos como complejo dentino-pulpar. Un complejo dentino-pulpar que, teniendo origen en el mesénquima embrionario que forma parte de la boca primitiva, más tarde, se mostrará como la verdadera unidad funcional y protectora del diente que es.

Por ello, teniendo en cuenta que el presente trabajo de Tesis Doctoral estudia la posible inducción de dentina terciaria por extracto de *Caléndula Officinalis Linné Europea* en un modelo animal (*Ratas Norvegicus Albinus*), como introducción a la investigación propiamente dicha, nosotros hemos creído podría ser interesante recordar, aunque solo fuera someramente, las estructuras que forman dicho complejo, su desarrollo y funciones.

Y tanto es así, que, dentro de este pequeño resumen, comenzaremos diciendo que, desde el punto de vista embriológico, los dientes comienzan a formarse, aproximadamente, sobre la sexta semana de vida intrauterina; que los mismos parten

de una serie de brotes epiteliales que, apareciendo en la porción anterior de los maxilares, se dirigen, lenta y progresivamente, hacia su porción posterior, y que todo viene a representar un conjunto de cambios biológicos morfo-funcionales que irán manteniéndose mientras viva el diente.

Existen dos grandes etapas en esta formación. La llamada morfogénesis o morfo-diferenciación, durante la cual se forman los patrones coronario y radicular por división, desplazamiento y organización de las diferentes células epiteliales y mesenquimatosas de la boca primitiva; y la conocida como histogénesis, en la que se establece la diferenciación celular origen de los diferentes tejidos dentarios; es decir, el esmalte, la dentina y la pulpa.

Algo que debemos señalar es que ambas etapas están tan imbricadas, que las divisiones que efectuamos en este desarrollo, solo pueden tener como objeto la mejor comprensión de los procesos, ya que, en realidad, todo sucede, en cada momento, conjuntamente. <sup>(1)</sup>

Inicial e histológicamente, en esta formación dentaria, pueden distinguirse dos capas de células: la epitelial ectodérmica, origen del órgano del esmalte; y la ectomesenquimatosa, ectomesénquima, o mesénquima cefálico, que dará lugar a estructuras como el hueso alveolar, el cemento, el ligamento periodontal, la dentina o la pulpa. En la epitelial ectodérmica, a su vez, es posible observar dos disposiciones celulares: una superficial, constituidas por células planas, y otra basal constituida por células altas; y en el ectomesénquima, una serie de células que, desde la cresta

neural, han emigrado a la porción cefálica del embrión. Estas disposiciones celulares, que se encuentran unidas entre sí por la llamada membrana basal, serán las que, al actuar sobre el epitelio bucal que recubre la boca primitiva o estomodeo, inducirán la formación y desarrollo dentarios. Y dentro de este desarrollo, el primer paso que puede observarse, es la formación de una llamada lámina dental que, como ya hemos mencionado, es consecuencia de esa diferenciación celular ectodérmica de la boca primitiva.

En esta cavidad (boca primitiva), las células basales del epitelio subyacente, proliferan a todo lo largo de lo que serán los futuros maxilares, para dar lugar a las láminas vestibular y dentaria. Las de la lámina vestibular crecen dentro del ectomesénquima formando el surco vestibular; y en las láminas dentarias, en sitios específicos de cada maxilar, surgirán diez crecimientos epiteliales en aquellos lugares donde, posteriormente, se ubicaran los veinte dientes decíduos; y más tarde, los treinta y dos gérmenes permanentes.

A partir de aquí, el desarrollo de estos gérmenes, normalmente, y por razones didácticas, se ha dividido, tradicionalmente, en cuatro fases o etapas: la de Brote, Casquete, Campana y Estadio de Folículo Dentario Terminal o maduro; etapas que al decir de Trowbridge y Kim o Gómez de Ferraris, son términos morfológicos, puramente descriptivos, que no hacen referencia a los profundos cambios funcionales que tienen lugar en cada una de ellas. <sup>(3,1,2)</sup>

La fase de brote (también denominada de yema) se caracteriza porque, debido a la división mitótica de las células de la capa basal, en la lámina dental, aparecen una serie de engrosamientos que son los que darán lugar a los futuros órganos del esmalte, único tejido de naturaleza ectodérmica del diente. En esta etapa, el ectomesénquima adyacente se condensa y forma el saco o folículo dentario.

En la etapa de Casquete, novena semana, se produce la proliferación desigual de las caras laterales o bordes de cada brote; se invagina el ectomesénquima, se forma la papila dentaria, y ésta, dará lugar al complejo dentino-pulpar y sus odontoblastos. En estos momentos, en el proceso formativo del diente, podemos distinguir, por lo tanto, tres estructuras fundamentales: el órgano del esmalte, el esbozo de la papila dentaria y el esbozo del saco dentario.

A medida que las células marginales del órgano del esmalte continúan su proliferación, la invaginación del mismo se hace más pronunciada en el mesénquima, con lo que su estructura adquiere la forma de una campana. Estadio o fase de campana que tiene lugar sobre la decimocuarta o décimooctava semana de la vida intrauterina.

El estadio de folículo dentario comienza cuando se identifican en las zonas de las futuras cúspides dentarias o bordes incisales, la presencia o depósito de matriz de esmalte; y es al final de esta fase, cuando tiene lugar la aposición de tejidos duros, y por diferenciación de las células ectomesenquimales, la dentinogénesis.

Desarrollado el diente y erupcionado en la cavidad bucal, básicamente, desde el punto de vista anatómico macroscópico, en el diente, pues, podemos distinguir corona y raíz. Y en corte sagital, esmalte, dentina, cámara y conductos radiculares. Tanto la cámara como los conductos radiculares llevan

en su interior, lo que se conoce como pulpa dental; tejido conectivo laxo de gran riqueza vascular y nerviosa, que forma, nutre y defiende al diente frente a posibles agresiones.

El esmalte que cubre la corona, es el componente dental que produce los ameloblastos, los cuales, terminada la formación del diente, pierden su capacidad amelogénica. Por ello, como señala Gómez de Ferraris, las pérdidas en esta estructura, al no poderse sustituir o reparar biológicamente, requieren de una reparación que, con materiales al uso, ha de realizar el profesional en su clínica.

En las raíces, el componente esencial es el cemento; acelular o primario en la mitad coronal de la raíz, y celular o secundario en su mitad apical; cemento secundario, que se caracteriza porque su formación coincide con la erupción dental. Los conductos radiculares, uno o varios según el diente, como ya hemos mencionada, contienen al tejido pulpar radicular que, como el cameral o coronal, mantiene su vital capacidad funcional, gracias a los vasos y nervios que le llegan a través del foramen apical. <sup>(1,2)</sup>

La dentina es un material o tejido conjuntivo altamente mineralizado, que contiene infinidad de túbulos interconectados. Su contenido, prolongaciones odontoblásticas y nervios procedentes de la pulpa, constituye una red, tan intrincada, que hace de la misma un verdadero tejido vivo. Escavada en esta dentina, la cámara pulpar, es una estrecha cavidad en la que la pulpa coronal se encuentra mecánica y fisiológicamente protegida de las agresiones externas. En la región coronal, la dentina se encuentra cubierta por esmalte; y en la porción radicular por cemento. Es, por lo tanto, un órgano de sostén, cuyo espesor, variando según el tipo de diente, es mayor en caninos y molares y menor en los incisivos inferiores.

En la dentina podemos distinguir dos estructuras básicas: la matriz colágena mineralizada y los conductos o túbulos dentinarios que la atraviesan a todo lo largo y ancho de su espesor.

Dentro de los túbulos, se encuentran los llamados procesos odontoblásticos, que no son otra cosa que las prolongaciones citoplásmicas mayores de los odontoblastos; células que, formando una capa en la zona más periférica de la pulpa, son las responsables de la formación y mantenimiento de la dentina. Esta capa de odontoblastos se haya separada de la dentina mineralizada por una zona de matriz no mineralizada conocida como predestina. La predestina esta formada por colágeno ( I y II poliméricos) y proteoglicanos como el dermatan-sulfato, el hialuronato, el condroitin sulfato y otros elementos como la fosforina ligada al calcio.

La primera dentina o predentina que puede observarse en el desarrollo dental, es la que se conoce como dentina del manto, la cual, a medida que se calcifica, se convierte en esa dentina circumpulpar que acaba por ocupar la mayor parte del diente. La dentina del manto y la circumpulpar constituyen la dentina primaria; y la que se forma cuando ya se ha completado la raíz del diente, la secundaria o fisiológica.<sup>(4)</sup>

Desde el punto de vista de su composición, la dentina está constituida, fundamentalmente, por un material inorgánico o hidroxiapatita, y otro orgánico (matriz) de fibras colágenas y otras proteínas.

De las proteínas de la matriz orgánica, diremos, que, algunas son semejantes a las que existen en la matriz ósea (osteonectina y osteopontina), y que otras, como la fosforina dentinaria, la sialoproteína o la llamada proteína de la matriz dentinaria, son típicas o propias de esta matriz.

En la dentina se han podido identificar, además, factores tan importantes como el factor de crecimiento TGF-B, el semejante a la insulina o el factor derivado de las plaquetas.

En el interior de los túbulos dentinarios, formados histológicamente por dentina peritubular (dentina muy mineralizada y muy pobre en fibras colágenas), existe un fluido tisular de composición parecida al plasma, que resulta ser un exudado vascular procedente de los capilares de la pulpa. Este fluido o líquido dentinario, llega a los túbulos mediante gradiente de presión. Un gradiente de presión cuya brusca

variación, según Brännstrom (teoría hidrodinámica) determina, entre otras cosas, la sensibilidad dental cuando, por alguna agresión, existen túbulos abiertos.<sup>(5)</sup>

Estos túbulos, más anchos cerca de la cámara pulpar y más estrechos en la unión amelo-dentinaria, forman en el interior de la dentina un complejo entramado de ramificaciones laterales que, no solo conectan unos túbulos con otros, sino unas prolongaciones odontoblásticas con otras, lo que permite, en virtud de su permeabilidad, la transmisión a la pulpa de cualquier estímulo que afecte a la superficie.

Los procesos odontoblásticos, pues, constituyen el órgano transmisor de los estímulos a la pulpa, la cual, en virtud de esa capa de odontoblastos, ante cualquier noxa, agresión o lesión que destruya dentina, reaccionará con la formación de una nueva dentina, terciaria, reparativa o irregular que, poseyendo menos túbulos que la normal primaria o secundaria, resulta un buen mecanismo defensivo.

Esta dentina, inducida por los odontoblastos locales directamente implicados en la agresión, se produce en la superficie pulpar subyacente a la dentina primaria o secundaria de las áreas irritadas, y sobre los túbulos dentinarios que comunican estas dentinas con la lesión; una caries por ejemplo. En los casos de desgaste oclusal, la dentina de reparación se deposita en la superficie pulpar de la dentina expuesta.

Si la irritación pulpar es leve (caries superficial), la dentina terciaria que se forma puede parecerse a la primaria en cuanto a la cantidad de túbulos y grado de

mineralización; si la lesión es profunda, la misma puede ser relativamente atubular y pobremente mineralizada.

El grado de irregularidad de la dentina terciaria o reparativa se encuentra determinado, posiblemente, por el grado o importancia de la inflamación presente, el mecanismo de la lesión celular y el estado de diferenciación del reemplazo odontoblástico. La dentina reparativa de peor calidad suele asociarse a una inflamación pulpar acusada.

D'Souza y cols. (1995) han demostrado que las células que forman dentina terciaria sintetizan colágeno tipo I pero no de tipo III. Estas células son inmuno positivas para la sialoproteína dentinal. <sup>(6)</sup>

Según Stanley, White y McCray (1966) la dentina terciaria o reparativa producida como respuesta a las preparaciones de cavidades experimentales en dientes humanos, rara vez se forma antes de los 30 días post-tratamiento; un retraso entre preparación de cavidades y formación dentinaria que ellos piensan se debe al tiempo que necesita la pulpa dental para inducir la proliferación y diferenciación de nuevos odontoblastos. <sup>(7)</sup>

Dentro de esta dentina de neoformación, terciaria o reparativa, existen autores que establecen cierta clasificación al distinguir una forma reactiva (dentina terciaria reaccional) inducida por los odontoblastos diferenciados durante el desarrollo del diente y supervivientes a una lesión leve, de la llamada dentina reparativa, que sería

la formada a partir de una nueva generación de odontoblastos originados en el lugar de la agresión por precursores pulpares; es más, quienes, incluso, hablan, dentro de esta dentina neoformada, de una cicatrizal o puente dentinario, producida gracias a la acción de protectores pulpares como el hidróxido de calcio, el óxido de zinc, u otros materiales odontológicos. <sup>(1,4,6)</sup>

Respecto a la pulpa, forma madura de la papila dentaria, diremos que se encuentra situada en una cavidad que ocupa la casi totalidad de la corona dental; y que, desde ella, según el diente, se extiende al canal o canales radiculares, para terminar un poco antes de los llamados forámenes apicales.

En la pulpa, podemos distinguir varias zonas: la odontoblástica constituida por odontoblastos dispuestos en empalizada; la oligo celular de Weil, en la que, además de fibroblastos sub-odontoblásticos, pueden identificarse plexos nerviosos (Raschkow) y capilares; la zona rica en células, con fibroblastos productores de las fibras de von Korf y células ecto-mesenquimatosas; y la zona central o pulpa propiamente dicha. <sup>(2)</sup>

Desde el punto de vista estructural, la pulpa es, pues, un tejido conectivo laxo intensamente vascularizado e innervado, que parece carecer de circulación colateral y que está constituido, en su mayor parte, por agua, y después, por células, fibras y sustancia fundamental o matriz extracelular.

Las células que podemos encontrar en la pulpa dental, además de abundantes fibroblastos, son, fundamentalmente, de dos tipos: las multipotenciales o de reserva (descendientes de las células indiferenciadas de la papila dental primitiva); y las defensivas o linfocitos, histiocitos, leucocitos polimorfonucleares, macrófagos, células plasmáticas, cebadas y odontoblastos. <sup>(8)</sup>

De todas las células que integran la pulpa dental, el odontoblasto, es la más importante, ya que, encontrándose en la periferia de la pulpa y adyacente a la predentina (unión pulpa-predentina) es el verdadero responsable de la formación y restauración dentinaria. Es, pues, la célula específica del complejo dentino-pulpar, y como tal, contiene todos los orgánulos necesarios para la producción de las proteínas (colágeno) y proteoglicanos que definen la matriz o sustancia fundamental.

Los odontoblastos tienen su origen en las células indiferenciadas periféricas del ectomesénquima de la papila dental, las cuales, bajo la acción inductora del órgano del esmalte, en la fase de campana, no solo aumentan de volumen, sino que adquieren mayor número de organelas en su citoplasma; momento en el que adquieren forma cilíndrica y comienzan a emitir prolongaciones. Estas células así diferenciadas, se conocen como pre-odontoblastos, los cuales, por división mitótica, acabarán más tarde transformándose en odontoblastos y odontoblastos maduros sin capacidad mitótica. Son, pues, células altamente diferenciadas.

Respecto a su morfología señalaremos, que son las células de mayor tamaño de la pulpa, que tienen aspecto cilíndrico, poseen núcleo basal, abundante retículo

endoplásmico rugoso, mitocondrias, aparato de Golgi muy desarrollado y pequeñas extensiones citoplásmicas; y aunque, como hemos dicho, presenta numerosas pequeñas extensiones a lo largo de su cuerpo, en el polo proximal solo posee una única y larga extensión (el proceso odontoblástico) que penetra en el interior de los túbulos dentinarios. Estos procesos carecen de los orgánulos principales propios del cuerpo celular, pero contienen microtúbulos y filamentos cuyas funciones no están del todo determinadas. Desde el punto de vista citoquímico, diremos que, en estas células, no solo se ha descubierto una intensa reacción positiva a la fosfatasa alcalina (enzima ligada a la mineralización) y a la ATP-asa calcio dependiente, sino la presencia de importantes cantidades de calcio, fósforo y azufre; y más recientemente, proteína S-100 a la que se vincula con la actividad biológica intracelular del calcio.<sup>(9)</sup>

Como hemos dicho, el odontoblasto maduro es una célula que ha perdido la capacidad de dividirse, por lo que los nuevos odontoblastos que se originan en los procesos reparativos de la dentina, lo hacen, fundamentalmente, a expensas de los mencionados fibroblastos y células ecto-mesenquimatosas; y aquí, la fibronectina parece tener un destacado papel. Podemos decir, por lo tanto, que, para el diente, el odontoblasto es la célula defensiva más importantes. Importante, porque, tras la formación inicial de dentina, no solo puede modificar la estructura dentinaria (produce continuamente dentina peritubular ante cualquier irritación), sino secretar colágeno o material amorfo, capaz de disminuir la permeabilidad dentinaria frente a sustancias irritantes.

Las fibras que podemos encontrar en la pulpa, son fibras formadas por colágeno tipo I; reticulares de colágeno tipo III asociadas a fibronectina; fibras

elásticas, en escaso número y solo en los vasos,; y fibras de oxitalan (elásticas inmaduras) cuya función todavía se desconoce.

La matriz extracelular o sustancia fundamental, está constituida por agua, proteoglicanos (en la pulpa madura básicamente ácido hialurónico) y, en menor proporción, por condroitin-sulfato. Esta sustancia fundamental amorfa, constituye un verdadero medio interno que aporta a la pulpa los nutrientes necesarios para su supervivencia.

La vascularización y la inervación, llegan a la pulpa a través del foramen apical; y si, inicialmente, tienen un recorrido rectilíneo, cuando alcanzan la zona central, se ramifican, de tal forma, que llegan a constituir un verdadero entramado vascular sobre todo a nivel de la región coronaria subodontoblástica. <sup>(10, 11)</sup>

Algo que consideramos muy importante señalar es que, en la pulpa normal, mucho de los capilares no son funcionantes, por lo que, en una zona determinada y en un momento dado, el flujo sanguíneo puede incrementarse rápidamente sin necesidad de crear nuevos capilares.

Si para Isokava y Kilhara, <sup>(12,13)</sup> la existencia de una verdadera vascularización o circulación linfática en la pulpa es discutible, para Bishop MA <sup>(14)</sup>, Marchetti, <sup>(15)</sup> o Bernick <sup>(16)</sup> la presencia de límfáticos en la pulpa es real, y su función, transportar el necesario fluido pulpar para mantener el balance de líquidos.

Muchos autores, empleando métodos histológicos y funcionales, han descrito anastomosis entre los vasos linfáticos de la pulpa, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, lo que tiene especial importancia porque sugiere que ésta sería la vía de transmisión de la inflamación pulpar a los tejidos vecinos.<sup>(15, 16, 17, 18)</sup>

Desde el punto de vista de la inervación, señalaremos que es doble; es decir, tanto sensitiva como autónoma. En ella podemos distinguir fibras miélicas tipo A de conducción rápida, procedentes del V par craneal; y fibras amielínicas tipo C, de conducción lenta, pertenecientes al sistema nervioso autónomo.

Las primeras son sensitivas y transmiten el dolor; y las segundas, simpáticas que inervan arteriolas. Tanto unas como otras, penetran en la pulpa siguiendo a los vasos; y desde allí, ascienden hasta alcanzar su porción coronal. Las fibras o nervios miélicos son los que en la zona acelular o basal de Weil constituyen el plexo de Raschkow, lugar desde donde unas continúan su recorrido entre los odontoblastos perdiendo su vaina de mielina, y otras, penetran en la predentina y dentina acompañando a las prolongaciones odontoblásticas dentro de los túbulos dentinarios.<sup>(8)</sup> El complejo dentino-pulpar es, pues, estructural y fisiológicamente, el responsable de la sensibilidad dental y sus cambios metabólicos. Elabora y calcifica dentina a lo largo de toda la vida del diente (primaria, secundaria y terciaria) y ejerce una función, no solo nutritiva, sino de sostén y protección. De protección o defensa, porque, por un lado, ante agresiones, biológicas, físicas o químicas, es capaz de formar dentina peritubular; y por otro, inducir la formación de dentina terciaria, incluso, dando lugar a nuevos odontoblastos si ello fuera preciso.

## **I. 2. EL COMPLEJO DENTINO-PULPAR FRENTE A LA AGRESIÓN**

Que el complejo dentino-pulpar constituye una verdadera unidad funcional, tiene su mayor justificación, no solo en el igualitario origen de ambas estructuras, sino en la interrelacionada capacidad de ambas para defender al diente frente a las diferentes agresiones.

Según Massler, <sup>(19)</sup> si la agresión es leve o tiene lugar durante un corto periodo de tiempo, la dentina y la pulpa mantienen su vitalidad porque la lesión se limita a la zona de túbulos afectados; pero si es más grave o de más larga duración, la porción de pulpa subyacente a dicha lesión, podría sufrir infiltraciones celulares, cambios en la sustancia fundamental, trombosis y/o hemorragias, que, conduciéndola hacia la inflamación e inflamación crónica, podría provocar su total necrosis.

El que esto pueda ser así, hace que las agresiones que actúan inicialmente sobre la superficie dentinaria sean estímulos susceptibles de poner en movimiento toda una serie de mecanismos defensivos que tienen que ver con los componentes celulares, vasculares, nerviosos y linfáticos de la pulpa. Mecanismos que, entre otros, pueden resumirse, al decir de Weine <sup>(20)</sup> en sensibilidad, inflamación pulpar, mineralización de la superficie dentinaria y sus túbulos, y neoformación de dentina o dentina terciaria de reparación.

La sensibilidad es un mecanismo de alerta que nos habla de un defecto de esmalte o cemento con cierta exposición de dentina. Indica que existen túbulos

dentinarios abiertos y permeables entre dentina y pulpa; y está causada por el movimiento de líquidos en su interior; un movimiento en varias direcciones (teoría hidrodinámica de Brännstrom), que estimula, no solo a los procesos odontoblásticos, sino a los nervios sensoriales dentino-pulpaes. Este mecanismo puede quedar encubierto por la formación de dentina terciaria.

La inflamación es una reacción defensiva pulpar que se produce como respuesta a una lesión que se ha mantenido durante un tiempo algo más prolongado. Es un mecanismo que trata de destruir al agente irritante en el lugar de la lesión, y trata de evitar que dicha acción se propague a estructuras más profundas. Sin esta respuesta por parte del tejido, la invasión pulpar por bacterias se produciría de forma más rápida y por lo tanto, con características más graves.

Según Weine, <sup>(20)</sup> para destruir al agente agresor en el mismo lugar de la lesión, la inflamación (reacción de los tejidos vivos ante cualquier agresión mecánica, química o microbiana), forma un exudado líquido o edema (respuesta inicial) a la espera de nuevas formas de defensa. Para él, esta inflamación tiene por objeto, acondicionar el terreno para facilitar la posterior reparación del tejido dañado.

El mecanismo de mineralización dentinaria, puede presentarse como consecuencia de abrasiones, caries o preparaciones cavitarias. En esta mineralización no intervienen los odontoblastos, por lo que es un proceso defensivo local más que un mecanismo defensivo interno desarrollado por el propio diente. Tiene lugar porque, durante la preparación de cavidades o remoción de caries, los restos de

material dentario o restos micro-cristalinos, al mezclarse con la saliva los fluidos dentinarios y el agua (barrillo dentinario) terminan por formar una película más o menos compacta que, mineralizándose, no solo acaba cubriendo la superficie de los túbulos, sino que obtura a todos los que han quedado expuestos; con lo que disminuye la sensibilidad dentinaria.

La dentina esclerótica tubular, es una dentina hipermineralizada que se forma como respuesta frente a agresiones superficiales crónicas lentamente progresivas; es decir, frente a la atrición o la caries lenta. Su principal objetivo es crear una barrera defensiva que impida la difusión de las lesiones hacia el interior de la pulpa y, normalmente, coincide con la formación de dentina terciaria de reparación en la pulpa subyacente a la lesión. La presencia de dentina esclerótica (proceso más lento que la mineralización de la superficie dentinaria), supone la oclusión total de los túbulos dentinarios afectados por dentina peritubular. Este mecanismo comienza con la retracción de las prolongaciones odontoblásticas dentro de los túbulos que luego se mineralizan.<sup>(4)</sup>

La presencia de dentina terciaria tiene lugar en aquellos casos en los que agresiones como la atrición de esmalte, los traumatismos, las caries, las yatrogenias u otras, afectan a la dentina y amenazan la integridad de la pulpa. Su estructura irregular, con menor número de túbulos dentinarios que la primaria o secundaria, la convierten en un buen mecanismo defensivo porque le permiten aislar la pulpa del exterior.

Cuando en la pulpa madura se producen lesiones en la capa odontoblástica, como no existe un epitelio que permita la creación de otros nuevos porque son células altamente diferenciadas carentes de capacidad mitótica, las células indiferenciadas de la capa rica en células de la pulpa, no solo se diferencian en ellos, sino que, además, toman el relevo en la formación de dentina de reparación.

La intensidad o gravedad de una lesión viene determinada por el número de túbulos afectados, la distancia a la cámara pulpar y el grado de respuesta inflamatoria. <sup>(21)</sup> De ahí que nosotros pensemos que, la presencia de esta inflamación, podría constituir un factor importante a la hora de analizar estudios que valoran la capacidad de un determinado material para poner en marcha los mecanismos defensivos del diente, y por lo tanto, la propia formación de dentina terciaria de reparación.

Algo que hemos reseñar es que, dentro de esta dentina neoformada, como ya hemos mencionado anteriormente, algunos autores han dado en diferenciar lo que sería propiamente dentina terciaria o reparativa, de lo que ellos denominan puente dentinario o dentina cicatricial; una dentina cicatricial que, para ellos, sería, aquella que se forma gracias a la acción protectora de sustancias o compuestos como el hidróxido de calcio, el óxido de zinc u otros materiales de recubrimiento. Este hecho, sin embargo, es un hecho que no hemos podido confirmar, porque cuando los diversos autores expresan sus resultados en diferentes trabajos sobre el tema, ambos términos son considerados como sinónimos sin diferencia alguna.

Por ello, teniendo esto en cuenta, en nuestro trabajo, nosotros, al no poder observar diferencias conceptuales en la literatura, hemos pensado podíamos considerar como puente dentinario, la formación de una barrera completa y continua de dentina terciaria tras una determinada agresión dentino-pulpar; y llamar dentina terciaria o de reparación a cualquier cantidad de dentina reparativa neo-formada, observada e inducida por la misma razón. Sea como fuere, quizás, a efectos de nuestro verdadero interés, en cuanto a dentina se refiere, nosotros podemos resumir, sin distinción alguna, que, dentina terciaria, es la dentina que general e histológicamente, se conoce como dentina de reparación, irregular o reaccional; o lo que es lo mismo, la dentina neoformada por odontoblastos directamente implicados en una agresión. Una dentina que se produce, generalmente, como respuesta a las agresiones tipo atrición del esmalte o exposición dentinaria y/o pulpar por otras causas.

Otro mecanismo que al parecer indica que la pulpa se defiende o se ha defendido frente a una determinada agresión, es la formación o presencia de calcificaciones pulpaes. Según diversos autores, la calcificación pulpar que puede observarse tras una agresión, es una degeneración tisular o cambio pulpar regresivo no infeccioso que puede ser fisiológico (degeneración cálcica por envejecimiento); patológico por agresión o distrófico por acumulación de sales de calcio en tejidos muertos o en proceso de degeneración. El cómo se forman estas calcificaciones pulpaes, es del todo desconocida, aunque algunos señalan como posibilidad, el aporte de sales debido a la alcalinidad local de los tejidos destruidos. Estas

calcificaciones suelen clasificarse en difusas o fibrilares; y focales o cálculos pulpares.

La calcificación difusa consiste en una acumulación de tejido mineralizado que se define como calcificación pulpar desordenada de causa desconocida y evolución impredecible. Como suelen tener una orientación longitudinal, a veces, también suelen denominarse como calcificaciones lineales o agujas cálcicas. Aunque pueden encontrarse en la cámara pulpar, lo más frecuente es que se sitúen en los conductos radiculares, donde aparecen, generalmente, alrededor de los vasos. En la cámara pulpar pueden encontrarse libres en el tejido o fijos por depósito de dentina a su alrededor.

La calcificación local o focal se presenta en forma de nódulos, dentículos o cálculos pulpares; y aunque son más frecuentes en sujetos de edad avanzada, pueden observarse a cualquier edad. Estos nódulos son más frecuentes en la cámara pulpar que en la pulpa radicular; tienen forma redondeada, estructura laminar concéntrica y ocupan a veces casi la totalidad de la cámara. Las caries u otro tipo de lesiones aumentan su incidencia, aunque también pueden darse en dientes completamente sanos. (2, 20, 21, 22 )

Para finalizar estas generalidades sobre el complejo dentino-pulpar, algo que debemos señalar es que, hoy, cualquier lesión que atraviese la unión amelo-cementaria es considerada como una lesión que afecta a la pulpa; y todo, porque,

como ya hemos mencionado a lo largo de este apartado, desde el punto de vista embriológico, anatómico y fisiológico, dentina y pulpa, son estructuras procedentes del mismo tejido mesenquimatoso embrionario. Una relación que se pone especialmente de manifiesto, sobre todo, en estos mecanismos de defensivos del diente.

### **I. 3. RECUBRIMIENTO PULPAR DIRECTO**

#### *I.3 .1. DEFINICIÓN DEL RPD*

En términos generales, según la FDI, los procedimientos de recubrimiento pulpar son tratamientos endodónticos cuya finalidad está en mantener la vitalidad del complejo dentino-pulpar. Y si ello es así, si consideramos a Jon Hunter (1715) como el primero en describir la formación de una barrera protectora de dentina en zonas abrasionadas o afectadas por caries, no cabe duda que debemos considerar a Phillip Pfaff, dentista alemán, odontólogo de Federico el Grande (Rey de Prusia) como el primero en realizar este tipo de tratamientos; ya que, sobre 1756, el mismo, cubría las exposiciones pulpares mediante piezas de oro o plomo que, con forma de medio guisante de concavidad interna, adaptaba a las cavidades dentales.

En 1826, Leonard Köeker, alemán que vivió en Filadelfia y Londres, más que cubrir, cauterizaba las porciones expuestas de la pulpa, para después tapan la lesión con una fina capa de plomo. Fue el primero en hablar de las posibilidades de una infección focal a partir de la necrosis pulpar. Más tarde, Rogers, en Inglaterra (1857),

Taft en Estados Unidos (1859) y Nidden (1861) en Alemania, sustituyen las piezas o cofias de plomo por láminas de marfil u hojas de estaño. Los materiales de obturación que se utilizaban por aquel entonces, eran la cloropercha, el oxiclurato de zinc o el oxisulfato de zinc.

Uno de los primeros en reconocer la existencia de inflamaciones y abscesos pulpares en los casos de caries profundas fue Witzel (1879); el cual recomendaba el recubrimiento pulpar directo (RPD) sólo en los casos en los que la exposición pulpar había tenido lugar accidentalmente, con lo que estableció el principio de conservación de la vitalidad pulpar.

En 1874, Nitzel, emplea en las exposiciones pulpares un compuesto de tricresol y formalina; Buckley (1904), un algodón empapado en una mezcla de tricresol y formaldehído; Sweet, un preparado a base de óxido de zinc, eugenol y formocresol. Dätwiler, en 1921, estudia, por primera vez, la histogénesis del proceso; y Hess, continuando estos trabajos, establece las bases científicas de los tratamientos que tienen su origen en la pulpa

En 1930, Hermann, al comprobar su capacidad para inducir la formación de dentina terciaria, introduce como material odontológico, al hidróxido de calcio; un material que, desde entonces, en diversas formas, se emplea en todas aquellas técnicas que tienen como base la terapia pulpar. <sup>(22, 23, 24, 25)</sup>

No cabe duda, pues, que, a tenor de lo dicho, tras ese primer RPD realizado por aquel dentista alemán, los estudios de la pulpa y sus posibles tratamiento, cobraron esa gran importancia que ha permitido el mejor conocimiento de las estructuras que constituyen el complejo dentino-pulpar; la búsqueda de nuevos materiales para según que circunstancias; y la diversificación de las técnicas que actualmente se emplean a este nivel; razones por la que hoy podemos hablar de Recubrimiento Pulpar Directo (RPD), Indirecto (RPI), Pulpotomía Parcial o Apicogénesis (PP) o Pulpotomía Total o Apicoformación.

Desde el punto de vista patológico, ante cualquier agresión, la pulpa puede verse afectada en diversos grados. Grados que pueden ir desde una reacción pulpar inflamatoria transitoria reversible, si cesa la agresión o se pone el adecuado tratamiento, hasta, pasando por la pulpitis y la pulpitis crónica, llegar, incluso, a esa necrosis pulpar total que exigiría la total remoción de la misma por cese de su actividad metabólica.

Según Basrani y cols. <sup>(26)</sup> en los casos menos severos, como mecanismo de protección inicial, el tratamiento adecuado es siempre un tratamiento conservador: o un recubrimiento pulpar indirecto (RPI) en el que sólo se elimina la dentina cariada, y sin tocar la pulpa, se permite la acción de los mecanismos naturales de defensa; o un recubrimiento pulpar directo (RPD) en el que, ante su exposición, la pulpa se cubre con un material biocompatible que favorece su recuperación. RPD, cuyo objetivo consiste, por lo tanto, en lograr que la pulpa lesionada, recobre su normal función, a través del estímulo de sus propios mecanismos defensivos.

Esta técnica, desde que Phillip Pfaff la mencionara por primera vez, siempre se ha movido entre la aceptación y la controversia. Por eso, no es de extrañar que, a partir de esa fecha, muchos autores hayan desarrollado, definiciones, conceptos e indicaciones que, no sin discusión, han conformado lo que el RPD y sus aplicaciones son hoy tras diferentes evaluaciones clínica del mismo.

Lasala define al RPD como la protección o recubrimiento de una herida o exposición pulpar mediante pastas o sustancias especiales, con la finalidad de cicatrizar la lesión y preservar la vitalidad de la pulpa; y refiere que por pulpa expuesta o herida, ha de entenderse la solución de continuidad de la dentina profunda con comunicación de la pulpa con la cavidad de caries o superficie traumática que se produce, generalmente, durante la preparación de cavidades y en las fracturas coronarias. <sup>(23)</sup>

Para Mc Donald (1995) el RPD es un método para tratar pequeñas exposiciones pulpares provocadas, accidentalmente, durante la preparación de cavidades o traumatismos dentales; y en el caso de caries, en exposiciones puntiformes que estén rodeadas por dentina sana, libre de contaminación. <sup>(27)</sup>

Camejo Suárez (2000), piensa que éste procedimiento, es un procedimiento que se aplica a la pulpa expuesta, para intentar preservar su vitalidad <sup>(24)</sup>; Fuks (2000) que se trata de una técnica, que consiste, en colocar un agente biocompatible sobre el tejido pulpar saludable que, inadvertidamente, quedó expuesto en un traumatismo o durante la excavación de una caries; <sup>(28)</sup> y para Gani, que consiste en recubrir una pulpa expuesta sana o ligeramente afectada, con una medicación

adecuada que le permita cicatrizar, conservando su vitalidad, salud y actividad funcional.<sup>(29)</sup>

Barbería Leache (2001) señala al RPD como una técnica a emplear solo ante una exposición pulpar mínima debida a yatrogenia o traumatismo; y Dummet y cols. (2003) como la técnica que aplica un medicamento, cura o material odontológico sobre la pulpa expuesta para preservar su vitalidad.<sup>(30, 31)</sup>

Hoy, a modo de resumen, podemos decir que el RPD se define como un procedimiento o técnica en la que se coloca un medicamento y/o material dental sobre la pulpa expuesta, para, aislándola del exterior, no solo impedir su inflamación y posible necrosis, sino facilitar su curación y mantener sus funciones.

### *1.3. 2. INDICACIONES Y CONTRAINDICACIONES DEL RPD*

Sazak y cols. (1996) han señalado que cuando el tejido pulpar es agredido mecánica, traumática, química o bacteriológicamente, se produce una reacción (reversible o irreversible) que es dependiente de la duración, tipo y severidad de la agresión. En una situación reversible, la pulpa se defiende, ella misma, mediante una marcada formación de dentina terciaria o reparativa; mientras que en los casos de irreversibilidad, esta capacidad está limitada, porque se encuentra incluida en una pequeña cavidad de tejido duro que tiene escasa o nula circulación colateral.<sup>(32)</sup>

Teniendo, pues, en cuenta esto, es lógico pensar que los factores que pueden condicionar el éxito o el fracaso del RPD, tengan que ver con el tamaño de la exposición, su ubicación, el tiempo de exposición, la etiología, la presencia o no de contaminación, la salud pulpar previa, la edad del paciente, y por lo tanto, el tipo de dentición en la que tiene lugar dicha exposición pulpar.

Esta terapia, basada en la capacidad de la pulpa para formar nueva dentina tras una agresión, fue sometida en 1981 a una evaluación clínica a largo plazo por Baume y Holz los cuales señalaron que la inflamación pulpar pre o post-tratamiento, tenía gran importancia en el éxito del RPD; razón por la que restringen su empleo a los casos en los que la pulpa no está inflamada y el sellado es verdaderamente hermético.<sup>(33)</sup>

En este sentido, Cox y cols (1985); Swift, Trope y Ritter, llegan a afirmar que la cicatrización pulpar depende más de la capacidad del material de recubrimiento para evitar la micro filtración bacteriana, que de las propiedades específicas del mismo. Y Camp, que, aunque el RPD pueda estar indicado en exposiciones pulpares mecánicas rodeadas de dentina sana, descartar signos de inflamación o degeneración irreversible es preceptivo.<sup>(34, 35, 36)</sup>

Autores como Stanley (1989 y 1998) y Long (1996) indican el RPD en las exposiciones pulpares de dientes jóvenes y sanos debidas a traumatismos o yatrogenias en la preparación de cavidades<sup>(37, 38, 39)</sup>

Seltzer y Bender (1987) <sup>(40)</sup> consideran indicaciones del RPD, las pequeñas exposiciones pulpares por caries; las que tienen lugar durante procedimientos operatorios o las que surgen como consecuencia de traumatismos con fracturas dentales; sobre todo, cuando el diente afecto no tiene completamente formados sus extremos radiculares. Estos autores no dejan de reconocer, sin embargo, que, en exposiciones cariosas no resulta muy recomendable, porque determinar, en estas circunstancias, el grado y extensión de la inflamación pulpar no les parece clínicamente viable.

Matsuo y cols. <sup>(41)</sup> (1996), debido a que ellos obtuvieron con esta técnica, hasta un 81% de éxitos en exposiciones debidas a caries, señalan que el empleo de la misma, en estos casos, no puede contraindicarse de manera absoluta; siendo, sin embargo, imprescindible, la adecuada selección de los mismos en esta técnica.

Lasala (1992) <sup>(23)</sup> refiere que la principal indicación del RPD estaría en aquellas heridas pulpares que se producen en un diente joven sano, como consecuencia de traumatismos accidentales o preparación de cavidades; también recomienda que dichas exposiciones sean menores de 1mm. Para Fuks, <sup>(28)</sup> el que un diente esté asintomático, la exposición pulpar sea puntiforme y el lugar de la exposición esté libre de contaminantes orales, podría ser una buena indicación para realizar un RPD, aunque no le parece indicado en dientes decíduos.

Para Cvek, que refiere un 96% de éxito en RPDs y pulpotomias parciales realizadas con Hidróxido de Calcio, ni el tiempo transcurrido entre el accidente y el

tratamiento, ni el tamaño de la exposición pulpar, influyen en el éxito o fracaso de un RPD. <sup>(42, 43, 44)</sup>

Respecto a RPDs en dientes temporales, hemos de señalar, que, para autores como Escobar o Boj, aunque los mismos en dentición primaria parezca tener pocos adeptos; poca eficacia debido al progreso rápido de los cambios patológicos pulpares, y su capacidad de curación se señale como escasa, este tipo de tratamiento podría efectuarse en los casos de exposiciones mecánicas o traumáticas pequeñas, con inflamación pulpar mínima o nula, sin movilidad en el diente y hemorragia controlable. <sup>(45, 46)</sup>

Según Kennedy y Kapala, el fracaso del RPD en dentición primaria se debe, más que a la técnica en si misma, al alto contenido celular del tejido pulpar primario, donde las células mesenquimatosas indiferenciadas al transformarse en odontoclastos, provocan reabsorciones internas o abscesos dento-alveolares agudos. Para ellos, las condiciones de un RPD, en este tipo de dentición, deben ser óptimas para que la respuesta al tratamiento pueda ser favorable; y tras el mismo, efectuarse controles periódicos para verificar que no se han producido reabsorciones internas o alteraciones en furca y periápice. <sup>(47)</sup>

Para Elena Barbería (2001), el recubrimiento pulpar directo, solo debe realizarse en los casos con exposición pequeña reciente (no más de 24 horas), y/o en aquellas situaciones en las que existe una cantidad de corona suficiente, como para

poder restaurar la cavidad sin peligro de que aparezcan o se produzcan contaminaciones.<sup>(30)</sup>

El RPD para Fernando Escobar estaría indicado en exposiciones dentinarias pequeñas y sanas, menores de 2 mm de diámetro, en dientes permanentes o temporales jóvenes carentes de signos o síntomas pulpares, y siempre, que su realización tuviera lugar en campo esterilizado con absoluto aislamiento; y para Gani en las heridas pulpares; entendiéndose como tales las exposiciones pulpares, libres de inflamación, debidas a una maniobra operatoria inadecuada o traumatismo en campo libre de caries.<sup>(45, 29)</sup>

Álvarez AI y Ruiz del Árbol LJ, opinan que, en algunos casos, la exposición clínica real de la pulpa en un diente permanente joven, hace que el RPD sea adecuado si se produce una serie de circunstancias: que sea una exposición mecánica menor de 1mm; que sea causada por una preparación cavitaria excesiva con dique colocado; que, en caso de que sea debida a caries, la exposición sea puntiforme y con dentina sana alrededor; que la exposición se haya producido en un diente radiográficamente asintomático y con hemorragia controlable; que sea debida a traumatismos con poco tiempo de evolución o se haya producido como consecuencia de una fractura coronal.<sup>(48)</sup>

Fregoletto señala que las exposiciones pequeñas con buena irrigación, son las mejores candidatas para un RPD; y Stanley que, más que el tamaño de la exposición,

lo más importante para el éxito de este tipo de tratamiento, es la realización cuidadosa y depurada de la técnica. <sup>(49, 38)</sup>

Según se desprende, pues, de la literatura, en términos generales, se consideran como indicaciones para realizar un RPD el que: la exposición pulpar sea pequeña o puntiforme; menor de 1mm y localizada en el cuerno pulpar; sea una exposición de pocos minutos (no de horas); en pacientes jóvenes con dientes permanentes jóvenes o temporales; a ser posible, no debida a caries; cuando la operatoria se realice con buen aislamiento del campo de trabajo; y siempre que no existan evidencias de síntomas pulpares. <sup>(50)</sup>

Por lo tanto, a tenor de lo dicho, hemos de señalar que, a la hora de decidir efectuar un RPD en una determinada afección o exposición pulpar, la selección del diente cobra especial importancia. Hay que descartar la presencia de inflamación y degeneración pulpar irreversible; descartar la presencia de calcificaciones en la cámara o conductos pulpares, porque indican la existencia de traumatismos o respuestas inflamatorias anteriores (motivo de muchos fracasos); descartar las odontalgias espontáneas nocturnas, el ensanchamiento del ligamento periodontal, los signos radiográficos degenerativos en ápices o furcas, la hemorragia no controlable durante la exposición o la presencia de exudado purulento; y ello, porque todos y cada uno de estos puntos constituyen verdaderas contraindicaciones para realizar esta técnica con éxito.

El éxito o fracaso de un recubrimiento pulpar directo, pues, depende, fundamentalmente, de la exactitud con que se evalúe el estado de la pulpa. Si la pulpa está sana, la respuesta, generalmente, será buena; y si no lo está, la exposición es muy grande o ha podido contaminarse, la respuesta será mucho más desfavorable.

### *1.3. 3. TÉCNICA DEL RPD*

Una vez seleccionado correctamente el diente según conceptos expresados con anterioridad, no cabe duda que, a la hora de iniciar el tratamiento, el que el campo operatorio esté completamente limpio y los dientes en perfecto aislamiento, resulta de vital importancia para el éxito del mismo, sobre todo, si hemos decidido efectuarlo en una exposición por caries. En los casos en los que la exposición fue debida a traumatismo o accidente dentro del alguna otra intervención, el RPD debe efectuarse lo más rápidamente posible. La técnica, habitual, seguida por todos los autores, no tiene mayores complicaciones:

1. - Tras anestesiar localmente el diente, colocar el dique de goma y lavar, a ser posible, con suero fisiológico tibio, se observa la cavidad y /o exposición pulpar determinando su tamaño, tipo de sangrado y estado de la dentina que rodea a la exposición; y ello, porque como ya hemos dicho, un sangrado rojo brillante, que puede ser controlado, indica siempre un proceso localizado con grandes posibilidades de éxito; mientras que un sangrado oscuro, difícil de controlar, supone siempre un mal pronóstico.

En el caso de que hubiéramos decidido realizar el RPD en una exposición debida a caries, no cabe duda que, a lo anterior, habría que añadir la apertura y eliminación total del tejido careado, valorando, al mismo tiempo, la mayor o menor posibilidad de que se haya producido o no contaminación bacteriana del resto de la pulpa. Por ello, en estos casos, algunos autores preconizan la utilización de sustancias antisépticas aplicadas con torunda de algodón.

2. - Una vez hemos lavado, debemos secar con algodón, porque si usamos el spray agua-aire comprimido, no solo podemos introducir contaminantes en la pulpa, sino irritarla aún más; y por lo tanto, incrementar el daño que el traumatismo, la yatrogenia o la caries, hubieran podido provocar.

3. - Ya, ante la pulpa expuesta, el material recubridor se aplica, únicamente, sobre la exposición pulpar mediante aplicador o jeringuilla. Actualmente, el material de elección en el recubrimiento pulpar directo sigue siendo el *Hidróxido de Calcio*, el cual, debe ser aplicado, en capa fina, cuidadosamente, y sin presionar sobre la pulpa expuesta.

Aunque cualquier producto comercial patentado de este material, estando bien conservado, es igualmente válido, no dejan de existir autores que recomiendan que el *Hidróxido de Calcio* sea puro pro-análisis.

4. - Una vez aplicado el material recubridor, el mismo, se seca con algodón; se retiene con cualquier material que selle perfectamente la cavidad (ionómero de

vidrio u óxido de zinc eugenol- IRM) y se obtura con amalgama o composite para restaurar el diente.

Autores como Álvarez AI y Ruiz del Árbol LJ, recomiendan que el recubrimiento pulpar directo en dientes permanentes jóvenes, se haga con *Hidróxido de Calcio* de fraguado rápido; que antes de efectuar la obturación definitiva, se coloque un material provisional para asegurar el éxito del tratamiento, y que, logrado el éxito, se efectúe dicha reconstrucción definitiva. Es decir que el RPD se realice en dos tiempos. <sup>(30, 46, 48)</sup>

Una vez realizado el RPD, con objeto de asegurar el éxito, casi todos aconsejan hacer seguimiento clínico y radiológico cada dos tres meses.

#### **I. 4. MATERIALES EN EL RECUBRIMIENTO PULPAR DIRECTO**

Dada la gran cantidad de materiales que se han empleado, emplean o están en fase de estudio dentro de la Odontología, en este trabajo de investigación que analiza las posibilidades de uso de un extracto de *Caléndula Officinalis Lnn. Europea* en el RPD, solo hablaremos de los que con más frecuencia se han empleado en esta técnica, y dentro de ellos, fundamentalmente, del *Hidróxido de Calcio*; material de elección según la literatura <sup>(5,36)</sup> y material control en el presente trabajo de Tesis Doctoral.

Antes que nada, debemos señalar que como el material ideal, de momento, no parece existir, en cualquiera de los empleados hasta ahora, incluido el *Hidróxido de*

*Calcio*, encontraremos ventajas e inconvenientes. Ventajas e inconvenientes que justifican, como en tantas otras técnicas, la investigación en este campo.

Según Moreira (2002), las características de un material ideal protector pulpar, están en aquellas cualidades que le permiten: proteger al complejo dentino-pulpar contra los choques térmicos y/o eléctricos; ser biocompatible; estimular la formación de dentina terciaria; inhibir la actividad bacteriana (ser bactericida o bacteriostático); proteger la pulpa frente a la infiltración por microorganismos; esterilizar la dentina sana o infectada (ser antiséptico); mineralizar o remineralizar la dentina desmineralizada; en caso de caries, hipermineralizar la dentina sana posterior a la remoción del tejido (esclerosis de los túbulos); proteger al tejido profundo de las posibles acciones irritativas de los materiales de restauración definitiva; y permitir un correcto cierre marginal. <sup>(51)</sup>

#### *1. 4. 1. RPD CON HIDRÓXIDO DE CALCIO*

Antes de que el *Hidróxido de Calcio* fuera introducido por Herman como agente terapéutico pulpar (1930), el tratamiento a este nivel consistía en desvitalizar la pulpa mediante arsénico u otros materiales de fijación. Hoy, no sin controversia, tras la demostración por este autor de que dicho material era capaz de inducir la formación de dentina terciaria, el Hidróxido de Calcio, se utiliza, habitualmente, en todas aquellas técnicas odontológicas que tienen como base la terapia pulpar: Recubrimiento Pulpar Directo (RPD), Indirecto (RPI), Pulpotomía parcial o Apicogénesis (PP), y Pulpotomía total (PT) o Apicoformación.

Desde el punto de vista físico-químico, el Hidróxido de Calcio ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ), es un polvo blanco, fino, inodoro e insípido, que no fragua y se obtiene por calcinación del carbonato cálcico; es pues, un material, altamente alcalino, poco soluble en agua, que debe conservarse en frascos oscuros bien cerrados porque, expuesto al medio ambiente, vuelve a transformarse en carbonato cálcico al reaccionar con el dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) de la atmósfera; en cuyo caso, odontológicamente, vuelve a ser inactivo a nuestros fines. Para uso en diversas técnicas, este material puede encontrarse bajo dos formas: una que no fragua (Hidróxido de Calcio Puro); y otra fraguable en la que, constituyendo verdaderos cementos, con objeto de obtener determinadas propiedades, se encuentra vehiculizado o asociado a otros materiales.

El Hidróxido de Calcio Puro, de pH 11-12, suele prepararse con suero fisiológico, agua destilada o bi-destilada. Puede aplicarse directamente sobre la pulpa y tiene indicaciones muy concretas: el RPD, la Apicogénesis y la Apicoformación; técnicas, estas últimas, en las que, para estimular el cierre apical en dientes que no han completado su raíz, se aplica dentro de la cámara pulpar o dentro de la cámara pulpar y los conductos radiculares respectivamente. En estos casos, el mismo debe ser cubierto con algún cemento que pueda fraguar y endurecer.

En los llamados Hidróxidos de Calcio fraguables, pH 9-11, podemos distinguir dos clases: los que están constituidos por una pasta base de sulfato de bario, fosfato de calcio o tungstato de calcio, y una pasta catalizadora de hidróxido de calcio, óxido de zinc, estearato de zinc o etil-tolueno-sulfonamida (sistema pasta-pasta); y los que se presentan bajo la forma de pasta única, fotopolimerizables, que

contienen una resina de uretano-metacrilato, a la que se ha añadido un agente responsable de la fotopolimerización. <sup>(52)</sup>

También, en este sistema pasta única, podemos encontrar al Hidróxido de Calcio asociado a diferentes componentes que, no solo tienen que ver con el hecho de hacerlo fraguable, sino con el de dotarlo de ciertas características, muchas veces necesarias: ser radiológicamente opaco (bario), antimicrobiano (asociado a algún antibiótico) o antiséptico (asociado a la etil-tolueno-sulfonamida).

En la práctica diaria es importante conocer que, dentro de los Hidróxidos de Calcio que endurecen, existen dos tipos de preparados: los que poseen componentes solubilizables por la acción de los ácidos, los fluidos de la boca o la presencia de agua (hidrofilicos); y los que poseen componentes resistentes a los ácidos que no permiten la difusión del agua en su estructura (hidrofóbicos). Los primeros liberan Hidróxido de Calcio favoreciendo las acciones que estimulan la dentinogénesis; y los segundos, con menor acción sobre la dentina, los que liberan iones calcio de una forma más lenta y difícil.

Comparados con otros materiales, los preparados de Hidróxido de Calcio fraguables se caracterizan por tener poca resistencia a la tracción y compresión; ser buenos aislantes térmicos, mecánicamente poco resistentes y ser altamente solubles en agua y fluidos orales, razón por la que estos cementos, con el paso del tiempo, llegan a desaparecer del fondo de la cavidad donde se han aplicado.

Desde el punto de vista químico, podemos decir que, dependiendo de los niveles de calcio y la capacidad para liberar iones hidroxilos (OH) tras el endurecimiento, estos cementos de Hidróxido de Calcio, fraguables, en contacto con los tejidos vivos, provocan un rápido aumento del pH tanto en la dentina como en el esmalte circundante, sin que, por ello, se modifique el del propio cemento. <sup>(52)</sup>

Algo que cabe señalarse es que, según Fava y Saunders, <sup>(53)</sup> las propiedades que este material posee, pueden cambiar dependiendo del vehículo o estado en el que se aplique (acuoso, viscoso u oleico). Para ellos, comparados con el estado acuoso (hidróxido de calcio vehiculizado por agua destilada, destilada estéril o bidestilada), los estados viscosos (vehiculizados por glicerina, polietilen-glicol o propilen-glicol) y oleosos (por aceite de oliva o ácidos grasos), son los que más prolongan su acción. El Hidróxido de Calcio, además, podría asociarse a otros componentes que, como la clorhexidina, los corticoides o los antibióticos añadirían o potenciarían capacidades como la antiséptica, la antiinflamatoria y/o la antimicrobiana.

Entre las propiedades básicas que la literatura sanciona como factor importante para su utilización en Odontología, está su reconocida capacidad para inducir la formación de tejido duro, dentina terciaria y/o puentes dentinarios, cuando entra en contacto con el tejido pulpar y/o periapical.

Para unos, esta capacidad reside en que su gran alcalinidad activa el mecanismo formador de fosfatasa alcalina (importante en los procesos de mineralización sobre todo a pH 10); y para otros, en los propios iones calcio (Ca<sup>+</sup>),

los cuales, no solo aumentan la concentración tisular de los mismos al disminuir la permeabilidad capilar, sino que favorecen, además, un incremento de la actividad de esas mismas enzimas.

Aunque el mecanismo de la formación de dentina terciaria tras recubrimiento pulpar directo con este material no está del todo claro, Graham, Cooper y cols.<sup>(54)</sup> (2006), piensan que, en este mecanismo, factores de crecimiento y otras moléculas bioactivas propias de la matriz dentinaria pueden ser liberadas ante su presencia; y éstas, mediar en los cambios que se observan durante la regeneración tisular o la formación de puentes dentinarios.

Existen, sin embargo, experimentos con iones calcio radioactivos que parecen demostrar que los iones calcio procedentes del hidróxido, no participan en la neo-formación dentinaria, haciéndolo, sin embargo, los iones calcio procedentes de la circulación sanguínea.

Sea como fuere, y en este sentido, lo que para unos sería inducción debido a las características alcalinas del material, para otros, es el calcio del material quien forma parte del tejido neo-formado.

Canalda y Brau, (2001)<sup>(55)</sup> en un estudio realizado “in vitro”, sostienen que el efecto mineralizador del Hidróxido de Calcio puede explicarse también por la inhibición de la producción de prostaglandinas; por lo que más que por favorecer la

reparación tisular (osteogénesis y cementogénesis), el mismo, actuaría inhibiendo la acción lítica de estas prostaglandinas sobre los tejidos calcificados.

Lo mismo que ocurre con respecto a ciertas propiedades generales, las acciones y mecanismos de acción del Hidróxido de Calcio, como ya hemos señalado, no están bien aclaradas; aunque existen, autores que piensan, no sin controversia, que están relacionadas con su capacidad para disociarse en iones calcio ( $\text{Ca}^{+}$  54,11%) e iones hidroxilo ( $(\text{OH})^{-}$  45,89 %).

Estas acciones, que justifican su empleo en Odontología, pueden resumirse en que, este material, genera barreras mecánicas de cicatrización; favorece la formación de dentina terciaria y/o puentes dentinarios; tiene efectos anti-microbianos (bactericidas o bacteriostáticos); disminuye la permeabilidad dentinaria y es capaz de disolver el material necrótico.

Según la literatura, cuando el Hidróxido de Calcio se aplica al tejido pulpar, su marcado carácter básico provoca una necrosis superficial coagulativa del tejido subyacente, bajo la cual, el mismo, mantiene la alcalinidad necesaria para formar hueso y dentina. <sup>(27)</sup>

Según Stanley, Gainesville y Lundy, <sup>(56)</sup> el Hidróxido de Calcio actúa como una barrera protectora del tejido pulpar, no solo bloqueando los túbulos dentinarios expuestos, sino neutralizando el ataque de ácidos orgánicos provenientes de algunos cementos y materiales de obturación. Para ellos, aplicado directamente sobre la pulpa

vital expuesta, este material es capaz de estimular la formación de puentes de dentina reparativa.

En efecto, estos autores realizaron un estudio en 35 dientes de 10 pacientes comprendidos entre 22 y 47 años de edad, en los que, intencionadamente, provocaron una exposición pulpar para, posteriormente, efectuar recubrimientos pulpares directos (RPDs) con Dycal. Tras evaluar al microscopio su efecto, los mismos, pudieron concluir que el tejido necrosado por, y en contacto directo con el Dycal, era reabsorbido y reemplazado por dentina terciaria.

Para Wakabayashi, Horiwaka y cols, <sup>(57)</sup> cuando el Hidróxido de Calcio se aplica directamente sobre la pulpa dental expuesta, lo primero que ocurre, y casi inmediatamente, es la formación de una barrera precipitada, bajo la cual, debido a la migración, proliferación y diferenciación de las células pulpares, se producen nuevas deposiciones dentinarias.

Según estos autores, la presencia de iones hidroxilos mantiene el suficiente estado local de alcalinidad como para que la división celular y la formación de matriz dentinaria tengan lugar. Estos iones hidroxilos también parecen ser los responsables de la mencionada necrosis inicial que estimula a las células pulpares sanas adyacentes.

También para Subrammaniam, Konde y Prashanth <sup>(58)</sup> (2006), los efectos terapéuticos del Hidróxido de Calcio dependen de su disociación en iones calcio  $\text{Ca}^+$  y iones hidroxilos  $(\text{OH})^-$ ; los cuales, determinando una gran alcalinidad local,

podrían ser los responsables de la deposición de tejidos por activación de la enzima adenosín- trifosfato (ATP), que, como es sabido, acelera la mineralización de tejidos como la dentina y el hueso. Esta disociación, además, podría modificar el pH ambiental en áreas de inflamación, favoreciendo con ello, no solo la división celular y la mineralización de la matriz dentinaria, sino la actividad antimicrobiana (bactericida o bacteriostática) de este material frente a bacterias como los Estafilococos y Estreptococos.

Según Schöder (1985);<sup>(59)</sup> Stanley y cols (1989) <sup>(37)</sup> y Stanley (1998),<sup>(38)</sup> histológicamente, tras RPDs con Hidróxido de Calcio Puro y otros productos que contienen Hidróxido de Calcio (estudio realizado a diferentes valores de pH con Hidróxido de Calcio original más agua, solución salina o Pulpdent), la cicatrización se produce por zonas; y así señalan que: a los 60 minutos, tras contacto con el Hidróxido de Calcio, aparece en el tejido pulpar una zona de obliteración de cambios tempranos, efectos cáusticos (cauterización química) y áreas de desbridación superficial, en la que se distinguen, fundamentalmente, restos celulares, fragmentos de dentina, hemorragias, coágulos, pigmentos sanguíneos y partículas del material empleado.

Más allá de la zona de obliteración, aproximadamente a las seis horas de la agresión, describen una zona de necrosis por coagulación y trombosis capilar de 0.3 a 0.7 mm de espesor (tejido momificado o desvitalizado) en la que, aparte escaso infiltrado inflamatorio, la estructura tisular se conserva aunque algo alterada. Más profundamente, situada entre la necrosis por coagulación y el tejido pulpar vivo

subyacente, aparece la que llaman zona o línea de demarcación, la cual se distingue por la presencia de una serie de células inflamatorias que han emigrado al interior de la herida. Y finalmente, hablan de una zona densa o estado temprano de neoformación dentinaria (que llaman puente de dentina) bajo la cual encuentran otra de calcificación, en la que tiene lugar el desarrollo de la predentina.

Para Stanley, pues, los pasos que llevan a la cicatrización del tejido, son básicamente similares a los de cualquier herida en el tejido conjuntivo. Comienza por cambios vasculares, para, pasando por la migración, infiltración y proliferación de células de la pulpa, llegar al estado de reparación. Un estado de reparación en el que se forma predentina y dentina tubular, si los dientes son sanos y jóvenes; y atubular si son viejos. <sup>(37)</sup>

También para Yamamura <sup>(60)</sup> la formación de dentina o puente dentinario se produce en cuatro etapas: exudativa, proliferativa, osteodentinaria y de formación de dentina tubular.

En una revisión efectuada en el año 2000, Schuurs, Gruythuysen y Wesselink, refieren que a los siete días post-tratamiento, sea pulpotomía o RPD, también, cuando el material empleado es el Hidróxido de Calcio, en el tejido pulpar subyacente a su aplicación, se producen tres zonas de necrosis claramente diferenciadas: superficial momificada; intermedia con iones hidroxilos neutralizados, y apical (con células inflamatorias) en la que los macrófagos remueven el tejido necrótico. <sup>(61)</sup>

Para ellos, cuando la dentina recibe un estímulo lo suficientemente agresivo como para que se destruyan los odontoblastos, los fibroblastos y células mesenquimatosas indiferenciadas de la pulpa, son estimuladas, de tal forma, que, no solo favorecen la aparición de nuevos odontoblastos, sino, además, la secreción de matriz dentinaria y las funciones de mineralización que con anterioridad realizaban los odontoblastos destruidos.

Según Yoshida y cols. <sup>(62)</sup> la fibronectina (glicoproteína fibrosa de la matriz extracelular) unida a la TGF- $\beta$ 1 (un precursor del factor de crecimiento) parece estar en la base del estímulo citológico de esta diferenciación y formación de dentina de reparación. Según estos autores, a las 24 horas de realizado el RPD con Hidróxido de Calcio, conjuntamente, puede observarse entre la zona necrótica y el tejido pulpar subyacente (junto a restos celulares) una estructura o precipitación cristalina asociada a matriz de esmalte (TEM); a los 14 días, inmuno-histoquímicamente, un conjunto de células alargadas, similares a odontoblastos, adyacentes a una matriz irregular fibronectina- positiva; y a los 28, la sustitución de esa matriz fibrosa irregular por otra similar a dentina tubular.

Esta nueva matriz, así constituida, contiene componentes celulares y vasculares de la pulpa que están organizados irregularmente, por lo que a esta dentina, así formada, se la denomina, como ya hemos mencionado en el anterior apartado, como irregular, reactiva, de respuesta, atubular o terciaria. Su formación, como acabamos de ver, es un proceso que, aproximadamente, parece desarrollarse, entre el primer y tercer mes post-tratamiento.

En los recubrimientos pulpares directos (RPDs) con Hidróxido de Calcio Puro, la formación de dentina terciaria tiene lugar entre la zona de necrosis y la capa subyacente de pulpa vital (zona de demarcación); mientras que en los casos en los que se emplean materiales fraguables, la misma, ocurre, inmediatamente, por debajo del material. En el primer caso, la dentina terciaria neoformada o puente dentinario, puede ser visible, radiográficamente, porque la zona de necrosis lo separa de la capa de Hidróxido de Calcio; mientras que en el segundo, al no existir suficiente tejido destruido, el puente se forma junto al material, haciendo imposible la distinción radiológica. Según Gómez M., la dentina terciaria o reparativa aparecería al final del primer mes post-tratamiento para perfeccionarse posteriormente.<sup>(63)</sup>

Para valorar histológicamente la formación de dentina terciaria o puente dentinario inducido por Hidróxido de Calcio, Cox, Subay, Ostro y cols.<sup>(64)</sup> realizaron un estudio en 235 dientes de 14 monos rhesus en los que observaron un total de 192 puentes de dentina. De estos, el 89% presentaban los llamados defectos túnel; y el 41% se encontraban asociados con inflamación pulpar o necrosis. Según estos autores, dicha inflamación y necrosis, se habría producido por la agresión pulpar de irritantes llegados a ella a través de dichos defectos; lo que indicaba fallos en cuanto a la obtención del perfecto sellado y la existencia de microfiltraciones en los RPDs realizados con este material.

Respecto a la aplicación en el RPD de un Hidróxido de Calcio en polvo o en pasta, Pereira, Bramante, Berbera y Mondelli<sup>(65)</sup> realizaron un trabajo en 70 dientes de perros con exposición pulpar intencionada. Estudiaron histológica y

radiográficamente el efecto de ambas presentaciones a los 2, 30, 70 y 120 días post-tratamiento; y, en cuanto a repuesta pulpar se refiere, llegaron a la conclusión de que no existían diferencias respecto a utilizar una, otra o ambas formas de presentación de este material en el RPD.

Uno de los problemas que siempre se han planteado a la hora de evaluar el éxito o fracaso de los tratamientos pulpares, ha sido la posibilidad de que los mismos puedan deberse o estén relacionados con la existencia o no de microorganismos presentes en el tejido pulpar por afecciones, traumatismos dentales o llevados por la técnica. Pues bien, Safavi y cols. valoraron el efecto antimicrobiano del Hidróxido de Calcio sobre gérmenes como el *S. Faecium* (muy frecuentes en el canal radicular), *S. Fecalis*, el *S. Mutans*, la *B. Gingivalis*, la *B. Fragilis* y otros microorganismos Gram-negativos anaerobios. Para ellos el Hidróxido de Calcio resulta efectivo a la hora de evitar la infección pulpar de los conductos por microorganismos. <sup>(66)</sup>

En otro trabajo, este mismo autor (1994), comparó el efecto antibacteriano del Hidróxido de Calcio con el yoduro de potasio iodado al 2% encontrando que el porcentaje de cultivos negativos (77,4%) era superior cuando se empleaba el Hidróxido de Calcio. <sup>(67)</sup>

Para, Cvek, Hollender y Nord (1976), Cvek, Nord y Hollender (1976) Bystrom y cols. (1985) y Safavi y cols. (1985), la aplicación de Hidróxido de Calcio en los conductos radiculares elimina completamente las bacterias, considerándolo, en este sentido, superior a medicamentos como el fenol y el para-monoclorofenol

alcanforado. Y abundando en lo mismo, Matsumiya y Kitamura, señalan que la aplicación de Hidróxido de Calcio en el conducto radicular durante las endodoncias conduce a una progresiva desaparición de las bacterias en conductos infectados. (68, 69, 70, 71, 72)

Ya hemos mencionado con anterioridad, que, aunque los mecanismos de acción del Hidróxido de Calcio no están del todo aclarados, muchas de sus acciones se relacionan con su capacidad para disociarse, en iones calcio y iones hidroxilos en los tejidos. Pues bien, en este sentido, su actividad antimicrobiana también parece asociarse a esta capacidad, ya que en los tejidos inflamados, la disociación, al transformar el medio ácido de la inflamación en un medio altamente alcalino, impide la proliferación bacteriana. No en vano se ha dicho que una alcalinidad elevada es incompatible con la vida.

Para Siqueira,<sup>(73)</sup> el efecto antimicrobiano del Hidróxido de Calcio se debe especialmente a su alcalinidad ya que la misma determina la degradación de los lipopolisacáridos bacterianos. El que esto sea así, no contradice, sin embargo, el que digamos que el control y eliminación de las infecciones en los tratamientos con Hidróxido de Calcio, no puede atribuirse totalmente al mismo sea cual sea el producto empleado, porque, en realidad, dicha eliminación, no solo depende de los tratamientos, sino también de los mecanismos de defensa del tejido huésped.

Lo que sí se puede afirmar es que, contando con la capacidad defensiva de los tejidos, el Hidróxido de Calcio ayuda a eliminar los microorganismos que pudieran infectar la dentina y/o la pulpa.

También para Foreman y Barnes,<sup>(74)</sup> el Hidróxido de Calcio en su forma pura, debido a su alto pH, además de estimular la mineralización, también posee propiedades antibacterianas. Propiedades, que según Ali Çagin, Abdurrahman Aksoy y cols.,<sup>(75)</sup> en un trabajo realizado en 2007, señalan están determinadas por la mencionada liberación de los iones hidroxilo. Una liberación, sin embargo, que requiere de su tiempo para producir la destrucción efectiva de los microorganismos que actúan directa o indirectamente en los túbulos dentinarios.

Otro mecanismo por el cual se piensa actúa la disociación del Hidróxido de Calcio sobre las bacterias parece estar en que no solo inhibe las enzimas de la membrana citoplasmática de las mismas y el transporte de nutrientes, sino en que altera su composición, ya que los iones hidroxilos destruyen los fosfolípidos que constituyen la estructura de dicha membrana; efecto tóxico que impide la proliferación de los mismos.

Esto parece estar corroborarse en algunos trabajos de Momson y Ryan, los cuales señalan que este material de recubrimiento es capaz de alterar las propiedades biológicas del lipo-polisacárido bacterial. Para ellos, este lipo-polisacárido, componente de la pared celular de las bacterias gram-negativas, juega un papel importante en la reabsorción de hueso periapical, ya que estimula la secreción de

mediadores en la reabsorción de hueso y la producción de macrófagos en el huésped. Estos macrófagos producirían citoquinas; las citoquinas estimularían la inflamación, y sus células, contribuirían a la eliminación de las bacterias. <sup>(76)</sup>

Gardner, Mitchell y Mc Donald,<sup>(77)</sup> para analizar los efectos de una mezcla de Hidróxido de Calcio con vancomicina, realizaron un estudio en dientes permanentes de monos con pulpas infectadas. Llegaron a la conclusión de que esta combinación era efectiva contra las bacterias gram positivas y negativas; observando, además, que dicha combinación, era mucho más efectiva para estimular la formación de puentes dentinarios que el Hidróxido de Calcio solo.

Podemos decir, en resumen, que como han demostrado Mani, Verde, Boj, Nobuke y otros autores en numerosas y variadas investigaciones, el Hidróxido de Calcio es un material que favorece la reparación del tejido pulpar en todas aquellas técnicas donde se aplica, aunque no carece de inconveniente. Inconvenientes como la necrosis que provoca en el tejido subyacente a su aplicación; su extremada toxicidad para las células del tejido pulpar (acción cáustica de su pH cuando se solubiliza) tras RPDs o pulpotomías; la aparición, en dientes temporales, de fenómenos de reabsorción interna (según Sorbe por mantenimiento de la inflamación y/o estímulo de las células mesenquimatosas a transformarse en osteoclastos) o la mineralización completa del tejido pulpar de los conductos; razones todas por las que hay quien, estando a favor del RPD con este material, solo lo aconsejan en aquellos dientes en los que la raíz no ha completado su formación. <sup>(78, 79, 80, 81, 82)</sup>

Algo que debemos señalar, también en este sentido, es que, el Hidróxido de Calcio carece de capacidad curativa sobre la inflamación, lo cual podría ser importante a la hora de compararlo con el efecto antiinflamatorio que desde siempre se ha atribuido a las preparaciones de *Caléndula Officinalis Linn.*

Hay quienes comentan que el Hidróxido de Calcio no es el mejor material, porque sus efectos antimicrobianos son de corta duración y las microfiltraciones que pueden tener lugar bajo las restauraciones muy frecuentes. Un hecho este que permite la invasión o colonización bacteriana.

#### *I. 4. 2. RPD CON ÓXIDO DE ZINC-EUGENOL*

Dada la importancia que tienen sus componentes y que el óxido de zinc-eugenol se ha empleado y sigue empleándose (aunque con mayor concreción) en estomatología, hemos pensado sería interesante hablar primero de las propiedades e inconvenientes de cada uno por separado, para luego centrarnos en la asociación que constituye este cemento o material odontológico empleado también por algunos autores en el RPD.

Respecto al Eugenol (esencia de clavo), comenzaremos diciendo que es un derivado fenólico conocido comúnmente desde el siglo XVI, que puede obtenerse de plantas como la *cariophyllus aromáticus*, la *eugenia cariophylata*, el laurel, la canela, el alcanfor y otros aceites. Es, por lo tanto, un líquido, aceitoso, amarillento, de olor y sabor característicos, muy poco soluble en agua y sí en alcohol.

En 1873 fue introducido en Odontología por Chisolm, el cual recomendaba se mezclara con óxido de zinc al objeto de lograr una especie de masilla (eugenato o eugenolato de zinc) que pudiera aplicarse en los casos de caries.

Hoy, con distintos propósitos: supresión del dolor, como material de obturación asociado al óxido de zinc, formando parte de soluciones antisépticas (colutorios), o como cementante provisional, obturador de conductos, recubridor pulpar o anestésico tópico, es utilizado en Odontología, aunque cada vez con mayor especificidad y selectividad dados ciertos efectos no deseables.

Dentro de las propiedades que, en general, se atribuyen al eugenol, quizás la más tradicional sea su capacidad para quitar el dolor; capacidad que se debe según Markowitz y Gossel<sup>(83, 84)</sup> a que, en concentraciones bajas (no tóxicas), se comporta como un anestésico local al bloquear, reversiblemente, la conducción nerviosa.

Como las fibras nerviosas sensoriales de la pulpa poseen péptidos vaso-activos, importantes a la hora de generar respuestas inflamatorias, el hecho de que el eugenol inhiba la actividad nerviosa y la de los componentes vasculares de dicha inflamación, es suficiente como para que también se le concedan efectos antiinflamatorios. In vitro, el eugenol, en sangre humana, parece inhibir la quimiotaxis de los neutrófilos, la formación de tromboxano y la agregación plaquetaria.

En altas concentraciones, esta sustancia, tiene efectos bactericidas, ya que, como fenol que es, degenera las proteínas de la membrana celular; mientras que por el contrario en concentraciones bajas estabiliza dichas membranas y previene la penetración de las bacterias en los conductos dentinarios. Esto parece indicar que, sea solo o combinado con otros materiales, puede ser efectivo, tanto contra las bacterias aerobias o anaerobias, como contra otros microorganismos (hongos). Se ha podido constatar que las propiedades farmacológicas atribuidas al eugenol, son propiedades dependientes de las concentraciones de eugenol libre en los tejidos.<sup>(85)</sup>

Según la forma en la que se emplee, el eugenol, presenta varios inconvenientes de uso. Y en este sentido, parece ser que, al aplicarlo sobre tejidos vivos, las altas concentraciones que del mismo pueden librarse en los tejidos dañados, podrían afectar a importantes funciones celulares; es decir, que actuaría como un potente citotóxico; por ello, si en baja concentración inhibe la actividad del nervio periapical, en alta, puede ser tóxico para este nervio.<sup>(83)</sup>

Dependiendo del tiempo a cuya acción esté expuesta la pulpa, puede provocar lesiones cáusticas (quemaduras superficiales) al ser aplicado directamente, sobre tejidos blandos; y sistémicamente, según trabajos realizados en conejos (trabajos que analizaron aplicaciones locales en piel, hígado, riñón y cerebro), el eugenol, localmente, puede ser muy tóxico, destacando la producción de zonas de marcada necrosis isquémica.

Estos efectos quizás, puedan explicar el hecho de que, aplicado directamente sobre el tejido pulpar, el eugenol produzca una exacerbación de los síntomas de la pulpitis. Como derivado fenólico, pues, el eugenol, puede ser irritante, provocar fenómenos de hipersensibilidad o, dependiendo de su concentración, ser tóxico; razones por las que, en la actualidad, es un componente a sustituir o sustituido en muchas preparaciones dentales.

El óxido de zinc, (ZnO) es un polvo menos blanco que el hidróxido de calcio, (amarillento) de carácter básico, insoluble tanto en agua como en alcohol, inodoro e insípido, que suele descomponerse en presencia de soluciones ácidas fuerte.

También con propiedades antisépticas y astringentes, este componente suele encontrarse formando parte de los llamados cementos odontológicos: eugenato de zinc, fosfato de zinc o policarboxilato. Cuando el Eugenol y el Oxido de Zinc se mezclan, los iones metálicos del Zinc se unen covalentemente a los átomos no metálicos del Eugenol; lo que provoca una reacción de quelación que da lugar a la formación de eugenato o eugenolato de zinc (ZOE). Generalmente, no todos los átomos del eugenol reaccionan con los iones zinc, por lo que, como ya hemos mencionado, en los cementos endurecidos de este material, siempre queda una cierta cantidad de eugenol libre; eugenol libre al que se atribuyen las propiedades farmacológicas de este producto. <sup>(52)</sup>

Ultraestructuralmente, el óxido de zinc eugenol (ZOE), aparece como granos de óxido de zinc incluidos en una matriz de eugenato de zinc cuyas unidades se

encuentran unidas por fuerzas de Van der Waals e interacciones inter partículas; esto hace que, mecánicamente, este sea un cemento débil.

Expuesto a la acción de la saliva o los fluidos dentinarios, el ZOE se hidroliza dando lugar a eugenol más hidróxido de zinc, lo que permite la difusión del eugenol libre a través de la dentina. En esto parece influir el grosor de la dentina remanente existente entre la cámara pulpar y la cavidad obturada con el ZOE.

El óxido de zinc-eugenol es, pues, un cemento odontológico que se caracteriza por su poca resistencia y alta solubilidad oral. De escasas propiedades físico-químicas, posee, sin embargo, una serie de propiedades biológicas que hacen se mantenga su uso pese a sus inconvenientes; sobre todo, cuando se presenta en forma de cementos reforzados con polímeros, alúmina, sílice o ácido etoxi-benzoico (EBA) entre otros.

Este material es uno de los que más frecuentemente se han empleado en Odontología para tratamientos pulpares; sobre todo, en pulpectomías totales o parciales; aunque en algunos casos también se ha utilizado en el RPD.

Para Sorbe y cols. <sup>(82)</sup> además de un buen analgésico, el óxido de zinc-eugenol cicatriza y estimula el órgano dentino-pulpar favoreciendo la formación de dentina de reparación. Su biocompatibilidad ha sido muy estudiada: así mientras para unos, posee escasa o nula capacidad irritativa sobre la pulpa, para otros, no resulta del todo inerte, ya que en micro exposiciones pulpares se han podido detectar faltas de

dentina reactiva y procesos de inflamación crónica; una circunstancia que hace que se admita más en los RPIs y otras aplicaciones, que en los RPDs.

Considerado también como analgésico y antiséptico (acciones atribuidas, fundamentalmente, al eugenol), en los tratamientos pulpares de dientes temporales, añadiéndole un antiséptico como el formocresol, según se desprende de la literatura, no provoca lesión pulpar, aunque su gran solubilidad y escasa resistencia a la compresión, hacen necesario que sobre él coloquemos un material más resistente. <sup>(5,8)</sup>

Su efecto antibacteriano, aunque pobre cuando se aplica solo, según Tchaou resulta muy alto en combinación con el formocresol. <sup>(86)</sup> Sin embargo, para Hassan y Farid, <sup>(87)</sup> que compararon la actividad antibacteriana del óxido de zinc-eugenol con la del hidróxido de calcio, el ZOE, posee un efecto antibacteriano mayor que el hidróxido de calcio, porque, mientras que con el óxido de zinc-eugenol el efecto es máximo a los 6 meses de su aplicación, con hidróxido de calcio, el tiempo para que ello ocurra, es mucho más largo. Sin embargo, Chaung, Hong, Chiang y cols. <sup>(88)</sup> sostienen que la aplicación directa de un cemento de ZOE no solo complica el procedimiento clínico, sino que determina una serie de efectos indeseables debido a la capacidad citotóxica del eugenol.

Debido a su solubilidad, este material, no es recomendable como sellador permanente, aunque por su comportamiento biológico, se utiliza como material base, cemento sellador, material de restauración temporal y recubridor cavitario. <sup>(89)</sup> Algo que generalmente suele señalarse, es que bajo la aplicación del óxido de zinc-eugenol, no se forman puentes dentinarios, sin embargo, trabajos como los de

Tronstad y Mjör <sup>(90)</sup> muestran efectos que van desde la completa curación con formación de puentes, hasta, pasando por diversos grados de inflamación, la producción de necrosis.

Para Isaia y Guimarães, <sup>(91)</sup> el poder irritante que este cemento posee, está en proporción directa con la relación polvo- líquido que se utilice en la preparación, de tal forma, que, a menor fracción líquida, menor poder irritante. Estos autores, en un trabajo comparativo con el hidróxido de calcio, estudiaron, en 120 dientes de perros con RPD, los efectos del óxido de zinc-eugenol, en consistencia espesa, sobre la pulpa dental. Llegaron a la conclusión que este material provocaba cicatrización incompleta y fenómenos de reabsorción interna. Para ellos el óxido de cinc eugenol era un material pobre como material de recubrimiento pulpar.

Dentro de lo que podríamos considerar paradojas en los trabajos con este material, debemos señalar que mientras algunos estudios (RPDs realizados en dientes de perro) hablan de fenómenos inflamatorios discretos al mes de tratamiento y discretos procesos de reparación, otros no encuentran diferencias significativas entre las tasas de éxitos aplicando hidróxido de calcio en el RPD y las tasas de éxito obtenidas usando como material el óxido de zinc-eugenol.

Según Costa, Mesas y Hebling (2000), que evaluaron, comparativamente, las respuestas pulpares que ofrecían los RPDs realizados con óxido de zinc eugenol y los realizados con un sistema adhesivo en molares de rata, aunque el óxido de zinc

eugenol provoca, a corto plazo, una reacción inflamatoria, con el tiempo permite la curación de la pulpa. <sup>(92)</sup>

Según parece, el que en algunos casos se use, todavía, el óxido de zinc-eugenol en el RPD, está en que produce un sellado que previene la microfiltración bacteriana; un hecho que crea buenas condiciones para la organización de los mecanismos de defensa pulpares.

#### *1. 4. 3. RPD CON AGREGADO TRIÓXIDO MINERAL (MTA)*

Conocido como un derivado del cemento pórtland (hecho con partículas de fosfato y óxido de calcio) el MTA (Mineral Trioxide Aggregate), es un material que aparece en Odontología de la mano de Lee, Monsef, y Torabinejad <sup>(93)</sup> sobre el año 1993. Se encuentra constituido por varios óxidos minerales en el que el calcio es su principal ión; y desde el punto de vista físico-químico, se presenta como un polvo de finas partículas hidrofílicas que requieren de la humedad para endurecer; por ello, al mezclarse con agua estéril, el resultado es un gel coloidal pH medio 12,5 que se solidifica para formar una estructura dura.

Entre sus componentes, pues, encontramos: silicato di y tri-cálcico, aluminato férrico tetra-cálcico, óxido de bismuto (componente añadido al cemento Portland) y residuos insolubles de óxido de calcio: óxido de calcio, sulfato de potasio y sulfato de sodio, entre otros. Este material, es un material que debe prepararse en el

momento de usarlo; y tras su colocación, ser cubierto con algodón durante 24-72 horas para facilitar su fraguado. <sup>(93, 94, 95, 96, 97, 98)</sup>

Material estudiado como alternativa al empleo del hidróxido de calcio en el recubrimiento pulpar (RP) y otras técnicas, existen trabajos que indican que, el MTA, a la vez que estimula la producción de osteoblastos, posee, radiopacidad, alta biocompatibilidad y mínima citotoxicidad; por lo que, ofreciendo buen sellado, buena respuesta tisular, buenos resultados y buenas propiedades biológicas, es un cemento utilizado en el RPD, la reparación de cavidades, la obturación de canales radiculares y otros procedimientos endodónticos. <sup>(99)</sup>

Como desventajas, la literatura señala un largo tiempo de fraguado tras su colocación (3-4 horas), cierto grado de citotoxicidad y la posible deformación de la preparación del extremo radicular durante ese tiempo. Es un material que, siendo de alto costo, solo comercializa en España Tulsa Densply con el nombre de ProRoot. Su resistencia a la compresión, siempre que se encuentre en zonas que contengan humedad, aumenta conforme pasa el tiempo.

Respecto a los efectos antibacterianos del MTA, los mismos se atribuyen por un lado, a su gran capacidad de sellado (que evita las microfiltraciones), y por otro, a su facilidad para reaccionar con los fluidos dentales y formar hidróxido de calcio.

En el RPD, este material se aplica sobre la exposición pulpar realizando, primero, un sellado temporal; y luego, tras fraguado, una obturación definitiva que

previene posibles microfiltraciones bacterianas. Aunque los estudios a largo plazo con MTA son escasos, parece ser que su pH, similar al del hidróxido de calcio, es el causante de su capacidad para inducir la formación de tejido duro.

Aeinehchi, Eslami, y cols.<sup>(100)</sup>, en el año 2003 realizaron un trabajo con MTA en el que comparaban este material con el hidróxido de calcio en humanos. Concluyeron que el MTA era mejor material que el hidróxido de calcio en el RPD, porque, además de provocar menor inflamación, hiperhemia y necrosis, con más frecuencia que el hidróxido de calcio, no solo permitía la formación de delgados puentes dentinarios, sino también capas de odontoblastos.

Estudios histológicos en perros como los de Faraco y Holland, en el 2004 y Holland, Bisco, de Souza y cols. en el 2007, han demostrado, que el MTA posee las propiedades necesarias como para ser un material efectivo en el recubrimiento pulpar directo (RPD); incluso, superior al hidróxido de calcio, ya que, teniendo propiedades similares a este, aporta un mayor sellado marginal en los tratamientos; conclusión a la que también llegaron en el 2005, Parirokh, Asgary, Jafar y cols. empleando MTA blanco y gris e hidróxido de calcio en dientes de perro.<sup>(101, 102, 103)</sup>

En el año 2006, Iwamoto y Adachi<sup>(104)</sup>, entre otros, realizaron un estudio para evaluar el MTA blanco Proroot como material de RPD en exposiciones mecánicas de terceros molares humanos. Llegaron a la conclusión que no existían diferencias entre el MTA y el hidróxido de calcio con respecto a la respuesta celular inflamatoria y presencia de puente dentinario, por lo que, ambos materiales, eran útiles como

materiales de recubrimiento pulpar directo en dientes con pulpas expuestas mecánicamente.

También en este mismo año, (2006) el estudio de Briso, Rahal, y cols,<sup>(105)</sup> evaluando la respuesta biológica de la pulpa dental en dientes de perros tratados con RPD usando MTA e hidróxido de calcio, señala que, en el recubrimiento pulpar al menos, el MTA presenta niveles de infección y necrosis más bajos que el hidróxido de calcio.

Ford, Torabinejad, Abedi, Bakland y cols.<sup>(106)</sup> y Schmitt y cols.<sup>(107)</sup> examinaron también la respuesta pulpar del MTA, comparándolo con el hidróxido de calcio, pero en doce dientes de monos. Según este estudio, el MTA tiene el potencial necesario como para ser utilizado en el RPD, ya que a los cinco meses post-tratamiento, histológicamente, todos los dientes tratados con MTA, seis dientes, mostraban formación de puentes dentinarios continuos con algunas irregularidades; mientras que en los casos tratados con hidróxido de calcio solo dos dientes mostraban esta formación, y además, con numerosos efectos túnel. También observaron que la inflamación y la microfiltración bacteriana eran menores empleando MTA que empleando hidróxido de calcio. Para ellos, el MTA, posee los requisitos necesarios para ser material de recubrimiento pulpar directo: produce un buen sellado, fragua lentamente, favorece la formación de dentina terciaria o de reparación y provoca menos inflamación que el hidróxido de calcio. Según Myers y cols.<sup>(99)</sup> tanto el hidróxido de calcio (Dycal) como el MTA son materiales a utilizar en el RPD.

Según Abedi y Torabinejad y cols. la formación de puentes calcificados con menor inflamación era evidente en los RPDs efectuados con MTA que en los efectuados con hidróxido de calcio, por lo que proponían el uso de este material en el RPD. <sup>(108, 109)</sup>

Para Miñana-Gómez, <sup>(110)</sup> el MTA está indicado en las pulpectomías parciales, el RPD, las apicoformaciones, las endodoncias y en la reparación de perforaciones furcales; favorece la formación de hueso y cemento; puede facilitar la regeneración del ligamento periodontal, y todo, sin provocar inflamación.

Analizando, pues, diversos artículos que trataban sobre materiales en el RPD, Crane LE (2006), <sup>(111)</sup> llegó a la conclusión de que tanto el *hidróxido de calcio* (Dycal), como los sistemas adhesivos (agentes bonding) y el MTA, eran materiales efectivos para el recubrimiento pulpar, ya que podían inducir la formación de tejido de reparación en las pulpas de dientes no cariados.

Comparando los efectos del MTA y el Hidróxido de calcio sobre la pulpa dental de perros (estudio realizado en 30 dientes) Faraco y Holland concluyeron que el MTA era superior al hidróxido de calcio, no solo porque inducía puentes dentinarios en un mayor número de especímenes, sino porque, además, carecía de efectos inflamatorios. <sup>(112)</sup>

#### *1. 4 .4. RPD CON SISTEMAS ADHESIVOS Y COMPOSITES*

Quizás, por las expectativas que levantaron en su momento, los Sistemas Adhesivos, hayan sido, si no el más, uno de los materiales más estudiado dentro de las diversas técnicas odontológicas. Y bajo este aspecto, también en el RPD.

Dada la gran diversidad de sus componentes; los diferentes tipos de Sistemas Adhesivos; la gran cantidad de trabajos que sobre ellos se han realizado y las numerosas comparaciones efectuadas con otros materiales, nosotros hemos creído podría ser interesante, para un mejor entendimiento, comenzar por decir lo que se entiende por Sistema Adhesivo y mencionar algunos de ellos en un determinado número de estudios que tienen que ver con el RPD y sus efectos sobre la pulpa.

Así, conocemos como Sistema Adhesivo a un conjunto de materiales que, compuestos por acondicionadores de superficie, imprimadores y resinas hidrofílicas e hidrofóbicas (generalmente Bis-GMA), tienen la finalidad de adherir un material restaurador al tejido dentario o a otro material restaurador; es decir, preparar el esmalte y la dentina; y adherir química y/o micromecánicamente el esmalte y la dentina al material restaurador.

A pesar de que cada sistema consta de una composición diferente, todos se basan en los mismos elementos: un acondicionador de esmalte que crea micro-retenciones (generalmente el ácido ortofosfórico) y un acondicionador dentinario que

permite la limpieza de los túbulos y acondiciona la dentina eliminando el barrillo dentinario: el Etilen Diamino Tetra Acético (EDTA).

Con objeto de evitar la excesiva agresión que el acondicionador de esmalte provoca en la dentina, algunos Sistemas Adhesivos emplean lo que denominan un acondicionador total; acondicionador total que, constituido por un ácido débil, trata conjuntamente el esmalte y dentina.

Comercialmente, los Sistemas Adhesivos se presentan en forma de líquidos destinados, cada uno, a realizar un determinado paso en la adhesión. Dentro de las características que poseen estos materiales, cabe mencionarse la de que presentan cierta flexibilidad y resistencia a las cargas oclusales; tienen baja viscosidad y poseen un coeficiente de expansión térmica similar al del diente y las resinas compuestas. Su contracción de polimerización parece ser mínima.<sup>(113)</sup>

Aunque su uso en el RPD es muy controvertido, no dejan de existir trabajos que defienden la obturación directa de las exposiciones pulpares con estos Sistemas; sin embargo, no se deja de señalar que la cicatrización de una exposición pulpar, no es privativa de los efectos estimulantes de un determinado tipo de material o medicamento, sino que está íntimamente relacionada con la capacidad del material recubridor para producir (conjuntamente con el material de restauración definitiva), un perfecto sellado biológico contra las microfiltraciones bacterianas.<sup>(114)</sup>

Para algunos (Acorinte M, 2005; Szep S, 2001; y Costa C. 2000 y 2001) los componentes que integran estos Sistemas Adhesivos (los monómeros como Bis-GMA o HEMA entre otros) y las resinas, poseen una serie de efectos que son negativos para la pulpa: efectos citotóxicos y cito-patológicos atribuidos a los componentes ácidos y no ácidos de las resinas adhesivas; y efectos generadores de otras sustancias citotóxicas tras la polimerización. <sup>(115, 116, 117, 118, 119)</sup>

Demarco, Tarquinio y cols. han estudiado en dientes humanos (“in vivo” e “in vitro”) la respuesta y citotoxicidad de dos agentes adhesivos dentinarios: el Clearfil Liner Bond y el Scotchbond Multi-Purpose. Comparativamente con el hidróxido de calcio, estos autores observaron que los materiales adhesivos presentaban mayores efectos citotóxicos sobre los fibroblastos. <sup>(120)</sup>

Tsuneda Y, Hayakawa T, y cols. evaluaron, histológicamente, en RPDs realizados en dientes de rata, la respuesta pulpar frente a cuatro Sistemas Adhesivos: Superbond C&B, Clearfil Liner Bond, Tokuso Ligh Bond y Sistema Multi-Purpose One All. Llegaron a la conclusión de que eran necesarios nuevos, mayores y futuros estudios para poder saber qué sistema, sin provocar daño tisular severo, era el más apropiado en el RPD. <sup>(121)</sup>

Para Subay, y Demirci (2005) que compararon histológicamente los efectos del Dycal y el sistema Scotchbond Multipurpose plus (SMPP) en 16 dientes humanos con RPD, el SMPP provoca mayores cambios inflamatorios que el Dycal; y ninguna formación de dentina de reparación; mientras que el Dycal, con menor inflamación, si induce la formación de puentes dentinarios aunque incompletos. <sup>(122)</sup>

Según Horsted-Bindslev y cols. (2003) (estudio realizado en dientes humanos) los Adhesivos dentinarios están contraindicados en el RPD. <sup>(123)</sup>

Sin embargo, Ölmez y cols. que evaluaron y compararon en dientes de perro la respuesta pulpar a los sistemas Optibond, Syntac, e hidróxido de calcio, afirman que de los adhesivos conocidos, el Optibond, con alta resistencia a la compresión, es el que menos microfiltraciones provoca. Para ellos, aunque son necesarios mayores estudios, los resultados en el RPD con estos sistemas, eran (1998) prometedores. <sup>(124)</sup>

También en dientes de perro con RPD, Kiba, Hayakawa y cols. (2000) analizaron la respuesta de la pulpa ante dos Sistemas Adhesivos: el sistema Etching EDTA, y el sistema Self-Etching. Concluyeron que el sistema Self-Etching, era un sistema prometedor en el RPD. <sup>(125)</sup>

El estudio realizado por Koliniotou y Tziafas D. en el año 2005 para evaluar la respuesta pulpar ante los Sistemas Adhesivos Clearfil SE Bond, Prompt-L-Pop Etch & Prime 3.0 y Single Bond, en RPDs realizados en dientes de perro, demostró que, la aplicación de sistemas adhesivos en contacto directo con la pulpa no permitía la correcta reparación del complejo dentino-pulpar, ni la correspondiente formación de dentina terciaria, con lo cual no podían considerarse como materiales idóneos en el RPD. <sup>(126)</sup>

En el año 2005, Accorinte y cols. efectuaron un trabajo en 25 premolares humanos, libres de caries, a los que realizaron RPDs con diferentes componentes de Sistemas Adhesivos (juntos y por separados) e hidróxido de calcio. Estos autores llegaron a la conclusión de que los componentes adhesivo y los composites debían ser rechazados como materiales en el RPD, siendo, para ellos, el material de elección el hidróxido de calcio. <sup>(115, 116)</sup>

Pameijer y Stanley <sup>(127)</sup> estudiaron los efectos de la técnica “ Total Etch” en pulpas de monos. Utilizaron All Bond 2, Pro Bond y Permagen y los compararon con dos hidróxidos de calcio: uno de fraguado químico y otro de fraguado por fotopolimerización. Observaron que utilizando dicha técnica (Total Etch), se producía necrosis pulpar en el 45% de los casos, y puentes dentinarios, sólo en un 35%; mientras que con el hidróxido de calcio se obtenía un 82% de puente, con solo un 7% de pulpas necróticas. Para ellos, esta técnica de grabado ácido, estaba contraindicada en el recubrimiento pulpar.

Para Lu y cols. (2006) que compararon y evaluaron las respuestas de la pulpa dental en perros con recubrimientos pulpares directos realizados con Clearfil SB Bond e hidróxido de calcio, las pulpas recubiertas con SB, aunque mostraron una buena biocompatibilidad, presentaron, a corto plazo, inflamación leve y pobre capacidad para inducir la formación de dentina de reparación. Sin embargo, a pesar de ello, sobre si se puede o no utilizar el SB en el recubrimiento pulpar directo, estos autores, señalan la necesidad de nuevos trabajos sobre el tema. <sup>(128)</sup>

Silva GA y cols. (2006), en dientes humanos, estudiaron la respuesta pulpar frente a un Sistema Adhesivo Single Bond, en el recubrimiento pulpar directo (RPD), y lo compararon con el hidróxido de calcio. Según estos autores, dicho Sistema Adhesivo no debe utilizarse en el RPD, porque ni favorece la diferenciación celular, ni induce la neoformación de tejido. El hidróxido de calcio, sigue siendo para estos autores, la alternativa de elección en este tipo de tratamiento. <sup>(129)</sup>

Scarano A y cols. (2003) efectuaron un estudio en 24 dientes humanos a los que realizaron RPD con muy diversos materiales: Adhesivo dental (Solist) más resina compuesta (Ecusit); Adhesivo dental (Prompt) y resina composite (Pertac); Hidróxido de Calcio (Dycal) más resina composite (Ecusit) e hidróxido de calcio (Ultrablend Plus) más amalgama (Dentsply). Tras extracción dentaria, a los 15 días post-tratamiento, las distintas preparaciones, divididas en los cuatro grupos mencionados para estudio histológico de la actividad de los odontoblastos en contacto con los distintos materiales, los autores pudieron señalar que en todos los casos podían observarse procesos inflamatorios con escaso número de células características, algunas zonas de necrosis y formación de dentina terciaria; por lo que para estos autores, la respuesta pulpar y el comportamiento de los materiales eran similares en este trabajo. <sup>(130)</sup>

Pereira, Segala y Costa, con objeto de evaluar clínica y microscópicamente la respuesta pulpar humana en RPDs, efectuaron un trabajo en el año 2000 con un Sistema Adhesivo (Scotchbond Multi-Purpose Plus) e hidróxido de calcio. A corto plazo (9-12 días) observaron que los tejidos pulpares recubiertos con Scotchbond

presentaban dilatación y congestión de los vasos sanguíneos, moderada respuesta inflamatoria y palidez de las células nucleares de la pulpa. A largo plazo (53 - 204 días) no solo no pudieron demostrar que existiera curación pulpar o evidencia de puentes dentinarios, sino que, además, detectaron, en tres casos, la presencia de micro-abscesos asociados a infiltración bacteriana. En cambio el hidróxido de calcio si mostró una estimulación para la reparación tisular y formación de puentes.<sup>(131)</sup>

Aunque esto sea así, no dejan de existir, trabajos con animales, (Swift, Trope y Ritter) sobre todo monos, que apoyan el uso de adhesivos resinosos en el RPD. Estos trabajos parecen sugerir que los adhesivos o cualquier material que facilite un buen sellado, favorece la cicatrización pulpar, ya que impide la microfiltración bacteriana, provoca menos inflamación y proporciona puentes dentinarios con menos efectos túnel.<sup>(132)</sup>

Ersin y Eronat (2005) compararon la biocompatibilidad de un adhesivo dentinario (Prime & Bond 2.1) con la del hidróxido de calcio en recubrimientos pulpares directos realizados en 20 premolares humanos sanos y 30 de ovejas. Llegaron a la conclusión de que el Prime & Bond facilitaba la curación pulpar y la formación de dentina terciaria en los dientes de oveja, no siendo, sin embargo, tan eficaz como el hidróxido de calcio en los humanos.<sup>(133)</sup>

González Lopez y Bolanos Carmona (2005), a raíz de un RPD realizado con Gluma Dentin Adhesive en un molar humano con caries, y seguido el paciente a lo largo de 8 años, parecen demostrar que los adhesivos dentinarios podrían ser una buena alternativa al hidróxido de calcio. Ellos señalan, no obstante, que, para que

esta técnica tenga éxito, la correcta asepsia del campo operatorio y el buen sellado del margen de la restauración son fundamentales. <sup>(134)</sup>

En un estudio comparativo de la respuesta pulpar frente a siete resinas adhesivas usando como control el Dycal (RPDs realizados en monos), Medina y cols. (2002), concluyeron que a pesar de que el hidróxido de calcio inducía más rápidamente que los adhesivos la formación de dentina de reparación, la diferencia entre aquellas y este, no eran estadísticamente significativas; encontrando, además, que, generalmente, la respuesta pulpar, en todos, se caracterizaba por una marcada desorganización del tejido pulpar con infiltración de células inflamatorias. <sup>(135)</sup>

Para Costa, Hebling y Hanks (revisión efectuada en el 2000 de toda la literatura al respecto) y Ersin (2005), aparte de que los estudios con animales no pueden extrapolarse directamente a las condiciones clínicas de los humanos, el uso de agentes ácidos y resinas adhesivas sobre pulpas vitales parece estar contraindicado. <sup>(118, 133)</sup>

Kitasako y cols. (2000) realizaron un trabajo en el que estudiaban la formación de puentes dentinarios (a corto plazo) en 150 pulpas dentales de monos. Pulpas mecánicamente expuestas y tratadas con recubrimiento pulpar mediante dos Sistemas Adhesivos (Clearfil Liner Bond y Bond-Well LC) e hidróxido de calcio (Dycal). Ellos evaluaron histológicamente los hallazgos a los 3, 7, 14, 30 y 60 días post-tratamiento; y analizaron la estructura de los puentes dentinarios, reconstruyéndolos, tridimensionalmente, mediante ordenador. Todos los grupos,

entre el tercer y séptimo día, carecían de focos de necrosis o imágenes inflamatorias en el lugar de la exposición; a los 14 días apreciaron, en la superficie de la herida, fibroblastos, células estrelladas y fragmentos dentinarios residuales con deposición de dentina reparativa a lo largo de la periferia de la misma; a los 30, también en la superficie de la herida, signos iniciales de formación de puentes dentinarios con una organizada capa de células odontoblásticas. En el grupo del Dycal, la presencia de puentes dentinarios, a los 30 días, fue significativamente mayor que en los casos tratados con S. Adhesivo; al contrario que a los 60 días, donde no se observó, en este sentido, ninguna diferencia. <sup>(136)</sup>

Algo que debe tenerse en cuenta en los estudios que apoyan el RPD con sistemas adhesivos, es que dichos estudios han asociado la exposición y el recubrimiento pulpar, a pulpas sanas sin signos ni síntomas de inflamación. Por eso, cuando existe inflamación y se utiliza el hidróxido de calcio como control frente a los adhesivos, el hidróxido de calcio ofrece mejores resultados, ya que las resinas carecen de las características hemostáticas y bactericidas que éste posee.

Aunque todos coinciden en que son necesarios mayores y nuevos trabajos sobre estos sistemas, actualmente, según se desprende de la literatura consultada, los adhesivos dentinarios no parecen estar muy indicados en el RPD, a menos que futuros estudios demuestren lo contrario.

*I. 4. 5. OTROS MATERIALES EMPLEADOS EN EL RPD*

*CEMENTOS DE IONÓMERO DE VIDRIO:* De este grupo, sujeto a continuas revisiones, nosotros señalaremos, únicamente, sus principales cualidades e inconvenientes; y ello porque, si, por un lado, en algunos trabajos se han empleado en ciertas exposiciones pulpares, por otro, en el presente trabajo de Tesis Doctoral, ya han sido mencionados al formar parte de estudios comparativos con otros materiales.

Los cementos de Ionómero de Vidrio son materiales que resultan de la combinación entre un polvo constituido por óxido de silicio, óxido de aluminio y fluoruro de calcio; y un líquido (solución acuosa al 50%) que contiene ácido poliacrílico, itacónico y tartárico. Esta combinación provoca una reacción ácido-base durante la cual se liberan iones flúor.

Nacen sobre los años sesenta con objeto de mejorar los cementos existentes, y pueden encontrarse tanto en forma de polvo-líquido para mezclado manual, como en cápsulas para vibrado mecánico o compules (CVI fotopolimerizables o compómeros).

Estos cementos tienen como características más importantes el que su fraguado es muy lento, son buenos aislantes térmicos, poseen buena adhesión a estructuras dentales, disminuyen la filtración marginal en comparación con otros materiales, e inducen un buen sellado de los túbulos dentinarios. Son biocompatibles, tienen un alto poder anticariogénico al liberar flúor, y ofrecen una estética aceptable.

Como inconvenientes se señala, su poca resistencia a la abrasión, ser sensibles a la humedad durante el fraguado y solubles en los fluidos orales.

Aunque poseen mayor resistencia a la compresión que el oxi-fosfato de cinc, su módulo de elasticidad es bajo. Son más tóxicos que el óxido de zinc-eugenol, y es un material de restauración que carece de reacción de retracción. Debido a estas características, suele decirse que están indicados en cementados, restauraciones estéticas, recubrimientos pulpaes, sellados y endodoncia.<sup>(137)</sup>

Sin embargo, hemos de señalar que, respecto a la biocompatibilidad pulpar, de Lopes do Nascimento y cols. (2000) realizaron un trabajo en el que comparaban la biocompatibilidad pulpar de un cemento modificado de ionómero de vidrio (Vitrebond) con la del hidróxido de calcio en dientes humanos. Para estos autores, en pulpas mecánicamente expuestas, este cemento no resulta apropiado como material de recubrimiento en el RPD, ya que no solo es mucho más irritante para los tejidos que el hidróxido de calcio, sino que, además, ni favorece la reparación pulpar ni induce formación dentinaria.<sup>(138)</sup>

En el año 2003, Costa y cols. estudiaron, en dientes de ratas, las respuestas pulpaes obtenidas a los 7, 30 y 60 días tras RPD con ionómero de vidrio (Vitrebond), un Sistema Adhesivo (Clearfil Liner Bond 2V) e hidróxido de calcio. En este estudio pudieron comprobar que, con estos materiales de recubrimiento, se producía una cicatrización pulpar, que, tanto en los casos tratados con ionómero de vidrio como en los tratados con el sistema adhesivo, se caracterizaba, por la

presencia de células ricas en fibrodentina, formación de dentina terciaria y barrera calcificada.<sup>(139)</sup>

De Souza y cols. también en el año 2003, con objeto de observar a corto plazo la respuesta del complejo dentino- pulpar, compararon en premolares humanos con cavidades profundas clase V tres tipos de tratamiento: uno en los que colocaron, directamente, un sistema adhesivo con grabado ácido (One Step); otro en el que se emplearon cemento modificado de vidrio ionómero (Vitrebond 3M) tras el cual aplicaron el sistema adhesivo tras grabado ácido, y un tercero, en el que colocaron hidróxido de calcio (Dycal) como base, efectuaron grabado ácido y aplicaron el adhesivo. Para estos autores, en las cavidades clase V profundas, debe usarse como material de relleno un material biocompatible, como el ionómero de vidrio (Vitrebond) o el Dycal.<sup>(140)</sup>

Tarim y cols. con objeto de evaluar la biocompatibilidad de un cemento de vidrio-ionómero, estudiaron, histopatológicamente, en cavidades con y sin exposición pulpar, 112 dientes en seis monos adultos sanos. Emplearon este material (Vitremer 3M), en 24 casos sin exposición pulpar y 36 con exposición; los resultados obtenidos fueron comparados con los obtenidos empleando ZOE en casos sin exposición; y con los del hidróxido de calcio en las cavidades con pulpa expuesta. Concluyeron, que el cemento de vidrio ionómero, no siendo irritante para la dentina, presentaba una aceptable biocompatibilidad tanto en las cavidades con exposición pulpar, como en las que carecían de ella. Resultados semejantes fueron obtenidos por

Demirci y cols. (1998) y About y cols. (2001) en premolares humanos. La respuesta inflamatoria pulpar con este material fue de leve a moderada. <sup>(141, 142, 143)</sup>

*MATERIALES BIOLÓGICOS:* Basándose en que no son tóxicos para la pulpa, son bien tolerados por el organismo y no provocan fenómenos de inflamación, algunos materiales biológicos se han señalado como posibles agentes inductores de la reparación pulpar. Así, existen trabajos que, en este sentido, hablan del uso de limaduras dentinarias (liofilizadas, estériles, autólogas u homólogas), fibras de colágeno, proteínas, derivados de la matriz de esmalte etc., con la esperanza de que estos materiales pudieran comportarse como cementos estimulantes de la formación dentinaria y la reparación pulpar. En efecto, aunque el éxito de estas técnicas no es comparable con el obtenido por el hidróxido de calcio, existen autores que han descrito, en animales de experimentación, la formación de tejidos duros reparativos usando limaduras de esmalte, hueso o fibras de colágena, entre otros materiales biológicos; incluso, quienes señalan que las posibles diferencias con el hidróxido de calcio, más que a otra cosa, podrían deberse a la dificultad que presentan estos materiales para ser almacenados, mantenidos esterilizados o combinados con agentes antibacterianos y/o antisépticos.

Un estudio realizado por Decup y cols. con Sialoproteína Osteogénica (Bone Sialoprotein) implantada en pulpas de primeros molares superiores de ratas, posteriormente sacrificadas a los 8, 14 y 30 días post-tratamiento para análisis histológico, mostró que esta proteína bioactiva, era capaz de inducir la formación de una fina capa de dentina terciaria a los treinta días de su implantación. <sup>(144)</sup>

En otro trabajo similar con moléculas bioactivas, Golberg y cols. (2001) estudiaron los efectos pulpares de algunas de estas moléculas empleadas en RPDs realizados sobre molares superiores de ratas “in vivo”. Dichos efectos se compararon con un grupo control, constituido por los restos de dentina y predestina resultantes de la apertura cavitaria, una sustancia transportadora de sustancias bioactivas (la gelatina); el hidróxido de calcio; una Sialoproteína Ósea (BSP), diferentes concentraciones de Proteína Ósea Morfogénica-7 (BMP-7) o Proteína Osteogénica-1 (OP-1) y un agente antioxidante como la N-Acetil Cisteína (NAC). Los resultados obtenidos fueron que, comparada con los 4 primeros grupos, la BSP fue la molécula bioactiva más eficiente a los 28 días post-tratamiento, ya que inducía una homogénea barrera de dentina reparativa. La BMP-7 producía una aceptable dentina de reparación del tipo osteodentina en la pulpa coronal y una mineralización homogénea en el canal radicular. La BSP y la BMP-7 fueron superiores al hidróxido de calcio en cuanto a la capacidad para inducir y formar amplias zonas de mineralización. La NAC también indujo la formación de dentina de reparación en los molares de las ratas objeto de estudio.<sup>(145)</sup>

Golberg, Six y cols. (2003) en un trabajo que analiza las acciones de las moléculas bioactivas sobre la pulpa, parecen señalar que, estas moléculas, podrían representar en el futuro una nueva forma de tratamiento pulpar.<sup>(146)</sup>

En 2006, Goldberg, Lacerda-Pinheiro y cols.<sup>(147)</sup> volvieron a efectuar estudios sobre el impacto de las moléculas bioactivas a la hora de estimular la reparación

dental. En resumen, para estos autores, el RPD y otras técnicas con moléculas bioactivas podría representar una nueva perspectiva dentro de los tratamientos dentales. Últimamente, algunos trabajos parecen señalar que la Proteína Ósea Morfogénica (Morphogenetic Bone Protein o BMP), que estimula, “in vivo”, la formación de cartílago y hueso en implantes intra y extra-esqueletales, también favorece la dentinogénesis y formación de puentes dentinarios; lo que para algunos autores es debido a que estas proteínas, aparte de jugar un papel regulador en la diferenciación celular, tienen en la pulpa dental receptores que le son específicos.

Rutherford y cols.<sup>(148)</sup> realizaron un estudio clínico en monos con el que demostraron la formación de puentes dentinarios tras RPD con Proteína Osteogénica. Los resultados obtenidos fueron comparados con los obtenidos empleando hidróxido de calcio y colágeno. Para estos autores, mientras que la Proteína Osteogénica produce más puentes dentinarios que el hidróxido de calcio, el colágeno no induce formación alguna. Para ellos, la cantidad de dentina que se forma usando esta proteína, es directamente proporcional a la cantidad de proteína empleada en el tratamiento.

Hu, Zhang y cols. analizaron la posible formación de dentina de reparación en molares de ratas después de RPDs con factores de crecimiento. Estos factores, que se encuentran implicados en el proceso normal de curación de las heridas titulares, fueron comparados con el hidróxido de calcio (Dycal). Tras realizar una pequeña exposición pulpar en los molares de dichos animales de experimentación, observaron las posibilidades de uso en esta técnica de una serie de factores: factor de crecimiento

epidérmico, los fibroblastos (como factor de crecimiento básico), la insulina como factor II de crecimiento, un derivado del factor BB y un precursor del factor de crecimiento b1 (TGF-b1). Estas sustancias, lo mismo que el Dycal (material control), fueron colocadas sobre una membrana estéril de colágeno, aplicadas sobre la pulpa expuesta y sus resultados, observados a las 2 y 3 semanas post-tratamiento. Llegaron a la conclusión de que si bien a las 2 semanas no existían diferencias significativas entre ellos (la respuesta tisular fue muy homogénea en todos), a la tercera, observaron que la TGF-b1 había favorecido una marcada inducción de dentina terciaria en los molares de las ratas tratadas con este material. <sup>(149)</sup>

Klaiber y cols. estudiaron la reacción pulpar y la inducción de barreras mineralizadas tras RPD con una preparación de colágeno liofilizado. Comprobaron que el proceso de curación pulpar tras RPD con fibras de colágeno era diferente al que se observaba cuando se empleaba hidróxido de calcio (Calxyl). Las fibras de colágeno que cubrían el tejido pulpar y sellaban parte del defecto dentinario, fueron reemplazadas por una neoformación de tejido pulpar rodeado por dentina terciaria de reparación. También observaron que, inicialmente, el Calxyl producía focos de necrosis localizada, alrededor de los cuales, se apreciaba el depósito de sustancias duras. <sup>(150)</sup>

Nakamura y cols. (2001) estudiaron un derivado de matriz de esmalte (EMD) como posible inductor en el proceso de reparación pulpar. Se basaron en el hecho que durante la odontogénesis, las amelogeninas de los pre-ameloblastos, en la papila dental, permiten que los pre-odontoblastos se transformen en odontoblastos; una

circunstancia que sugiere que las amelogeninas están asociadas a los cambios de éstas células durante el desarrollo dental. Para ello, los autores analizaron, histológicamente, los efectos de un derivado de matriz de esmalte (Enamel Matrix Derivative), en exposiciones pulpaes intencionadas realizadas sobre premolares maxilares de pequeños cerdos. Emplearon en los contralaterales el Dycal como material control; y sellaron las preparaciones (cavidades de clase V), con cemento ionómero de vidrio. Así pudieron comprobar que a las 2-4 semanas, los dientes tratados con EMD, presentaban, alrededor de la exposición pulpar, una gran formación de neo-dentina con células formativas. Aunque en el área de la exposición encontraron células inflamatorias, las mismas no estaban subyacentes al tejido neo-formado. Esta formación, morfométricamente, fue, cuantitativamente, el doble en los molares tratados con EMD que en los tratados con Dycal; es decir, la el EMD induce un proceso de reparación más intenso que el hidróxido de calcio. <sup>(151)</sup>

En el año 2003, Ishizaki y cols. realizaron un estudio histopatológico de la pulpa dental en 32 dientes de perro a los que se había efectuado RPD con un derivado de matriz de esmalte (EMD). Analizado el tejido a la 1,4 y 8 semanas post-tratamiento, llegaron a la conclusión que, a partir de las 4-8 semanas, el EMD, por un lado, favorecía el incremento de la formación de dentina terciaria (lo que sugiere una influencia del material sobre los odontoblastos y células endoteliales de los capilares de la pulpa), y por otro, que usado en RPDs, puede tener un papel en la calcificación del tejido pulpar del diente. <sup>(152)</sup>

Lovschall, Fejerskov y Flyvbjerg, (2001) utilizaron en RPDs realizados sobre primeros molares superiores de ratas, una combinación de insulina humana y factor de crecimiento I (rhIGF-I). Emplearon como control el Dycal; y sacrificaron los animales a los 3, 7 y 28 días post-tratamiento. A las 72 horas post-tratamiento, la respuesta inflamatoria fue la misma tanto en los molares tratados con (rhIGF-I) como en el grupo control; a los 7 días, en ambos grupos, la infiltración inflamatoria fue reemplazada, parcialmente, por tejido de granulación; y a los 28, pudieron observar que existía una mayor frecuencia de puentes dentinarios y dentina tubular alrededor de la sustancia que contenía el rhIGF-I que en los molares tratados con Dycal. La dentina de reparación inducida en los RPDs realizados con rhIFG-I, fue similar a la inducida por el Dycal, lo que sugiere que el material testado, comparado con el material control, favorece la dentinogénesis reparativa en las ratas. <sup>(153)</sup>

Aunque en muestra pequeña (dos perros y 12 dientes), Cullum y Kline, utilizaron la calcitonina como agente de RPD. El control (9 dientes) fue tratado con hidróxido de calcio y la conclusión fue que, aunque esta hormona reducía el grado de inflamación pulpar, no aumentaba el grado de curación o formación de dentina secundaria. <sup>(154)</sup>

También un cemento a base de Fosfato de Octalcalcio ha sido empleado como material en el RPD. Sena y cols. (2004) realizaron un trabajo en el que emplearon este material como recubridor pulpar en ratas Sprague-Dawley. Utilizaron para ello 60 primeros molares maxilares y como material control, una mezcla de hidróxido de calcio. Anatómo-patológicamente fueron estudiados a la semana a los

15 días y a las cinco semanas tras el tratamiento. Los resultados indicaron que ya desde la primera semana, en ambos grupos, podía detectarse una importante formación de dentina de reparación; a las dos semanas células inflamatorias y dentina de reparación y a las cinco semanas, más frecuentemente en el grupo Octalcalcio, una dentina regular de reparación en los túbulos dentinarios; con lo que concluyeron que este era un material posible en el RPD. <sup>(155)</sup>

Su, Ye y Zhou, publicaron en 2005 un estudio experimental con perros, sobre la respuesta del tejido pulpar a una nano-hidroxiapatita / poliamida 66 composite (Nha-pa66) usada en el RPD. Histológicamente, analizaron la formación de dentina terciaria de reparación y los cambios que podían producirse en la pulpa expuesta, a los 7, 30 y 60 días post-tratamiento. Emplearon como control el hidróxido de calcio (Dycal) y llegaron a la conclusión de que si la Nha-pa66, presentaba una biocompatibilidad muy buena, en cuanto a la inducción de dentina de reparación, no lo era tanto comparativamente con el hidróxido de calcio. No obstante piensan que en el RPD, esta podía ser una nueva opción aunque todavía sujeta a mayores investigaciones. <sup>(156)</sup>

Últimamente Yildirim y cols. (2007) han estudiado “in vivo” los efectos de biomateriales de fosfato de calcio (hidroxiapatita (HA), b-tricalcico-fosfato (TCP) y combinación de ambos) sobre las pulpas, experimentalmente expuestas, de 16 premolares y molares de perros. En este estudio se sugiere que la combinación TCP + HA, al inducir respuestas dentinogénicas, puede ser un bio-material ideal para ser utilizado en el RPD. <sup>(157)</sup>

La vancomicina es un antibiótico que, utilizado en forma de clorhidrato, posee actividad sobre microorganismos gram-positivos y algunas espiroquetas. Basándose en esto, y en que, también, el hidróxido de calcio tiene propiedades bacteriostáticas y bactericidas, con objeto de ver si un agente antimicrobiano era efectivo frente a los patógenos de una pulpa infectada; si el hidróxido de calcio podía inducir la formación de dentina reparativa en presencia de este agente antimicrobiano y si la pulpa curaba y mantenía su vitalidad, Gardner y cols. idearon un estudio en el que, tras exponer quirúrgicamente las pulpas de dientes permanentes de monos a las que permitieron se infectaran en boca durante 48 horas, las mismas fueron tratadas con RPD usando cuatro combinaciones como agentes recubridores: (a) 10% de clorhidrato de vancomicina, 89% hidróxido de calcio y 1% de metil-celulosa y agua; (b) 99% de hidróxido de calcio más 1% de metril-celulosa y agua; (c) 10% de vancomicina más 90% de almidón y agua; y (d) como grupo control, almidón más agua. Llegaron a la conclusión de que aunque el hidróxido de calcio era efectivo como recubridor pulpar, el uso de la combinación (a) vancomicina + hidróxido de calcio, aportaba un mayor número de éxitos a la hora de controlar la infección e inducir la formación de puentes dentinarios a los 30 días post-tratamiento.<sup>(77)</sup>

No creemos que, en la Presente Tesis Doctoral, la revisión que hemos efectuado de materiales en el RPD, haya sido o pueda ser exhaustiva. Tampoco ha sido esa nuestra intención. Nuestra intención, a parte su lógica preceptiva referencia, ha sido exponer una visión general de lo empleado en esta técnica y así, recordar que, a lo largo del tiempo, y más en los últimos años, la inquietud por encontrar nuevos

materiales, estrategias, soluciones fisiológicas o productos naturales aplicables en Odontología, y por lo tanto en el RPD, cada vez ha sido más intensa e interesante. Intensa en cuanto a investigaciones e interesante en cuanto resultados.

## **I. 5. LAS PLANTAS COMO RECURSO TERAPÉUTICO**

### *I.5.1. BREVE RESUMEN HISTÓRICO. GENERALIDADES*

No cabe duda que el entorno, las plantas, su diversidad y la observación de sus efectos, estuvieron en la base de los primeros intentos del hombre por remediar el dolor y la enfermedad; gracia divina primero, magia después, y más tarde, conocimiento, investigación y ciencia. El que esto fuera así, no solo se confirma por la gran variedad de plantas grabadas en huesos y cornamentas de animales prehistóricos hallados en estratos paleolíticos de más de 80.000 años de antigüedad, sino, además, por los ramos de flores y haces de hierbas que suelen encontrarse en ciertos enterramientos neolíticos como la cueva de Shanidar en el actual Irak.

Hace unos 14.000 años, en la cueva de Les Tríos Frères (en Ariège, Francia) los magdalenienses pintaron a un curandero. En Suiza, en el Neolítico, los llamados habitantes de los lagos, cultivaron hasta 200 tipos de plantas con propiedades medicinales; y collares con hojas de apio en Tebas, o frutos de moreras en China, hablan de esa herboristería origen de lo que hoy conocemos como bagaje terapéutico, Medicina, Farmacognosia o Farmacología.

Según textos de la época (tablillas cuneiformes), los Sumerios y Caldeos, 3000 años a. C, ya habían registrado 250 plantas y productos vegetales diferentes. Plantas que, a juzgar por el número de fórmulas y normas de elaboración que se describen, eran empleadas terapéuticamente: corteza de manzano, aceite de cedro, y una desconocida “*planta de luna*” que algunos quieren identificar con la *Caléndula*.

Los Asirios, entre sus muchos remedios a base de aceites, vinos, miel o grasas, mencionan el apio, la mandrágora y la cicuta; y los Egipcios, a parte grasas animales y minerales como el hidróxido de aluminio e hidróxido de magnesio o el cobre, en el papiro de Ebers (1500 años a. C) describen hasta 700 plantas medicinales con sus prescripciones. Plantas como el hinojo, el ajo, el tomillo, el granado, las hojas de apio silvestre, la coloquintida, el sen, el lirio, el cardamomo, la papaver somniferum (adormidera), la cumín cyminum (estimulante y carminativo), la mandrágora, el c. esculetus, el ricino y la silla, estos últimos empleados, incluso en nuestros día, como purgantes y cardiotónicos. Los dientes de ajo, que utilizaban macerados en vinagre como colutorio dental, anestésico y analgésico odontológico, tenían para ellos tanta importancia, que muchas veces eran depositados en sus tumbas como remedio para la otra vida.<sup>(158, 159)</sup>

Los Chinos, en su teoría central de cinco elementos, hablan de vinos tónicos, del té, de los frutos de la morera, de la aristoloquia, de las raíces de gin-seng, de la efedra, el ruibarbo, la corteza de casia y el alcanfor, plantas que se describen,

claramente, con sus indicaciones, en el “*Libro de las Hierbas*” atribuido al emperador Shan-Mog.<sup>(159)</sup>

En la India, en el Ayurveda (ciencia de la vida), dentro de una serie de hasta 2000 productos, se mencionan raíces y resinas como el jengibre, la canela, el ajo, el sándalo, el asa fétida, el regaliz, el cárdamo, el acónito o la pimienta; elementos que eran aplicados mediante infusiones, pastas, masajes, baños o enemas.

Griegos y Romanos, emplearon los pétalos de caléndula para perfumar sopas, guisos, dar color a las mantecas o como sustituto del azafrán; en ésta y otras plantas, sus “*físicos*”, buscaron, encontraron y ensayaron propiedades que fueran aplicables, terapéuticamente, en Medicina.

Diocles de Caristo, uno de los recolectores de plantas más importantes de Grecia, poseía un herbario dedicado a la Medicina; Teofrasto, al que se conoce como el “primer botánico sistemático”, discípulo de Aristóteles, clasificó las plantas por semillas, hojas, raíces y tallos, y describe en sus trabajos, “*De Historia Plantarum*” y “*De Causis Plantarum*”, más de 500 especies con cualidades medicinales.

Dioscórides, una de las figuras más importantes de Grecia y Roma, señala, en su “*Materia Medica*”, una serie de plantas que clasifica según su nombre, hábitat, aspecto botánico y propiedades de uso médico o droga; y en cuanto a su utilización, indica sus aplicaciones, efectos secundarios, cantidades necesarias y dosificaciones, con lo que, no solo amplió la Medicina herbal mas allá de los principios empíricos, sino trató de encontrar una planta específica para cada enfermedad. En su tratado

sobre agricultura, “*De re rustica*”, Catón el Viejo, habla de la col como un remedio que “*conserva la salud, evita la melancolía y cura heridas y tumores aplicada en emplasto o “machacada”*”; e Hipócrates, padre de la Medicina, poseía un repertorio de más de 300 remedios a base de plantas, algunos de los cuales, hoy, se siguen utilizando.

De Roma, en este sentido, cabe citarse “*De Medicina*” de Cornelio Celso; “*De Compositione Medicamentorum Liber*” de Escribonio o la “*Historia Naturalis*” de Plinio el Viejo, obras que recopila Galeno cuya figura, si es importante en la Medicina, mayor lo es en cuanto a la utilización de plantas como medicamentos.

Entre unos 400 remedios, Galeno describe tres que serían largamente apreciados durante mucho tiempo; la hiera picra (áloe con especias y otras hierbas), la terra sigillata (con creta, sílice y magnesia entre otros) y la triarca (con gran número de materiales) considerada como un poli-fármaco.<sup>(158)</sup>

Durante la Edad Media, los monjes, recopilaron distintas observaciones sobre las plantas; escribieron pequeños tratados (herbarios) e intentaron clasificaciones. Y sobre sus posibles usos, transmitieron todo el conjunto de conocimientos tradicionales que, a lo largo del tiempo, les había llegado.

En esa Edad Media, una mujer excepcional fue la Abadesa Benedictina Santa Hildegard Von Bingen (1098-1179) que, conocida como la “sibila del Rhin”, fue la primera mujer en emplear las plantas según sus propiedades; y probablemente, la

primera especialista en Dermatología, ya que utilizó plantas, animales, árboles y piedras, en el tratamiento de las enfermedades de la piel (impétigo y máculas). A ella se debe la primera descripción europea sobre el uso medicinal de la *Caléndula Officinalis Linn.* planta a la que denominaba “*Ringula*”.

Esta santa alemana, a lo largo de toda su vida, desarrolló una intensa labor religiosa, científica, artística e incluso política. Escribió varios libros, y entre ellos, dos tratados de Ciencia y Medicina: “*Liber Compositae Medicinae* o “*Causae et Curae*” y “*Liber Simplici*” o “*Physica*”, donde, incluyendo conocimientos de botánica y biología, trata las enfermedades, sobre todo, explicando causas y síntomas.<sup>(160)</sup>

En el mundo árabe, Rhazes, un médico originario de Persia, resumió todos los textos que pudo encontrar sobre tratamientos; Avicena en su “*Canon Medicinae*”, recoge una relación de fármacos derivados o no de plantas; un tratado sobre venenos e indicaciones para fabricar píldoras; concepto nuevo frente a infusiones, emplastos, tinturas, pulverizaciones o soluciones que, hasta entonces, eran las formas de aplicación.

En el Renacimiento, con la invención de la imprenta, todos estos conocimientos tradicionales, al difundirse rápidamente, aumentan el interés general y particular por los estudios botánicos. Se difunden y traducen las obras de Dioscórides; se estudian las ciencias naturales que representa Plinio y se analiza el tratado agrícola de Catón; y con el descubrimiento de América, nuevas plantas con

propiedades medicinales usadas por los chamanes indígenas, llegan a Europa con toda la diversidad de un continente y el conocimiento práctico de muchos siglos.

Los Mayas y los Aztecas poseían bibliotecas enteras en las que los “prácticos o físicos” nativos, habían acumulado valiosos manuscritos que informaban sobre sus experiencias y conocimientos. Unos conocimientos que llegan a nosotros a través de naturalistas y expedicionarios como el médico fray Bernardino de Sahagún; el botánico Martín de la Cruz (indio mejicano que escribió en nahuatl la obra “*Libelus Medicinabilis Indorum Herbis*”); Francisco Hernández, quien describe y clasifica en su “*Historia Natural de México*” hasta 1200 plantas; o Nicolás Monarde, médico sevillano que efectúa un verdadero tratado sobre las plantas medicinales del nuevo mundo cuando, en 1574, escribe su célebre “*Historia Natural de las Cosas que se traen de Nuestras Indias*”.

En el s. XVII, Carl Von Linné (1731) botánico y médico sueco, más conocido como Linneo, describe y define, basándose en características morfológicas, más de ocho mil especies; y Bernard Jussieu, las bases de un método natural de clasificación. En 1783, tras una muy interesante expedición, José Celestino Mutis, sacerdote, médico y naturalista, en su “*Flora de la real expedición botánica del Nuevo Reino de Granada*” describe hasta veinte mil plantas; y en 1962, Pio Font Quer, publica el libro “*Plantas Medicinales, el Dioscórides renovado*”; un tratado en el que se detallan seiscientos ochenta y dos especies de plantas medicinales. <sup>(158, 159)</sup>

Es evidente, pues, que, a tenor de lo dicho, desde los inicios de la humanidad hasta la actualidad más inmediata, las plantas han constituido la fuente donde el hombre ha recurrido y sigue recurriendo para encontrar nuevos principios activos susceptibles de ser aplicados en Medicina, Odontología y Farmacología; e, incluso, Veterinaria y Cosmética. Evidente que muchos medicamentos actuales, provienen de fuentes vegetales tradicionalmente empleadas por aborígenes de todo el mundo; y evidente que, actualmente, existe un renovado interés, por encontrar o dar nuevas aplicaciones a principios activos contenidos en esas u otras plantas; lo que también parece demostrarse, por la gran cantidad de trabajos que investigadores a nivel individual o incluidos en proyectos estatales, realizan en todo el mundo. Proyectos y trabajos sobre planta medicinales, que si en África, Asia, Australia o Europa, con gran reconocimiento de su importancia, constituyen un 20% de los estudios actuales, ni que decir tiene el reconocimiento e importancia que han adquirido en América, donde más del 40% de todas las investigaciones se realizan en este campo. <sup>(161)</sup>

#### I. 5. 2. PLANTAS EN EL RPD Y OTROS USOS MÉDICOS Y ODONTOLÓGICOS

Aunque más adelante, cuando nos refiramos más concretamente a la *Caléndula Officinalis Linn. Europea*, hablaremos de una serie de trabajos realizados con ella y otras plantas, aquí, a modo de introducción en el tema, solo mencionaremos algunos ejemplos de las que se han usado y/o usan en Medicina y Odontología como remedios curativos en diversas afecciones.

Y en este sentido, no nos queda más remedio que señalar que, si bien existen algunos estudios que hablan del uso de algunas plantas, incluso, en el RPD, respecto al empleo de la *Caléndula* en esta técnica, no hemos podido encontrar ninguno, razón por la que pensamos que el nuestro es el primero que se realiza con ella, y por lo tanto, puede definirse como un trabajo de investigación verdaderamente original.

El llamado *Bálsamo del Perú*, es una óleo resina obtenida de un árbol de corteza grisácea que ya los Incas utilizaban tanto en los trastornos respiratorios, como para combatir la fiebre o cicatrizar las heridas. El *Llantén* fue empleado como laxante, emoliente, cicatrizante y antiinflamatorio; y la *Rauwolfia Heterófila Willad* (el chacmun de los Mayas) en las caries y otras molestias dentales. La *Matricaria Recutita* o Manzanilla, se empleaba y emplea en enjuagues o colutorios para evitar la formación de la placa dento-bacteriana, la desmineralización del esmalte y las inflamaciones gingivales. El *Aloe Vera* o Sabila, por sus propiedades anti-inflamatorias y cicatrizantes, en casos de gingivitis y hemorragias gingivales; el *Xilytol* del Abedul, azúcar que no puede ser fermentado por las bacterias de la boca (empleado actualmente en forma de chicle), estimula el flujo salival, neutraliza los ácidos, impide el crecimiento bacteriano y disminuye la incidencia de caries. Y el *Propóleo*, sustancia derivada de muchas plantas, como anti-inflamatorio, preventivo de caries, antibacteriano frente al *S. Mutans* y, en solución éter-etanol al 50%, como barniz dentario.<sup>(162)</sup>

En el año 2007, Li, Jiang y cols. estudiaron la actividad antiviral de los triterpenos de la *Schefflera Heptaphylla*; De Castro, Hoshino y cols. Los efectos

ansiolíticos de los extractos de la *Pasiflora Quadrangularis Linn.* en modelos experimentales; y Suzutani, Ogasawara y cols. el extracto de la *Ribes Nigrum Linn.* frente al Herpes-virus. <sup>(163, 164, 165)</sup>

De la *Digitalis Purpúrea* y *Digitalis Lanata*, se obtuvo la digitalina al descubrirse en estas plantas los glucósidos. Desde el s. XVI se emplea *el Agua de Cebada*. Y las raíces de *Tezonpahtlí* y *Tecuammaitl* eran utilizadas por los indios precolombinos para curar la sarna. <sup>(161)</sup>

La *Malaleuca Alternifolia* era usada por los aborígenes de Australia en heridas, cortes y congestiones nasales. Su aceite, que tiene amplio espectro antimicrobiano, se emplea, hoy, no solo en cosmética, sino como antiséptico en diversas terapias tradicionales.

De la *Hoalanthus Mutans*, (euphorbiacea usada por los curanderos de Samoa para combatir la fiebre amarilla), se ha aislado un potente antiviral frente al HIV-1 (el prostatin; un diterpeno); la *Azadirachta Indica* (curcubitácea) se emplea como insecticida desde muy antiguo en la India; y la *Lycianthes Moziniana*, por sus altos niveles de vitamina C y taninos, resulta planta de interés, desde el punto de vista nutricional. La especie *Pilocarpus*, (de la que se obtuvo la pilocarpina) es usada en el glaucoma; la *Pruna Africana* o *Pygeum Africanus* en afecciones de la próstata; la *Camelia Sinensis* como diurético y antiespasmódico, y la *Rauwolfia Serpentina* en los casos de hipertensión. <sup>(161)</sup>

Hoy, nuevos medicamentos, algunos incluidos ya en las prestaciones de la sanidad pública, son nuevas o renovadas extracciones de principios vegetales: un extracto alcohólico de *Thimus Vulgari* y *Drosera Rotundifolia*, se emplea para la tos con el nombre de Pilka; otro de *Soja* (*Glycine Max* Linn.) que contiene isoflavonas, comercialmente Fitoladius y Flavia, se utiliza en la menopausia para combatir los sofocos, la irritabilidad y el insomnio. El extracto de *Ginko Biloba* Linn. (Tanakene), dado sus flavonoides, mejora la microcirculación; los de raíz de *Harpagophytum* en el vértigo y dolores reumáticos; los extractos de semillas de *Papaya* (papaina) para curar las caries; y desde hace unos meses, los extractos y zumos de arándanos han mostrado ser eficaces en la prevención de infecciones urinarias (Cystus).

Otras plantas actualmente en plena investigación que debemos mencionar por la importancia que están teniendo sus principios activos y sus posibles aplicaciones (investigaciones etnobotánicas de última hora), son la *Ancistroclaudus Korupensis*, típica de los bosques de Camerún, y la *Calophyllum Lanígerum* de Malasia, las cuales presentan una notable actividad frente al HIV-1 y HIV-2, (virus del SIDA) además, de frente a otras numerosas cepas de virus resistentes a la azatropina (AZT); o la ya mencionada *Schefflera Heptaphylla*, (araliaceae), cuyos triterpenos y saponinas hacen que sea activa frente al virus sincitial respiratorio (RSV) y otros como el coxsackie o el herpes simple. <sup>(161, 163)</sup>

Dentro de la Odontología, Lahoud y cols. <sup>(166)</sup> compararon, histológicamente, los efectos de una pasta de *Uncaria Tormentosa* (uña de gato o garabato amarillo) y

el hidróxido de calcio (Dycal) en RPDs realizados en 32 premolares jóvenes humanos.

En este trabajo, pudieron comprobar que, usando esta pasta como material de recubrimiento, se inducía una más rápida cicatrización de la lesión pulpar y una mayor formación de dentina terciaria, de colágeno y capilares que si empleaban Dycal; material con el que, en este estudio, la cicatrización fue más lenta, la formación de colágeno pobre y la presencia de neo-formación capilar escasa. Para ellos, la cicatrización pulpar y la mínima inflamación detectada, se debe a la actividad reparativa de los cuatro alcaloides que posee la *Uncaria*: la pteropodina, la isopteropodina, la isomitrafalina y la isorinchorofilina.

Gutiérrez Lara <sup>(167)</sup> con objeto de determinar la respuesta del tejido pulpar, analizó una asociación experimental de *Uncaria Tormentosa* e hidróxido de calcio (cemento convencional Grossman) en tratamientos endodónticos. En ese trabajo experimental, el autor encontró que el hidróxido de calcio y la *Uncaria Tormentosa* (medicamento natural con propiedades antiinflamatorias) no solo no se antagonizaban, sino que eran bien tolerados biológicamente por el organismo. Para él, esta asociación podía considerarse un material biológicamente aceptable favorecedor de la proliferación fibroblástica y del depósito de fibras colágenas; al menos, en los periodos establecidos. Recomienda su aplicación en el RPD, en el RPI y en las pulpotomías.

Rosen y cols. y Yu y cols. estudiaron una infusión y un extracto de *té negro* y *té verde* en hamsters y en ratas y humanos respectivamente. Trabajos en los que la conclusión fue que, en virtud de sus floruros, taninos y otros componente, el té, tenía efectos anticariogénicos. <sup>(168, 169)</sup>

Herold, Cremer, Calugaru y cols. (2003) <sup>(170)</sup> analizaron y compararon los efectos anti-inflamatorios de extractos hidro-alcohólicos de *Caléndula Officinalis*, *Hypéricum Perforatum*, *Plantago Lanceolata* y *Glycyrrhiza Gabra*. Como control emplearon un extracto (nimesulide) del que se conocía su capacidad para inhibir la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la lipoxigenasa (5-LO). Para ellos, los extractos de Hypericum y Glycyrrhiza, inhiben la acción de la (5-LO); y los de Plantago Lanceolata y Glycyrrhiza, la actividad de la (COX-2), enzimas llaves en la producción de sustancias pro-inflamatorias: eicosanoides procedentes del ácido araquidónico y leukotrienos. Por ello es por lo que piensan que estas plantas pueden incluirse en la lista de las especies que tienen actividad antiinflamatoria.

En el año 2005, Sabir, Tabbu, y cols. analizaron la respuesta pulpar en dientes de rata Sprague Dawley a las que habían realizado RPDs con *Propóleo*; un material resinoso extraído de la miel de abeja de diversas plantas, que siempre tuvo tradición de ser antiinflamatorio y antibacteriano. En este trabajo emplearon como material control el óxido de zinc (grupo I), y respecto al propóleo, en un grupo, propóleo con sus flavonoides (grupo II) y en otro propóleo sin ellos (grupo III). Los animales fueron sacrificados a los siete días, y a las dos y cuatro semanas post-tratamiento; y los resultados señalaron que en los grupos I y III, en la primera semana, aparecía inflamación y no existía formación de puentes dentinarios; en cambio, en el grupo II,

sin inflamación en la primera semana, encontraron evidencias de inflamación y formación de dentina terciaria a las 2ª y 4ª semanas post-tratamiento; por lo que, para ellos, el RPD con propóleo con flavonoides, no solo disminuye la inflamación en la pulpa dental de animales tratados con este material, sino que induce la formación de dentina de reparación. <sup>(171)</sup>

## I. 6. LA CALENDULA OFFICINALIS LINNÉ EUROPEA

Hasta aquí, hemos recordado lo que sabemos sobre el Complejo Dentino-Pulpar; como se defiende ante las agresiones; lo que entendemos por recubrimiento pulpar directo; cuales son sus indicaciones y contraindicaciones; como realizar su técnica, y los materiales empleados en ella. Hemos recordado, la importancia que las plantas han tenido y siguen teniendo en Medicina, Odontología y Farmacología; como constituyen el reservorio de muchos principios activos; cuales han sido y son sus aplicaciones generales; sus aplicaciones en Medicina tradicional; sus actuales aplicaciones, y su empleo en diversas afecciones y técnicas odontológicas. Ahora, para finalizar esta introducción a nuestro trabajo de Tesis Doctoral, nos centraremos en las características, cualidades y aplicaciones de *La Caléndula Officinalis Linné Europea*, planta objeto de nuestra investigación en el RPD.

Esta planta, conocida desde la antigüedad como hierba medicinal, es una planta aromática con flores, cuyo color, va desde el amarillo pálido al naranja o dorado. Nativa de Egipto, propia de las regiones mediterráneas y ampliamente cultivada en Europa desde el s. XII, hoy, se encuentra distribuida en los climas

templados de todo el mundo; lo que justifica se la conozca por muy diversos nombres: *caltha officinalis*, *maravilla*, *verrucaria*, *capetuda*, *flamenquilla*, *flor de muerto*, *mercadela*, *marigold*, *reinita*, *flor de todos los meses*, *mary gowles*, *souci des jardins*, *ringelblume*, *uchuq'aspa* y *botón de oro* entre otras denominaciones.

Aunque los romanos la conocían como *solsequium*, porque a lo largo del día sigue al sol como los girasoles, el nombre de caléndula, le viene del latín *calendulae* o *calends* (calendario) porque, los mismos, observaron que florecía en cualquier estación del año al inicio de cada mes.

No existe confirmación de que esta planta sea la que Plinio, Columela o Virgilio conocieran como *Caltha*; ni que sea la *Klymenon* que describe Dioscórides. Lo seguro es que su primera referencia en Europa, se debe a la ya mencionada benedictina alemana Santa Hildegard von Bingen, quien, en sus tratados “*Physica*” y *Causae et Curae*” la recomendaba para tratar el impétigo y manchas de la piel.<sup>(172)</sup>

#### 1.6.1. CALÉNDULA: ASPECTOS BOTÁNICOS, BIOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS

La *Caléndula Officinalis* Lin. (asteraceae /familia de las compuestas), es una planta herbácea de carácter anual, tallo recto-angular y ramoso, más o menos piloso, que alcanza unos 30-60 cm. de alto. Comprende unas 20 especies; y al no conocerse su verdadero origen, se cree sea una creación hortense de otras razas silvestres como la *Caléndula Arvensis*.

Posee hojas de color verde claro o verde oliva, simples, alternas, fusiformes, algo gruesas, de 5 a 15 cms de largo, enteras o ligeramente dentadas. Sus flores, utilizadas desde la antigüedad tanto en ornamentación como en preparaciones culinarias y farmacéuticas, con un 0,2-0,3% de esencias y un 8-10% de agua, poseen olor desagradable y sabor amargo. Estas se encuentran reunidas en capítulos.

Las centrales son hermafroditas o masculinas. Y las periféricas (femeninas) son productoras de frutos. Dispuestas en filas simples o dobles, como hemos mencionado, su color va desde el amarillo claro al anaranjado o dorado; y sus pétalos, lanceolados, alternos, pilosos y de márgenes dentados, suelen abrirse al amanecer y cerrarse por las noches.

Sus frutos, en aquenios ovalados (frutos secos de una sola semilla) tienen una porción ventral rugosa y un dorso provisto de protuberancias; y la raíz, (amarillo pálido) es cilíndrica y peluda. La *Caléndula* florece en cualquier tipo de suelo. <sup>(173)</sup>

Desde el punto de vista Farmacognóstico (estudio de los principios activos tal cual se encuentran en la naturaleza), hemos de señalar que, según se desprende de la literatura consultada, en investigación o uso de sus hojas y flores, ni la fecha en la que se plante, ni el tipo de secado, influyen en la mayor o menor presencia de metabolitos y/o principios activos en esta planta, aunque, con objeto de preservar la mayor cantidad de los mismos, en investigación y uso, se aconseja que el secado tenga lugar lo más próximo a su recolección a temperaturas no superiores a los 80° C.

Es una planta muy resistente, que se cultiva por siembra directa de semillas, que suele germinar sobre los 15 días, florece en cualquier tipo de suelos y requiere pocos nutrientes. Las principales enfermedades que le atacan son el oidium y los pulgones.

Desecadas a la mencionada temperatura, las flores y hojas de la *Caléndula*, mantienen, casi íntegramente, la cantidad de carotenoides, flavonoides y otros principios que posee, ya que solo pierden, aproximadamente, un 25% y un 28% del total, respectivamente; mientras que a temperaturas superiores (por encima de los 100%), la cantidad de principios activos que pueden obtenerse de ellas, se reduce mucho.

*BIOQUÍMICAMENTE*, las flores de *Caléndula Officinalis* Linn. se encuentran constituidas por un amplio espectro de compuestos que, en principio, parecen estar en concordancia con las propiedades terapéuticas que se le atribuyen. Los más estudiados dado su interés farmacológico y cosmético (científicamente demostrados), son los *carotenoides*, (contenido total de 1,5%) los *flavonoides* (con un contenido de 0,88 y 0,33% en flores y receptáculos respectivamente) y los *triterpenos*.

Entre los primeros se han identificado alfa, beta y gamma carotenos: violaxantina, rubixantina, citroxantina, flavocromo, flavoxantina, galenina, luteína, licopeno, valentiaxantina, auroxantina, microxantina, 5,6-epoxicaroteno, beta-zeacaroteno, mutatoxantina y lutein-epóxido.

Y entre los segundos (Flavonoides) heterósidos de quercetol y de isorhamnetol: isorhamnetina-neohesperidósido, isorhamnetina, isorhamnetina-3-O-glicósido, rutósido, rutinósido, compuestos glucoisídicos, quercetina, isoquercetina, quercetinoglucósido, narcisina, calendo-flavosido, calendo-flavobiosido. <sup>(174)</sup>

Para obtener los carotenoides totales, se utiliza la extracción total con diclorometano, cinco veces durante 6-9 horas a temperatura de 25° C; o bien extracción con éter de petróleo a 45° durante 4 horas. Bako, Deli y Roth, (2002) obtuvieron flavoxantina, auroxantina y un lutein y Beta-caroteno de los pétalos y polen de la *Caléndula* por maceración de la planta con metanol (MeOH) durante 20 horas, y posterior tratamiento con etanol, filtrado y análisis por cromatografía de líquidos. Otros para cuantificar los carotenoides totales en tinturas de esta planta, emplean la saponificación de sus extractos con éter de petróleo y evaluación espectrofotométrica de las sustancias insaponificables en etanol al 95%. <sup>(175)</sup>

Los flavonoides, en general, se extraen de las flores y hojas desecadas. Se maceran con acetona-agua (2:3); el extracto, después, es desprovisto de la acetona; se satura con cloruro sódico (NaCl), se filtra y se extrae con butanol. Otro método parece ser la extracción de los flavonoides totales mediante etanol, cuatro veces durante 6-9 horas. Pietta, y cols. trituran las flores desecadas y las desgrasan con éter de petróleo on-hexano. Para obtener los principios, tratan el extracto con etanol puro al 70% y utilizan la cromatografía en capa fina y la cromatografía de líquidos (high-performance liquid chromatography (HLPC)). <sup>(176)</sup>

Otros principios activos propios de la *Caléndula Officinalis* Linn. son: los triterpenos (el ursadiol, los trihidroxi-ursaenos, los heliantrioles A0, B1, B2 y C, el lioliólido, el calendulósido F y los 3,16,28-trihidroxi-olean-12-eno, entre otros); las saponinas, que presentan en su composición el ácido oleanoico; los aceites esenciales (calendulina, pedunculatina, cariofileno etc.); derivados de los ácidos orgánicos láurico, mirístico, palmítico y margárico; los ácidos oleanóico y salicílico; ésteres colestéricos (provitamina B), la calendina (principio amargo), resinas, mucilagem, iodo orgánico, clorofila, resina neutra, almidón, azúcar, polisacáridos y sustancias peptídicas. <sup>(174, 177, 178)</sup>

Kishimoto, Maoka, Sumitomo y cols. en el 2005, efectuaron un estudio sobre los carotenoides presentes en los pétalos de *Caléndula Officinalis*. Encontraron que en ellos había hasta un total de 19 tipos de carotenoides. Chushenhko encontró, además de los principios mencionados, minerales como el acetato de calcio, oxalato de calcio, silicio, y en menor cantidad, carbonato y sulfato de potasio; e Istudor y Dedio, taninos del tipo catecol y pirogallol. <sup>(179, 180, 181, 182)</sup>

Para Yoshikawa y cols. y Murakami y cols. (que detectaron dos nuevas iononas glucosídicas: officinosido A y B en caléndulas egipcias) los flavonoides glicosilados, las calendulo-saponinas A, B y C, y los triterpenos oligo-glicosídicos de la *Caléndula*, confieren a los extractos de sus flores propiedades hipoglucemiantes y protectoras para el aparato digestivo. <sup>(183, 184)</sup>

Della Loggia, Tubaro, Sosa y cols. han señalado que los triterpenos confieren a esta planta capacidad antiinflamatoria; sobre todo, el mono-éster de foradiol; algo que parecen confirmar Hamburger, Adler, Baumann y cols. cuando, estudiando los triterpenos de la *Caléndula Officinalis Linn.* llegan a la conclusión de que el foradiol 3-O-laurico, palmítico y mirístico son los mejores antiinflamatorios que esta planta posee. <sup>(185, 186)</sup>

Según Zitterl-Eglseer y cols. Esta planta es antiedematosa; y para Akihisa y cols. , que aislaron e identificaron hasta 11 triterpenos diferentes en distintas plantas, estas sustancias, en la *Caléndula*, son las que le dan la capacidad anti-inflamatoria; un hecho que comprobaron en ratas, a las que, experimentalmente, habían provocado una inflamación. <sup>(187, 188)</sup>

*FARMACOLÓGICAMENTE*, aunque para algunos existe y para otros no una clara correlación entre sus principios activos y sus acciones farmacológicas específicas, en términos generales, según diferentes autores, trabajos e investigaciones, los extractos e infusiones de flores u hojas de *Caléndula Off.* ofrecen una amplia serie de propiedades que la han hecho y hacen utilizable farmacológicamente en distintas afecciones.

Cura las heridas; se puede emplear como colutorio en estomatitis, gingivitis y piorrea; es beneficiosa en la gastritis, en las úlceras gastro-duodenales y otras afecciones gastro-intestinales; es antiinflamatoria, antiséptica, antibacteriana, cicatrizante; emenagoga, hipolipemiente e inmuno estimulante; y según recientes

investigaciones, presenta una capacidad anti VIH-1 similar a la Azatropina (AZT), ya que sus extractos inhiben la transcriptasa inversa que el virus necesita en su reduplicación.

Los flavonoides glucosídicos, parecen ser los principales constituyentes con propiedades anti-inflamatorias y cicatriciales; el ácido oleoico, el responsable de su acción suavizante en dermatitis, pieles enrojecidas o sensibles; y los triterpenos, poseen propiedades antiinflamatorias, antiedematosas, antisépticas y favorecedoras de la regeneración tisular. <sup>(174, 188, 189, 190, 191,192)</sup>

Sus flavonoides, además, son antioxidantes, inhiben enzimas como la hialuronidasa, disminuyen la infiltración leucocitaria, son antipiréticos e incluso anticolesterolémicos; las saponinas tienen efectos antitumorales; y los principios amargos como la calendina, aunque no bien conocidos, parecen tener acciones coleréticas.

Para Lavagna y cols. los aceites de *Caléndula* como los del *Hypéricum*, son eficaces en la reconstrucción epitelial de las heridas quirúrgicas tras cesárea; y para Corina, Dimitris y cols., que el extracto de la misma, asociado al Aciclovir (antiviral) cura completamente las úlceras oculares provocadas por queratitis herpética, de una forma más efectiva que empleando solo el antiviral. <sup>(193, 194)</sup>

En el 2005, Duran y cols., comprobaron, clínicamente, que los ungüentos o extractos de *Caléndula*, favorecían la epitelización en los casos con úlceras varicosas

de miembros inferiores; y Bashir y cols. (2006) que los extractos hidro-alcohólicos (50/50) de sus flores, poseen constituyentes tanto espasmogénicos como espasmolíticos; efectos que producen mediante el bloqueo de la cadena del calcio y la acción colinérgica respectivamente. Esto permite que pueda ser usada tanto en los espasmos abdominales como en el estreñimiento. <sup>(195, 196)</sup>

*LAS FORMAS EN LAS QUE PUEDE APLICARSE* esta planta en Medicina y Odontología, tradicionalmente, va desde las infusiones y tinturas, a las cremas y ungüentos para la piel; pasando por los extractos y remedios homeopáticos en forma de tabletas o píldoras.

Según trabajos dedicados a la composición y efectos atribuidos a sus principios activos, las preparaciones e indicaciones de esta planta, han sido muy variadas; y en este sentido, siempre fueron sus flores y hojas las partes a las que se concedieron mayor eficacia

Por vía oral, las infusiones de sus flores y hojas, se empleaban y emplea, en homeopatía, como remedio contra la gastritis, la indigestión y la ictericia; en afecciones respiratorias, en el catarro común, influenza o tos; en la artritis y en los síntomas menopáusicos. Tópicamente, a modo de cataplasma, compresas, emplastos o pomadas, en el tratamiento de las úlceras varicosas de miembros inferiores, en las contusiones, llagas, heridas, quemaduras y hemorroides; y como colutorios o en forma de gargarismos, en las afecciones bucofaríngeas o bucodentales.

La tintura de sus flores, cualidad demostrada actualmente mediante estudios farmacológicos, se emplea para regular la menstruación, combatir la dismenorrea, la nefrosis y los dolores viscerales en general; mientras que la de sus hojas, tópicamente, en el tratamiento de erupciones, escrófulas, odontalgias, gingivorragias, aftas y/o heridas bucales, estomatitis, alveolitis y abscesos periodontales marginales.

El jugo de sus flores frescas era y es aplicado en los casos de picadura de abejas; los polvos de sus hojas desecadas, inhalados, para inducir la descarga de moco en los casos de sinusitis; y los extractos de la planta, para acelerar los procesos de cicatrización y favorecer la formación de tejido de granulación. Extractos que, además, resultan ser inhibidores de la proliferación bacteriana, analgésicos tópicos, tranquilizantes, y curativos frente a forúnculos y abscesos. <sup>(172, 178)</sup>

Actualmente, estos extractos también se consideran efectivos en las dermatitis debidas a irradiación terapéutica en mujeres con cáncer (Pommier y cols. , 2004), y en el VIH-1, porque inhibe la enzima transcriptasa inversa de vital importancia para el virus (Kalvatchev y cols.). <sup>(197, 192)</sup>

En el 2006, Jiménez Medina y cols. , realizaron un trabajo “in vivo” e “in vitro”, en ratas, donde demostraron que los extractos acuosos de *Caléndula Off. Linn.*, tenían actividad antitumoral y podían inhibir el crecimiento de varios tipos celulares. <sup>(198)</sup>

Durante el tiempo que duró la guerra civil americana, los médicos, en el campo de batalla, emplearon *tintura madre de flores y hojas de caléndula* para tratar las heridas de cualquier tipo, tamaño o aspecto. Los resultados eran, a la vez que extraordinarios, sorprendentes, no solo desaparecía rápidamente el dolor de la herida, sino que a las 48 horas post-tratamiento con este material, las supuraciones disminuían llamativamente hasta desaparecer.<sup>(199)</sup>

Dumenil señala que los extractos hidro-alcohólicos de *Caléndula Off.* presentan actividad antimicrobiana, sobre todo, contra el *Staphylococcus aureus* y *S. Fecalis*; Michel y Fleischner que poseen actividad antiinflamatoria y cicatrizante tanto en animales de experimentación como en humanos; y para Iauk y cols. (2003) que poseen actividad antimicrobiana frente a bacterias anaeróbicas periodontopáticas.<sup>(177, 200, 201, 202)</sup>

Wagner describe que los polisacáridos de alto peso molecular que poseen los extractos hidro-alcohólicos de *Caléndula*, le confieren propiedades inmunoestimulantes; y Rocaud que, en virtud de sus saponinas, presentan actividad antitumoral, citotóxica, espermicida y abortiva.<sup>(203, 204)</sup>

Desde el punto de vista odontológico, algunos trabajos señalan que, el extracto de *Caléndula Officinalis*, además de favorece la reparación de las heridas post extracción dentaria y acelerar, marcadamente, la neoformación de hueso trabecular alveolar, cura la gingivitis crónica catarral y son efectivos en las periodontopatías.

Y así, en un estudio prospectivo, longitudinal, comparativo y observacional realizado por Sánchez, Ibarra y cols. en conejos, estos autores llegan a la conclusión que la utilización de un extracto hidro-alcohólico de caléndula, aplicado tópicamente tras la exodoncia, reduce el tiempo de aparición del trabeculado óseo y su regeneración. Una acción que, para ellos, podía ser debida a que los extractos de esta planta estimulan una serie de mediadores locales muy similares a los que estimulan el crecimiento (IGF-1 y TGF-beta) o las prostaglandinas (PGS).<sup>(205)</sup>

Según Balducci-Roslindo (1999), estos extractos inducen, además, una rápida cicatrización de las heridas post-extracción, impidiendo, por demás, la supuración en las mismas; una acción antiséptica que estos autores atribuyen a los aceites esenciales de la planta.<sup>(178)</sup>

Trabajos realizados “in vivo” con enjuagues bucales herbales que contenían *Caléndula*, han demostrado su eficacia en la reducción del sangrado gingival. En efecto, en el año 2005, Lauten, Boyd y cols. efectuaron un estudio clínico usando como enjuagues bucales extractos de *Melaleuca*, *Manuka*, *Caléndula* y *Té verde*. Aunque señalaban que eran necesarios mayores estudios, concluyeron que la *Caléndula* era eficaz para reducir el sangrado gingival.<sup>(206, 207)</sup>

En un estudio sobre la actividad anti-microbiana de diferentes plantas (*Arnica Montana*, *Althaea offic.*, *Melissa Offic.* y *Caléndula*, entre otras), pudo observarse

que en cuanto a la *Caléndula* se refería, sus extractos eran efectivos contra las bacterias anaerobias y las bacterias aerobias facultativas periodontopáticas. <sup>(202)</sup>

Jimenez-Medina y cols., autores para quienes la *Caléndula* tiene propiedades antiinflamatorias, antivirales y anti-genotóxicas, efectuaron en 2006, una evaluación “in vitro” e “in vivo” de la citotoxicidad anti-tumor, y actividad inmunomodulatoria y efecto anti-tumor, respectivamente, de un extracto de *Caléndula* activado mediante Láser. Sus resultados indicaron que este nuevo extracto (así obtenido), “in vitro”, presentaba dos actividades complementarias con potencial terapéutico antitumoral: actividad citotóxica para las células tumorales y activación de los linfocitos; e “in vivo”, actividad antitumoral frente a células de melanomas humanos inyectadas, subcutáneamente, en ratones. <sup>(198)</sup>

Desde el punto de vista toxicológico y/o efectos colaterales, hemos de decir que, aunque los granos de polen pueden producir, como los de cualquier planta, estados alérgicos, no se ha demostrado que la *Caléndula Officinalis Linn.* o sus preparados, tengan toxicidad o efectos adversos; al menos, en los estudios clínicos de aplicación tópica prolongada realizados. Sobre la seguridad, gusto y eficacia de los enjuagues constituido por aceites esenciales y extractos de plantas, entre ellas de *Caléndula*, Lauten y cols. señalan que los enjuagues de ésta, carecían de capacidad para producir alteraciones en signos vitales, lesiones orales u otros cambios orgánicos. Es decir carecían de efectos secundarios o adversos. <sup>(207)</sup>

No obstante, existe un trabajo “in vitro” sobre extractos de flores de *Caléndula Offic.* en ratas publicado en el año 2006 por Barajas-Farias y cols., en el que se señala que los mismos poseen una acción dual opuesta; por un lado, a dosis bajas, es quimioprotector; y por otro, en altas dosis, hepatocarcinogénico en el hígado de ratas.<sup>(208, 209)</sup>

Considerando sus principios activos aisladamente, no hemos podido encontrar trabajos sobre su toxicidad; ni tampoco sobre la toxicidad o efectos colaterales en relación con la dosis de administración terapéutica.

## **I. 7. LA RATA NORVEGICUS ALBINUS**

El nombre de Noruega, Norway o Norvegicus, en este tipo de rata, fue aplicado por primera vez por Berkenhout quien, en 1769, le dio, inicialmente, el nombre científico de *Mus Norvegicus* para después denominarla Norway. Actualmente se la considera una variedad albina de la *rattus rattus norvegicus*. Es originaria del sudeste de Asia desde donde, al parecer, emigró al oeste de China e India para llegar, posteriormente a Europa. Este espécimen es más grande y fuerte que la rata común o la rata negra; y en los casos en los que han llegado a convivir ambas, la *Norvegicus* se ha constituido en la dominante del hábitat.<sup>(210)</sup>

Como cualquier roedor, sólo tiene un incisivo y tres molares en cada cuadrante de la boca. Por lo tanto carece de caninos y premolares. El primer molar es el mayor en todos los cuadrantes, seguido del segundo y tercer molar; por ello, es el más indicado para la realización de estudios experimentales tanto a nivel de caries

simples, como a nivel de caries o pérdidas de estructuras que involucren a la dentina y/o a la pulpa. <sup>(211)</sup>

Los incisivos son dientes inusuales; y lo son, no solo porque continúan creciendo a lo largo de toda la vida del animal, sino porque, además, solo poseen esmalte en el borde incisal. Los molares, especializados en la trituración de los alimentos, poseen cúspides aplanadas con ondulaciones transversales; y su superficie patrón, es tritubercular. Presenta, pues, tres cúspides principales: precónica, paracónica y metacónica en los molares superiores; y protoconídea, paraconídea y metaconídea, en los inferiores.

Los estadios o fases de desarrollo son los mismos tanto para los incisivos como para los molares. Presentan cuatro fases: crecimiento, calcificación de la matriz depositada, erupción de los dientes y fase de atrición o frotamiento funcional, aunque en los molares, el esmalte y la dentina son de crecimiento limitado.

La pulpa (órgano formador de la dentina que se encuentra dentro de su cavidad central después de que la dentina primaria se ha formado completamente) bajo el estímulo del frotamiento propio en estos animales, forma nueva dentina o dentina secundaria. En la rata adulta, un tercio o más de la longitud relativa de la raíz (en número de 3 a 5) está formada sólo por cemento. La erupción de los molares es continua a lo largo de toda su vida, pero ocurre tan lentamente, que apenas puede percibirse. La erupción se acelera tras la pérdida de un antagonista.

Una de las características, por demás propia de los roedores, es el mencionado continuo frotamiento molar; un lento pero mantenido frotamiento durante toda la vida que se compensa por la mencionada lenta erupción de los dientes, y la formación de dentina y cemento secundario. Debido a los estímulos que proporciona este frotamiento o bruxismo en estos animales, se generan, además, nuevas células formadoras de dentina y hueso alveolar. <sup>(210, 211)</sup>

La histología y fisiología de los tejidos dentales de esta rata, son similares a la de los molares humanos, y en particular, a la de los tejidos periodontales. El que los molares de estas ratas posean forma y funciones similares a las que tienen los dientes humanos, permite que podamos realizar en ellos estudios experimentales sobre caries, pérdidas de dentina o regeneración ósea; lo que, dada su forma cónica y su rápido desgaste, no es posible en incisivos.

## II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL ESTUDIO

Desde que Hartman, en 1930, introdujera en los tratamientos de la pulpa el *Hidróxido de Calcio*, aunque se han empleado diversos materiales en el RPD, éste, ha sido, y sigue siendo, el material de elección.

Sin embargo, el que esto sea así, no quiere decir que, el mismo, carezca de inconvenientes. Inconvenientes que, no solo justifican la investigación en este campo, sino que permiten, por demás, el continuo ensayo de distintos materiales, siempre, con la esperanza puedan constituir alternativas mejores al mismo.

Actualmente son muchos los trabajos y autores que, con renovado interés, tratan de encontrar esos nuevos materiales y/o principios activos, en flores y plantas que, como el *Hypericum Perforatum*, la *Caléndula Off. Linn.*, el *Te Negro y Verde*, la *Uncaria Tormentosa*, la *Rawolfia Serpentina* o el *Gin-Seng*, entre otras muchas, tienen, tradicionalmente, reconocidas propiedades medicinales.

Por ello, como a la *Caléndula Officinalis Linné (C. Off. L)*, desde antiguo se le han atribuido, entre otras propiedades, la de ser bactericida, cicatrizante, antiinflamatoria, anti-tumoral, antiséptica, antioxidante y reparadora de tejidos, nosotros hemos creído podría ser interesante, dentro de este tipo de líneas de investigación, realizar un trabajo sobre la posible utilización de un *extracto hidroalcohólico* de estas flores, como material de recubrimiento, en el recubrimiento

pulpar directo (RPD); sobre todo, cuando, hoy, algunos estudios odontológicos con esta planta, parecen demostrar que, en animales de experimentación y en molares humanos de pacientes jóvenes, estos extractos, reparan rápidamente las heridas post-extracción dentaria, aceleran la neoformación de hueso trabecular alveolar post-extracción, disminuyen la inflamación pulpar y son efectivos en periodontopatías.

Un trabajo clínico-histológico, experimental, de investigación básica, en el que, utilizando, como acabamos de decir, dicho *extracto hidro-alcohólico de flores de caléndula officinalis Linné europea* como material de recubrimiento, en RPDs realizados en primeros molares inferiores de ratas *Norvegicus Albinus*, consideramos como un intento más dentro de ese renovado científico interés por las plantas y sus principios. Trabajo de investigación para el que, en este modelo experimental, hemos planteado un objetivo general y algunos específicos.

COMO OBJETIVO GENERAL, observar si usando dicho extracto como material recubridor en el RPD, el mismo, es capaz de inducir la formación de dentina terciaria en la pulpa dental (intencionadamente expuesta) de ratas *Norvégicus Albinus*; y, al mismo tiempo, analizar, si los hubiera, otros posibles efectos sobre el complejo dentino-pulpar.

Y COMO OBJETIVOS ESPECÍFICOS, a través de cortes histológicos seriados próximo-distales de los molares tratados,

- 1.- Observar si el extracto hidro-alcohólico de flores de *Caléndula Officinalis Linn. Europea* es capaz de inducir la formación de dentina terciaria al ser aplicado en el RPD.
- 2.- Determinar que otros posibles efectos tiene el extracto de *Caléndula*, sobre la pulpa dental en los mencionados animales de experimentación.
- 3.- Comparar los efectos observados, con los que, según la literatura, se producen al emplear, en ésta técnica, el *Hidróxido de Calcio*.
- 4.- Suponiendo que hubiera alguna diferencia entre la formación general de dentina terciaria y el concepto de puente dentinario, observar si se producen o no dichos puentes con ambos materiales.
- 5.- Y, finalmente, ver la posibilidades de uso de un extracto de *Caléndula Off. Linn.* como material de recubrimiento alternativo al *Hidróxido de Calcio* y otros materiales en el RPD.

### III. MATERIAL Y MÉTODO

#### III. 1. MATERIAL

Se seleccionaron 45 ratas de progenie conocida, *Norvegicus Albinus* machos, de 45 días de edad y 200 gs de peso, proporcionadas por el animalario de la Universidad do Vale de Itajaí (Univali) de Brasil.

Dichos animales de experimentación, se alimentaron con una dieta estándar a base de *Nuvilab* y agua “*Ad libitum*”.

El recubrimiento pulpar directo (RPD) se realizó en un total de 90 molares (dos por cada animal de experimentación) y de tal forma, que, en uno se empleó como material de recubrimiento *Hidróxido de Calcio Puro Pro-Análisis*, y en el contralateral, un *Extracto Hidro-Alcohólico de Flores de Caléndula Officinalis Linn. Europea (C. Off. L. E.) pH 4.9*.

Dada su accesibilidad y mayor facilidad por tamaño, para efectuar el presente trabajo de Tesis Doctoral, los molares elegidos para realizar los RPDs fueron los primeros molares del maxilar inferior. Molares, por otro lado, casi siempre seleccionados en este tipo de estudios experimentales con ratas.

En la anestesia de los especímenes se emplearon 80 mg / Kg de peso de Clorhidrato de Ketamina como sedante y 10mg / Kg de peso de Clorhidrato de Xilazina como relajante muscular.

Previo a la realización de las cavidades, las superficies de los molares a tratar se limpiaron con etanol al 70%.

Con la ayuda de un microscopio quirúrgico D.F Vasconcellos, la cavidad se realizó mediante fresa esférica de carbono de tungsteno, tipo KG Sorengen, de un cuarto ( $\frac{1}{4}$ ) de grosor, colocada en un micromotor Davi Atlantic a baja velocidad y con refrigeración; y este, a su vez, incorporado a un motor portátil Dentec.

Con objeto de exponer intencionadamente la pulpa dental, abrimos la cámara con la punta de una aguja de insulina desechable Injex 13 x 0,45 montada sobre jeringuilla de 1ml.

Los materiales empleados en el RPD fueron: como recubridor pulpar, *Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula Off. Linn. Europea* e *Hidróxido de Calcio Puro Pro-Análisis* según el caso; como base cavitaria Vitrebond®; Ácido ortofosfórico (Dentsply); Prime & Bond 2.1 de la casa Dentsply como adhesivo, y finalmente, composite Filtek Z-250 como material de obturación definitiva.

En los casos en los que el RPD se efectuó con extracto de *Caléndula*, entre este y el material utilizado como base cavitaria, se colocó un fragmento de membrana inerte, estéril, redonda, de 1mm de grosor, marca Acecil®; no solo para evitar la mezcla de ambos materiales y posibles alteraciones, sino para que la reconstrucción final pudiera realizarse siguiendo los pasos habituales y los resultados más fiables.

Tras reconstruir la cavidad con Filtek 250®, para evitar el desgaste del material obturador durante la masticación y frotamiento habitual de la rata, las cúspides de los dientes antagonistas se tallaron con turbina y fresa 3113 de diamante.

Las preparaciones histológicas, obtenidas con microtomo, se tiñeron con Hematoxilina-Eosina.

### **III. 2. MÉTODO**

Con objeto de obtener los debidos cortes molares; realizar las correspondientes preparaciones histológicas; y efectuar su posterior estudio con microscopia óptica, los animales se sacrificaron a los 10, 30 y 60 días posteriores al tratamiento. Se extrajeron sus mandíbulas; se descalcificaron, y se obtuvieron cinco cortes por cada pieza dentaria y material, es decir un total de 450 cortes histológicos.

Como hemos mencionado al principio, para realizar los RPDs, los animales de experimentación, fueron anestesiados, intramuscularmente, con 80mg / Kg de

peso de Clorhidrato de Ketamina y 10mg / Kg de peso de Xilazina en uno de sus muslos según la técnica de Teles, Wang y Stashenko de 1997. <sup>(212)</sup>

Una vez anestesiados, en campo estéril, cada animal fue colocado en una camilla de madera ideada y fabricada a tal efecto por nosotros; camilla, en la cual, habíamos colocado un dispositivo (un alambre) que mantenía la apertura bucal gracias a que sus incisivos superiores quedaban sujetos o enganchados en el.

Con objeto de facilitar y mantener la apertura bucal, también ideado por nosotros, se colocaron dos corchetes que, actuando como separadores de mejilla, permitían visualizar claramente los molares a tratar.

En el primer molar mandibular del lado izquierdo (tercer cuadrante), el RPD se realizó empleando como material de recubrimiento, un *Extracto Hidro-Alcohólico de Flores de Caléndula Officinalis Linn. Europea*, obtenido en el Laboratorio de Farmacognosia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Itajaí (UNIVALI), según metodología adaptada de la Pharmacopea Helvetica de 1989. <sup>(213)</sup> Y en el contralateral, *Hidróxido de Calcio Puro Pro-Análisis* también obtenido en el mismo laboratorio.

**III. 2. 1. OBTENCIÓN DEL EXTRACTO DE FLORES DE CALÉNDULA OFFICINALIS LINN.  
EUROPEA**

Para obtener dicho extracto, nosotros hemos empleado 400 gramos de flores secas de *Caléndula Officinalis Linn. Europea* marca Chisvert® adquirida en herboristería. Esta cantidad de flores, repartidas en dos bandejas, se introdujo en una estufa de ventilación (con circulación de aire) Brasimet profesional 50, donde se dejaron durante 60 minutos a 40° C con objeto de deshidratarlas totalmente, y así, eliminar cualquier presencia de agua .

Pasado ese tiempo, retirando las bandejas de la estufa, se volvieron a pesar las flores con objeto de obtener el peso seco del producto, el cual fue de 378,90 g. A continuación, se deshicieron las flores con las manos, y en las mismas bandejas, se mezclaron con alcohol de cereales (Synth®) al 60% y agua destilada en proporción 2:1 (dos partes de alcohol por una de agua). Esta mezcla se mantuvo durante 2 horas hasta que las flores se humedecieron y maceraron completamente.

En funiles o embudos de 100 ml., marca Vipilabor®, con algodón en el fondo como filtro, se introdujo la anterior preparación previamente desprovista del exceso de líquido, dejándola en reposo durante 2 horas; pasadas las cuales, volvimos a añadir, en la misma proporción, más alcohol y agua destilada. Los embudos fueron cubiertos con papel transparente para evitar cayeran impurezas en su interior. Este proceso de introducir, de esta forma, la caléndula en los funiles, recibe el nombre de empaquetamiento; un empaquetamiento que se mantuvo durante 12 horas más.

Pasado ese tiempo, permitiéndolo el paso del aire, se perforó con pequeños agujeros el plástico que cubría los funiles y se abrió el grifo de los mismos para que, lentamente, el extracto callera, en vaso Becker, a razón de una gota por minuto aproximadamente. Periódicamente se comprobaba que el goteo se mantuviera correctamente.

Al cabo de 2 días (48 horas), con objeto de macerar todavía más las flores y obtener un extracto más concentrado, se cerraron de nuevo los funiles tras añadir más solvente. Esta nueva maceración volvió a mantenerse durante otros 2 días más; pasados los cuales, se abrieron de nuevo los mencionados grifos durante 24 horas; pero esta vez, manteniendo un goteo mucho más rápido.

Al día siguiente, el extracto obtenido, fue depositado en 2 botes color caramelo para evitar el paso de la luz al producto, y con ello, cualquier posible alteración.

La parte del extracto destinada al estudio, se introdujo en un balón de cristal de fondo redondo, ajustado a un evaporador rotatorio (Fisatom®), modelo 803/803A, a 50°C durante 60 minutos. Esto se realizó con objeto de que el alcohol empleado para la obtención de dicho extracto, se evaporara totalmente y quedara, únicamente, el extracto de *Caléndula* con sus principios activos.

Finalmente, pasados esos 60 minutos, se introdujo el extracto en un frasco color caramelo que se guardó en frigorífico para su conservación.

Como el extracto obtenido resultaba algo líquido para ser empleado en el RPD, con objeto de hacerlo más denso y facilitar su aplicación, se volvió a repetir este proceso hasta obtener la consistencia de gel deseada. La cantidad de extracto aplicable, así obtenida, fue de 8,2801 grs. El Ph del extracto mostró ser 4,9; y para su determinación, se realizaron tres mediciones que siempre dieron el mismo valor.

### ***III. 2. 2. OBTENCIÓN DEL HIDRÓXIDO DE CALCIO PURO PRO-ANÁLISIS***

El *Hidróxido de Calcio Puro Pro-análisis*, se obtuvo en el mismo laboratorio mezclando y batiendo polvos de *Hidróxido de Calcio puro* con agua destilada.

Esta preparación, guardada también en un bote color caramelo, se dejó sedimentar durante 24 horas; a partir de las cuales, el producto se empleó tomándolo con una pequeña espátula del fondo del frasco.

### ***III. 2. 3. TÉCNICA DEL RPD EN EL ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN***

Colocados los animales de experimentación en los dispositivos ideados ya descrito, las superficies de los molares elegidos, aislados con algodones, se limpiaron con alcohol etílico al 70%.

Las cavidades Clase I (de 2 mms. aproximadamente) fueron realizadas mediante fresa de carbono de tungsteno redonda KG Sorengen de  $\frac{1}{4}$  de mm. de diámetro y  $\frac{1}{2}$  mm. de largo, a baja velocidad y refrigerada; y la exposición pulpar, con la punta de una aguja de insulina de  $\frac{3}{4}$  de mm. de diámetro hasta provocar sangrado.

Se lavó con agua destilada, se controló la hemorragia, y se secó con puntas de papel. En este último cometido, nunca se empleó la jeringuilla de aire comprimido.

Sobre la exposición pulpar del primer molar mandibular izquierdo (tercer cuadrante), con la punta de una aguja de insulina estéril desechable, como material de recubrimiento, se aplicó el *Extracto de Caléndula Officinalis Linn.* al cual se dejó actuar durante 5 min.

En el molar contralateral (primer molar mandibular del lado derecho) se aplicó el *Hidróxido de Calcio Puro Pro Análisis* con una sonda periodontal estéril del número 5. El exceso tanto de *Caléndula* como de *Hidróxido de Calcio*, fue absorbido mediante puntas de papel.

Entre el extracto de *Caléndula* y la base cavitaria, se colocó la membrana inerte que separaba este material del resto de materiales de restauración.

Con sonda periodontal estéril del número 5, se aplicó el Vitrebond®, el cual se polimerizó durante 40 segundos. Durante 30 segundos, se grabó el esmalte con ácido orto - fosfórico para, posteriormente, lavarlo durante otros 15-20 segundos con agua destilada. Como siempre, el secado se realizó con puntas de papel.

Siguiendo puntualmente los pasos de la técnica, aplicado el adhesivo, el mismo, se polimerizó durante 20 segundos.

En ambos casos (RPD con extracto de *Caléndula* y RPD con *Hidróxido de Calcio*) los molares fueron restaurados con Filtek 250®; el cual también se aplicó con una sonda periodontal del número 5. La polimerización se llevó a cabo durante 40 segundos por capas hasta comprobar que el material había fraguado totalmente.

Finalmente, las cúspides de los molares antagonistas de los animales se rebajaron con turbina y fresa 3113 de diamante, para evitar que las ratas al comer desgastasen las obturaciones realizadas.

A los 10, 30 y 60 días post-tratamiento, y según su grupo, los animales fueron sacrificados previo adormecimiento con éter; diseccionados e inmediatamente perfundidos transcárdiacamente con 2 µl de heparina; a continuación, perfundidos con solución salina para limpiar cualquier vestigio de sangre en vasos y órganos, se efectuó la remoción de sus maxilares inferiores. Estos fueron introducidos en paraformaldehído al 4% durante 24 hs; descalcificados en Etilen-Diamino-Tetra-Acético (E.D.T.A) e incluidos en parafina para su posterior estudio histológico.

De cada molar objeto de estudio, se obtuvieron cinco cortes seriados sagitales próximo-distales de 7µm de grosor que fueron teñidos con Hematoxilina - Eosina.

### **III. 2. 4. REALIZACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS**

El método seguido para preparar los cortes histológicos fue el siguiente:

1.- PROCESO DE FIJACIÓN: Tras heparinización y limpieza con solución salina, los animales fueron perfundidos, también transcárdiacamente, con para-formalaldehído al 4% en tampón fosfato pH 7,2 - 7,4. Una vez realizada esta perfusión, efectuamos la remoción de las regiones molares mandibulares para sumergirlas en la misma solución fijadora (para-formol al 4%) durante 24 horas a temperatura ambiente.

2.- LA DESCALCIFICACIÓN: Se realizó con EDTA (etilen-diamino tetra-ácetico) al 7% en tampón fosfato PH 7,2-7,4 durante 10-15 días.

3.- DESHIDRATACIÓN: Para retirar el agua acumulada en los procesos anteriormente citados, se efectuaron baños progresivos en alcohol de 70%, 90% y 100%, durante 24 horas y 8 horas en cada concentración.

4.- ACLARAMIENTO: Para ocupar los espacios dejados por la deshidratación, el aclaramiento se realizó mediante 3 baños de 30 minutos cada uno con XYLOL, un disolvente orgánico que, además, se disuelve con la parafina.

5.- LA IMPREGNACIÓN EN PARAFINA LÍQUIDA DE LAS REGIONES MOLARES EXTRAÍDAS, tuvo lugar en una estufa a 60° C y mediante 3 baños de 60 minutos cada uno. De esta manera el Xylol es disuelto por la parafina, y ésta ocupa su lugar.

6.- INCLUSIÓN EN MOLDES: Estas regiones molares impregnadas en parafina fueron incluidas, posteriormente, en unos moldes con parafina líquida, donde se dejaron enfriar durante 12 horas a temperatura ambiente.

7.- LOS CORTES HISTOLÓGICOS, de 7 micras, se realizaron con microtomo.

8.- LA COLORACIÓN para estudio histológico al microscopio se efectuó con hematoxilina - eosina.

### ***III. 2. 5. ANÁLISIS ANATOMO-PATOLÓGICO DE LOS CORTES HISTOLÓGICOS.***

El análisis anatómo-patológico de los cortes, se realizó mediante observación morfológica cualitativa de los efectos sobre la pulpa dental de los dos materiales empleados en el RPD; así como de la dentina terciaria o reparativa formada. Para ello, se empleó un microscopio de luz transmitida y siguiendo los pasos técnicos arriba mencionados.

### ***III. 2. 6. MÉTODO ESTADÍSTICO***

Este estudio experimental, longitudinal, prospectivo, comparativo y observacional, ha contado con una muestra de 45 ratas distribuidas en tres grupos de

15 ratas cada uno sacrificadas a los 10, 30 y 60 días posteriores al tratamiento respectivamente.

Los resultados obtenidos mediante observaciones al microscopio de las preparaciones o cortes realizados, fueron grabados en una base de datos con objeto de efectuar el correspondiente análisis estadístico; y en este análisis, se empleó la aplicación informática SPSS.

Se han realizado descriptivos de todas las variables a estudiar: Necrosis, Inflamación, Presencia de Dentina Terciaria, Presencia o no de Puentes Dentinarios y la existencia o no de Calcificaciones Difusas en las pulpas tratadas con uno y otro material de recubrimiento.

Teniendo en cuenta el carácter dicotómico de todas estas variables, para el contraste de hipótesis, considerando siempre el 95% de nivel de confianza, se han aplicado las siguientes pruebas:

Como las muestras histológicas están relacionadas pues proceden de una misma población experimental, se empleó el Test de McNemar para la comparación entre el extracto hidro-alcohólico de *Caléndula Off. Linn.* y el *Hidróxido de Calcio puro pro-análisis*; y tablas de contingencia para medir el efecto del extracto de *Caléndula* y el *Hidróxido de Calcio*, a lo largo del tiempo.

La bibliografía se buscó siguiendo los métodos habituales: archivos de revistas, libros, internet, Medline, Cochrane, Scopus etc.; y su expresión, sigue la normativa de la Convención de Vancouver.

## IV. RESULTADOS

Efectuados los Recubrimientos Pulpares Directos; y sacrificados los animales según periodos o grupos post-tratamiento, siguiendo los métodos y técnicas descritos en el apartado correspondiente, en todos y cada uno de los molares tratados, se realizaron cinco cortes sagitales próximo-distales (450 cortes en total) con objeto de observar, estudiar y comparar, histológicamente, los efectos del *Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula Off. Linn. Europea* y el *Hidróxido de Calcio Puro Pro-Análisis* en la pulpa dental subyacente, y sobre todo, la capacidad del *Extracto de Caléndula Offc. Linn.* para inducir la formación de dentina terciaria.

Todas las preparaciones en las que se observaron artefactos histológicos o no se abarcaba completamente la zona subyacente al RPD, fueron rechazadas; y en cuanto a la variable puente dentinario, se consideró su existencia cuando la cantidad de dentina terciaria neo-formada, llegaba a unir totalmente los dos extremos de la dentina limitante bajo la exposición pulpar. Una observación que, para ser aceptada, debía repetirse o mantenerse en cortes sucesivos.

Analizados, pues, dichos cortes, como resultados definitivos, elegimos las preparaciones y observaciones microscópicas de los tres cortes de cada molar (270 cortes) que no ofrecían dudas en cuanto a interpretación histológica. Observaciones que, con su correspondiente estudio estadístico, hemos expresado, posteriormente, de forma descriptiva y comparativa, para cada material de recubrimiento y grupo.

Con objeto de ser lo más claros posibles, hemos decidido exponer dichos resultados en cuatro apartados: 1.- Descripción por separado del comportamiento de la pulpa frente a cada material tras el tratamiento; 2.- Descripción del comportamiento de cada material según días de sacrificio; 3.- Descripción comparativa de la reacción pulpar según las distintas variables elegidas; y 4.- Análisis global de las reacciones pulpares inducidas por ambos materiales en el total de la muestra.

#### **IV. 1. DESCRIPCIÓN DEL COMPORTAMIENTO DE LA PULPA DENTAL FRENTE AL EXTRACTO DE CALENDULA E HIDRÓXIDO DE CALCIO (EFECTOS SOBRE LA PULPA DE AMBOS MATERIALES)**

##### ***A.- Resultados obtenidos en los especímenes sacrificados a los 10 días***

###### ***Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula***

En este grupo, las preparaciones pulpares histológicas mostraron que, en el 80% de las pulpas subyacentes al *Extracto de Caléndula* (12 molares/36 preparaciones), existían focos de necrosis. En el 100% (15 molares/45 preparaciones) inflamación parcial; y en el 13,3% (2 molares/6 preparaciones) formación de dentina terciaria. En ninguna de las preparaciones de este grupo se observaron calcificaciones difusas o puentes dentinarios.

### ***Hidróxido de Calcio***

En los cortes de los casos tratados con *Hidróxido de Calcio*, tanto la necrosis como la inflamación, pudo observarse en el 100% de las pulpas subyacentes al material (15 molares/45 preparaciones); y la presencia de dentina de terciaria, en el 66,7 % (10 molares/30 preparaciones. Tampoco en estos casos se encontraron calcificaciones difusas o puentes dentinarios

### ***B.- Resultados obtenidos en los especímenes sacrificados a los 30 días***

#### ***Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula***

Respecto a la necrosis y la inflamación observada en el grupo sacrificado a los 30 días post-tratamiento con *Caléndula*, hemos de decir que los diferentes cortes histológicos mostraron que en el 100% de los molares existía necrosis en la pulpa subyacente a este material de recubrimiento (15 molares/45 preparaciones); e inflamación parcial solo en el 26,7% de los mismos (4 molares/12 preparaciones).

La dentina terciaria en estos casos, estuvo presente en el 80% de las preparaciones molares (12 molares/36 preparaciones).

En este periodo, se observaron calcificaciones difusas subyacentes al material en el 66,7% (10 molares /30 preparaciones histológicas). Tampoco pudo constatar

en ninguno de los cortes de este periodo y grupo, la existencia de puentes dentinarios.

### ***Hidróxido de Calcio***

En cuanto a los cortes de especímenes tratados con Hidróxido de calcio y sacrificados a los 30 días, los resultados mostraron necrosis pulpar en el 80% de los casos (12 molares/36 preparaciones); e inflamación parcial en el 93,3% (14 molares /42 preparaciones). En este grupo del hidróxido de calcio, la dentina terciaria estuvo presente en el 60% de las preparaciones molares (9 molares/27 preparaciones); y las calcificaciones difusas, en el 86,7% (13 molares/39 preparaciones). Aquí, tampoco se observaron puentes dentinarios en las pulpas subyacentes al material empleado.

### ***C.- Resultados obtenidos en los especímenes sacrificados a los 60 días***

#### ***Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula***

En los cortes molares de los animales tratados con *Extracto* de *Caléndula* y sacrificados a los 60 días post-tratamiento, la necrosis pulpar subyacente al material, estuvo presente en el 100% de los casos (15 molares/45 preparaciones); y la inflamación parcial, en el 13,3% (2 molares/6 preparaciones). Inflamación que, como hemos podido observar, fue disminuyendo progresivamente entre los 10 y 60 días posteriores a la realización del RPD con este material de forma bastante llamativa.

La presencia de dentina terciaria en la pulpa de los molares tratados con *Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula*, se situó en el 73,3% de los casos (11 molares/33 preparaciones). En ningún caso la dentina llegó a formar puente dentinario. Respecto a la presencia de calcificaciones difusas en la pulpa subyacente al material, estas estuvieron presentes en el 100% de las preparaciones de este grupo (15 molares/45 preparaciones).

### ***Hidróxido de Calcio***

En este grupo, en el 100% de las pulpas de los molares tratados con hidróxido de calcio, se observaron focos de necrosis (15 molares/45 preparaciones); y en el 86,7% marcada inflamación parcial de la pulpa (13 molares/39 preparaciones).

La dentina terciaria en las pulpas recubiertas con *Hidróxido de Calcio*, estuvo presente en el 93,3% de las ratas sacrificadas a los 60 días post-tratamiento (14 molares/42 preparaciones); y las calcificaciones difusas, en el 100% (15 molares / 45 preparaciones).

---

## IV. 2. MATERIALES, ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y VARIABLES SEGÚN DÍAS DE SACRIFICIO

Tras el sacrificio, los resultados obtenidos en los casos tratados con *Extracto de Caléndula* mostraron que la frecuencia con la que las distintas variables aparecían en la pulpa subyacente a dicho material, era muy significativa comparando los distintos periodos post-tratamiento. Significativa, solo en cuanto a la necrosis, la inflamación parcial, la formación de dentina terciaria y las calcificaciones difusas, ya que en cuanto a inflamación pulpar total o presencia de puentes dentinarios, en ninguno de estos periodos, se observaron preparaciones histológicas que sugirieran la presencia de estas variables.

Así, pues, en la tabla III puede observarse que la frecuencia con la que la necrosis se encontró en los animales de experimentación, fue aumentando a partir de los 10 días post-tratamiento hasta alcanzar el 100 % del grupo ( $p = 0,0402$ ); mientras que la inflamación parcial, disminuía de manera llamativa hasta solo encontrarse en el 13,3% de los animales sacrificados a los 60 días ( $p = 0,0000$ ).

Respecto a la neo-formación dentinaria, diremos que también pudimos observar que el número de animales con presencia de dentina terciaria en la pulpa subyacente a este material (*Caléndula*), aumentaba progresivamente conforme pasaba el tiempo, y así, desde una inicial frecuencia del 13,3% a los 10 días post-tratamiento, se pasaba a un 80 y 73,3% a los 30 y 60 días posteriores al sacrificio; una frecuencia, entre periodos, altamente significativa ( $p = 0,0003$ ).

En cuanto a la presencia de calcificaciones difusas también la diferencia entre los tres periodos post-tratamiento fue muy significativa ya que si bien a los 10 días no encontramos preparaciones con estos hallazgos, a los 30 y 60 las mismas fueron observadas en el 66,7 y en el 100% de los casos respectivamente ( $p = 0,0000$ ).

Cuando se compararon entre si los periodos post-tratamiento de los molares tratados con *Hidróxido de Calcio* la frecuencia con la que las distintas variables aparecieron en las pulpas de los molares tratados con el, como muestra la tabla IV, fue estadísticamente significativa para la presencia de necrosis ( $p = 0,0402$ ); y muy significativa ( $p = 0,0000$ ) para la presencia de calcificaciones difusas.

La capacidad para inducir dentina terciaria, se mantuvo en el mismo nivel en los tres periodos; e igualmente la inflamación parcial ( $p = 0,3425$  y  $0,0920$  respectivamente). No pudieron compararse la presencia de puentes dentinarios o de inflamación total de la pulpa, porque no se dio ningún casos entre molares tratados y periodos post-tratamiento.

#### **IV. 3. COMPARACIÓN / COMPORTAMIENTO PULPAR POR VARIABLES**

##### *La Necrosis*

Cuando comparamos los efectos de ambos materiales sobre la pulpa dental de 45 ratas *Norvegicus Albinus* (90 molares) tratadas con RPD, dicha comparación vino a señalar que el comportamiento de la *Caléndula Officinalis* y el *Hidróxido de Calcio*

respecto a la presencia o no de necrosis pulpar en los puntos de contacto del material con la pulpa dental, era del todo similar para ambos materiales; ya que, a los 10 días post-tratamiento, si con el *Hidróxido de Calcio* como material de recubrimiento los focos de necrosis estaban presentes en el 100% de las preparaciones, aunque en menor grado (80%), dichos focos de necrosis, también se daban en las pulpas de los molares tratados con *Extracto de caléndula*; una diferencia que no fue estadísticamente significativa ( $p = 0.2500$ ).

A los 30 días post-tratamiento, sin que tampoco fuera estadísticamente significativo, estos porcentajes sobre la presencia de necrosis pulpar con uno u otro material se invirtieron, para ser del 100% en los caso tratados con *Caléndula* y 80% en los tratados con *Hidróxido de Calcio*.

A los 60 días post-tratamiento, tanto en los tratados con *Caléndula* como en los tratados con *Hidróxido de Calcio*, la necrosis estuvo presente en el 100% de las pulpas subyacente al material de recubrimiento.

### *La Inflamación*

Respecto a la inflamación parcial de la pulpa, tanto en los casos tratados con *Extracto de Caléndula* como en los casos tratados con *Hidróxido de Calcio*, la misma estuvo presente en el 100% de las preparaciones de los molares de las ratas sacrificadas a los 10 días; no existiendo ningún caso, con ninguno de los materiales empleados, en los que la inflamación pulpar fuera total.

A los 30 días post-tratamiento, el número de preparaciones con inflamación parcial disminuyó drásticamente en los molares tratados con *Caléndula* (26,7%), y se mantuvo prácticamente igual en los tratados con *Hidróxido de Calcio* (93,3%). Esta diferencia entre ambos materiales, desde el punto de vista estadístico si fue muy significativa ( $p = 0,0020$ ).

A los 60 días, el número de preparaciones con inflamación parcial, disminuyó aún más en la pulpa de los molares tratados con *Caléndula*, mientras que se mantenía prácticamente igual (86,7%) en la pulpa de los molares tratados con el *Hidróxido de Calcio*. También en este caso, a favor de la *Caléndula*, la diferencia fue estadísticamente significativa ( $p = 0,0034$ ) en el sentido, de que la *Caléndula* provoca mucho menos inflamación que el *Hidróxido de Calcio*.

### *Formación de dentina terciaria*

Si comparamos ambos materiales respecto a su capacidad para inducir la formación de dentina terciaria, hemos de señalar que la dentina terciaria aparece, a los 10 días post-tratamiento, en un mayor número de preparaciones pulpares de molares tratados con *Hidróxido de Calcio* que en los casos en los que el recubrimiento pulpar se realizó con *Extracto de Caléndula*, ya que la misma aparece en un 66,7% de las preparaciones de molares tratados con *Hidróxido de Calcio*; y solo, en un 13,3% de las preparaciones de molares tratados con *Caléndula*, siendo, en este grupo, la diferencia, entre ambos materiales, estadísticamente significativa a

---

favor del *Hidróxido de Calcio* ( $p = 0.0078$ ). Es decir, parece que la inducción de dentina terciaria con el material control es más rápida que con el material experimental.

A los 30 días post-tratamiento, sin que la diferencia fuera estadísticamente significativa ( $p = 0.4531$ ), pudo comprobarse, sin embargo, que, si bien la presencia de dentina terciaria se mantenía sobre el 60% de los molares tratados con *Hidróxido de Calcio*, en los molares tratados con *Caléndula Officinalis*, la misma aumentaba hasta el 80% de los casos ( $p = 0,4531$ ).

En los molares de los animales de experimentación sacrificados a los 60 días, las observaciones al microscopio señalaron que la dentina terciaria aparecía en el 73,3% de los casos tratados con *Caléndula* y en el 93,3% de los casos tratados con *Hidróxido de Calcio*, una diferencia que tampoco fue estadísticamente significativa ( $p = 0,2500$ ).

### *Presencia o no de Puente dentinario*

Aunque para la mayoría de los autores el mismo parece ser sinónimo de “*cualquier cantidad de dentina terciaria que se forme*”, según concepto por nosotros expresado en la introducción, en ninguna de las preparaciones histológicas observadas, fuera de molares tratados con *Extracto de Caléndula* o *Hidróxido de calcio*, en ninguno de los periodos estudiados (10, 30 ó 60 días post-tratamiento), la dentina neo-formada llegó a formar una verdadera barrera continua en la pulpa situada entre los límites de la dentina normal subyacente al RPD, por lo que no

hemos considerado que dichos focos de dentina terciaria llegaran a constituir verdaderos puentes dentinarios; y eso, pese a que tuvimos la precaución de realizar, repetir y analizar cortes más profundos en aquellos casos en los que pudimos sospechar su presencia por ser la dentina terciaria neoformada muy extensa dentro de la pulpa objeto del estudio.

### *Calcificaciones difusas*

Cuando analizamos la posible presencia de calcificaciones difusa en las pulpas de los molares tratados con Caléndula o Hidróxido de Calcio, las observaciones histológicas señalaron que, a los 10 días post-tratamiento, ningún caso, fuera el material que fuera, presentaba calcificaciones difusas (lineales o en agujas) en las pulpas subyacentes al material. Calcificaciones que si aparecieron a los 30 días en el 66,7% de las preparaciones pulpares de los molares tratados con Extracto de Caléndula y en el 86,7% de las preparaciones de los molares tratados con Hidróxido de Calcio ( $p = 0,3750$ ). A los 60 días, la presencia de calcificaciones difusas fue del 100% en ambos casos, observándose por lo tanto, un progresivo aumento de las mismas, conforme se dilataba el momento del sacrificio de los animales de experimentación. La presencia de calcificaciones difusas en las pulpas de los molares tratados con uno u otro material no fue, comparativamente, estadísticamente significativa.

---

#### IV. 4. ANÁLISIS GLOBAL DEL RPD CON EXTRACTO DE CALÉNDULA E HIDRÓXIDO DE CALCIO EN MOLARES DE RATAS NORVÉGICUS ALBINUS

Así, pues, expresados los resultados de manera descriptiva y según las diferentes variables estudiadas en el presente trabajo de Tesis Doctoral, globalmente, podemos decir, con nivel de confianza del 95%, que en el 93,3% (42 ratas / 84 molares) del total de la muestra, existía en la pulpa subyacente al material de recubrimiento focos de necrosis. Y esto, tanto en los casos tratados con *Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula*, como en los casos en los que el material de recubrimiento fue el *Hidróxido de Calcio Puro pro-análisis*.

La Inflamación parcial, estuvo presente en el 46,7% (21 rata /42 molares) de las pulpas en las que se empleó como recubrimiento pulpar el *Extracto de Caléndula*; y en el 93,7% (42 ratas/84 molares) en las que el recubrimiento pulpar directo se había efectuado con *Hidróxido de Calcio*.

La dentina terciaria apareció en el 55,6% de los animales de experimentación (25 ratas / 50 molares) en las que se empleó el *Extracto de Caléndula*; y en el 73,3% (33 ratas/66 molares) en las que el material de recubrimiento fue el *Hidróxido de Calcio*.

En ninguno de los casos pudo observarse la existencia de puentes dentinarios, y ello, pese a que, a diferencia de muchas publicaciones (en las que solo se refleja la

realización de un corte para estudio) nosotros habíamos efectuado hasta cinco cortes seriados en cada pieza dentaria. Las preparaciones en las que hubo dudas sobre su existencia o no porque la dentina neoformada era mucho más extensa, fueron de nuevo detenidamente analizadas, con lo que, pudo comprobarse que la dentina neoformada, no llegaba a unir totalmente los dos extremos de la dentina limitante subyacente a la preparación; por lo que interpretamos solo formación de dentina terciaria.

Las calcificaciones difusas estuvieron presentes en el 55,6% (25 ratas/50 molares) de los casos tratados con *Caléndula*; y en el 62,2% (28 ratas/56 molares) de los casos tratados con *Hidróxido de calcio Puro Pro-análisis*.

Datos a señalar es que la inflamación provocada por ambos materiales, fue siempre parcial y en el punto de contacto material empleado-pulpa; que en los casos tratados con *Hidróxido de Calcio*, dicha reacción inflamatoria fue más intensa que la observada en los casos tratados con *Extracto de Caléndula*; y que la necrosis fue de más rápida aparición y más intensa en las pulpas de los molares tratados con *Hidróxido de Calcio* que en los tratados con *Caléndula Ofic.*.

Respecto a esta necrosis diremos que en ninguno de los casos, fueran molares tratados con uno u otro material de recubrimiento, la misma, fue total.

## V. DISCUSIÓN

Antes que nada debemos señalar que la inexistencia de trabajos, histológicos o no histológicos, sobre recubrimientos pulpares directos (RPDs) con extractos de *Caléndula Officinalis Linn.* en animales de experimentación o humanos, imposibilitan la comparación de nuestros resultados con otros resultados de la misma índole. Por ello, en este apartado, aparte describir la inducción de dentina terciaria y otros efectos sobre la pulpa, solo nos es posible analizar las variables elegidas para nuestro estudio, compararlas con las variables y/o efectos producidos al aplicar el material control o comparar los resultados obtenidos, con los de otros trabajos que, de alguna manera, han investigado posibles efectos de esta u otras plantas sobre la pulpa.

Este trabajo es, pues, un estudio de investigación básica que, tras intensa búsqueda, en principio, creemos totalmente original, ya que, por primera vez (que sepamos) se emplea y analiza, en el RPD, un extracto de caléndula como material de recubrimiento.

Como es preceptivo, este estudio, contó con la aceptación del Comité de Ética de la Universidad do Vale do Itajaí (Univali) de Brasil. Universidad, en la que, en virtud del Convenio Univali-Universidad Hispalense, realizamos el presente trabajo de Tesis Doctoral.

Ya dijimos en el apartado material y método, que la presente Tesis, constituía un estudio experimental, prospectivo, longitudinal, comparativo observacional, caso control, realizado en ratas *Norvegicus Albinus*, sobre las que habíamos efectuado una serie de recubrimientos pulpares directos (RPDs), utilizando como material de recubrimiento pulpar, un *Extracto Hidroalcohólico (2:1) de flores de Caléndula Officinalis Linn. Europea* pH 4.9.

Estudio de investigación en el que hemos empleado 45 animales. Realizado un total de 90 RPDs. Obtuvimos según Farmacopea Helvética, <sup>(213)</sup> el mencionado *Extracto de Caléndula*; sacrificamos por grupos post-tratamiento los animales de experimentación; extrajimos sus mandíbulas y efectuamos, en cada molar tratado, hasta cinco cortes histológicos para estudio y observación microscópica.

En los molares contralaterales, empleamos el *Hidróxido de Calcio Puro Pro-análisis*. Un material de propiedades conocidas; alta alcalinidad (pH 11); de elección para la mayoría de los autores, y por lo tanto, ampliamente utilizado en Odontología; razón por la que, en este trabajo, como ya hemos mencionado, se ha empleado como material control.

La técnica de RPD que efectuamos, siguió las normas o pasos habituales que describen los autores; y la aplicación de los materiales, como indican los diferentes investigadores para cualquier material de recubrimiento pulpar.

Un detalle a señalar en cuanto a esto último, es que, entre el extracto de *Caléndula Off.* y la base cavitaria, colocamos una pequeña porción de membrana inerte, con objeto de evitar la mezcla del extracto (en estado de gel) con la base cavitaria (Vitrebond®); un hecho con el que evitábamos introducir posibles alteraciones y sesgos en los resultados.

Respecto a los animales incluidos en el presente trabajo, diremos, que se tuvo especial cuidado en que todos fueran del mismo sexo (machos en nuestro caso), fueran de la misma edad y estuvieran completamente sanos; siendo rechazados todos los que no cumplían estos requisitos.

Decidimos realizar el estudio en los primeros molares inferiores de ratas de 45 día de edad, porque, con esta edad, los molares de las ratas, además de ser embriológica y anatómicamente muy parecidos a los molares humanos permanentes jóvenes, son los de mayor tamaño y los más fácilmente accesibles en este tipo de animal; lo que ayudaba a la mejor apertura cavitaria y exposición pulpar.

Se consideró como éxito en el trabajo, y por lo tanto de la técnica, el que apareciera dentina terciaria o reparativa en la pulpa subyacente a la aplicación del extracto hidro-alcohólico de *Caléndula Officinalis Linn. Europea.*

En cuanto a tratamientos pulpares se refiere, no es de extrañar, que, siendo, todavía, las reacciones de este tejido una gran desconocida, los mismos, dentro de las

técnicas odontológicas, sean los más sometidos a controversia, estudio e investigación; y en este sentido, el RPD no podía ser menos.

Y no podía serlo, porque, aunque sobre el mismo parezca existir cierto consenso general, lo cierto es que el RPD sigue siendo un campo abierto tanto a la discusión como al estudio y la investigación. Y así, si para unos, el mismo, solo estaría indicado en las exposiciones pulpares traumáticas y/o yatrogénicas de pequeño tamaño; con pulpas bien irrigadas, sangrado ligero, controlable, en las que no existe evidencia de infiltración bacteriana,<sup>(28, 49, 30, 214)</sup> para otros, esta técnica, no puede excluirse, totalmente, en los casos en los que las exposiciones tuvieron lugar por otras causas; incluidas aquellas en la que dicha exposición pudo ser debida a la presencia de caries.<sup>(41, 215, 216)</sup>

En cuanto a nuestros objetivos, debemos insistir en que lo que fundamentalmente queríamos ver, dentro de esas renovadas investigaciones o tendencias a estudiar nuevos materiales o principios activos extraídos de flores y plantas, era, si un producto natural como el extracto de *Caléndula Off. Linn.*, podría inducir la formación de dentina terciaria y por lo tanto (tras mayores y más precisos estudios) ser empleado como un material más dentro del RPD.

Y solo ello, porque, trabajos de otra naturaleza como la determinación del tipo de necrosis, su mecanismo de producción o la cantidad y calidad de la dentina inducida, requerirían estudios histoquímicos más complejos que no eran motivo de la presente Tesis Doctoral.

### V. 1. EL POR QUÉ DE UN ESTUDIO CON ESTA PLANTA EN ESTA TÉCNICA

Ya hemos dicho que nosotros no hemos podido encontrar en la literatura trabajos que realizaran estudios experimentales con *Caléndula Officinalis Linn.* en esta técnica; y menos que, en esta técnica, compararan los efectos de la misma con los del *Hidróxido de Calcio* u otros materiales sobre la pulpa dental. No obstante, pese a esa escasez bibliográfica, existen trabajos que, incluso, dentro de la Odontología, estudian las posibles aplicaciones y efectos de esta u otras plantas, con propiedades curativas sancionadas por la tradición, la Medicina o la Fitoterapia.

Trabajos como los de Lahoud , Gutierrez, Romero y Ortiz, <sup>(166)</sup> que comparan y analizan, histológicamente, los efectos antiinflamatorios y cicatrizantes de la *Uncaria Tormentosa* (Uña de Gato) y el *Hidróxido de Calcio* (Dycal) en dientes permanente jóvenes de niños situados entre los 12 y 13 años de edad. Un trabajo en el que concluyen que la *Uncaria Tormentosa*, en el RPD, con menos inflamación, favorece, mejor que el Dycal, la cicatrización; unas propiedades que los autores atribuyen al aumento de la acción fagocitogénica de los alcaloides (pteropodina, isoteropodina, mitracina e isomitrafalina), y al B-sitosterol (potente antiinflamatorio) que posee dicha planta.

Como los de Sabir, Tabbu, Agustiono y Sosroseno (2005) <sup>(171)</sup> que estudian, también histológicamente, el efecto del *Propóleo* sobre la pulpa de ratas Sprague Dawley en el RPD. Un estudio donde señalan que, merced a los flavonoides, los

RPDs realizados con este material, estimulan la formación de dentina terciaria y provocan menos inflamación.

Que, en la actualidad, estudian y analizan la composición en principios activos con propiedades farmacológicas de muchas flores y plantas, especialmente, de la *Caléndula Offic. Linn.* Pietta, Bruno, Mauri y Rava (1992); Lastra y Piquet (1999); Bako, Deli y Toth (2002); Águila, Menéndez, González y cols. (2005); Kishimoto, Maoka, Sumitomo y Ohmiya (2005); Bashir, Janbaz y cols. (2006).<sup>(176, 174,175,173, 179, 196)</sup>

Como los Louis, Touyz y Amsel (2003) que comprueban el efecto anticariogénico de la *Camellia Sinensis (Te Negro)*; o los de Krazhan y Garazha (2001); que estudian los efectos beneficiosos y curativos de un preparado de *Caléndula* sobre la gingivitis crónica catarral; o los de Gasiorowska, Jachimowicz, Patalas y Mlynarczyk (1983) que demuestran la eficacia de los extractos de esta planta en las periodontopatías.<sup>(217, 190, 191)</sup>

Estudios como los de Balducci-Roslindo, Silverio y Malagoli, que compararon en ratones (*Mus Músculus*), la capacidad reparadora, cicatrizante y antiséptica sobre las heridas post-extracción dentaria de la *Caléndula Officinalis* y la *Symphytum Officinalis*; un hecho que atribuyen, en el caso de la *Caléndula*, a sus aceites esenciales y otros principios activos; o los de Sánchez , Ibarra , Inda, Ruiz y Tiznado que comprobaron, en conejos, la neoformación de hueso trabecular alveolar. Un trabajo en el que se concluye que el extracto hidroalcohólico de *Caléndula*

*Officinalis* acelera la neoformación de hueso trabecular alveolar post-extracción dentaria. <sup>(178, 205)</sup>

Trabajos que observan la actividad anti-bacteriana de los extractos de flores de *Caléndula* y otras plantas (*Arnica Montana*, *Illicium Veri* o *Melissa Officinalis* etc.) sobre las bacterias periodontopáticas y anaerobias facultativas; unos trabajos en los que se concluyen que, también, los extractos de *Caléndula* actúan contra estos microorganismos; o que señalan la eficacia que sus aceites tienen para reparar las heridas tras una cesárea (Iauk, Lo Bue, Milazzo, Rapisarda y Blandino, 2003); (Lavagna, Secci, Chimenti y cols. (2001). <sup>(202, 193)</sup>

Que investigan la capacidad antiinflamatoria de los extractos hidroalcohólicos de *Caléndula Officinalis*, *Hypéricum Perforatum* o *Glycyrrhiza Glabra* (entre otras) para concluir que, estos extractos, inhiben la actividad de las enzimas 5-lipoxigenasa (5LO) y Cycloxigenasa- 2 (COX2) que son enzimas claves para la formación de sustancias pre-inflamatorias. <sup>(170)</sup>

Como los realizados en el 2006 por Jiménez-Medina, García-Lora , Paco, Algarra y cols. <sup>(198)</sup> que dicen que los extractos de *Caléndula Officinalis* activados con láser, tienen actividad antiinflamatoria, antiviral, anti-tumoral e inmunomoduladoras; o los de Kalvatchev, Walder y Garzaro <sup>(192)</sup> que señalan que, además de esa capacidad antitumoral, la *Caléndula* posee actividad anti VIH; una actividad que atribuyen a que los extractos hidroalcohólicos de esta planta, en virtud de sus

pigmentos y antioxidantes fitoquímicos, de manera parecida a como lo hace el AZT, inhiben la enzima transcriptasa inversa vital para que el virus pueda reduplicarse.

Estudios que señalan, que los extractos de *Caléndula* tienen un efecto quimioprotector en ratas a las que se ha provocado, experimentalmente, un tumor hepático (Barajas-Farias, Pérez Carreón, Arce-Popoca y cols. 2006)<sup>(208)</sup> o que dicen que tienen, incluso, un efecto dual en conejos: es decir, que son espamolíticos y espasmogénicos a la vez según las circunstancias (Bashir, Janbaz, Jabeen y Gilani , 2006).<sup>(196)</sup>

Investigaciones que han llevado a que hoy, en Medicina (incluso pública), se estén obteniendo, estudiando y aplicando, dentro de distintas especialidades, extractos nuevos o renovados; extractos como los de *Thymus Vulgaris* y *Drosera Rotundifolia* para la tos (comercialmente Pilka) ; los de *Glycine Max. Lnn.* en el insomnio, los sofocos y la irritabilidad que provoca la menopausia (el Fitoladius o el Flavia que recomiendan los ginecólogos); el conocido extracto de *Ginco Biloba Linn.* (Tanakene) empleado para favorecer la vasodilatación y aumento de la circulación cerebral; los de semillas de *papaya* (Papacaries) en la caries dental; los de raíz de *Harpagophytum Procuraben Linn.* en los dolores de origen reumático y el vértigo; y desde hace unos meses, con el nombre comercial de Cysticlean, los de *Vaccinium Macrocarpon* (arándano rojo) como preventivo de las infecciones urinarias. Trabajos todos, en definitiva, que vienen a demostrar el ya mencionado renovado interés que existe hoy por encontrar nuevos materiales o principios activos susceptibles de ser aplicados tanto en Farmacología, como en Medicina, Cirugía y Odontología.

V. 2. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL PRESENTE ESTUDIO

*Formación de Dentina Terciaria*

Respecto a la formación de dentina terciaria, en el presente trabajo, los cortes histológicos realizados, observados y analizados por nosotros al microscopio óptico, han mostrado que la capacidad para inducir dentina terciaria del *Extracto Hidroalcohólico de Flores de Caléndula Off. Linn. Europea*, es similar a la que posee el *Hidróxido de Calcio Puro Pro-análisis* en los RPDs efectuados en nuestro modelo de experimentación. Es decir los *Extractos de Caléndula Off. Linn.* inducen la formación de dentina terciaria

Formación que, además, siendo probablemente debida a los principios activos de la planta (flavonoides, triterpenos, carotenoides, saponinas, aceites esenciales, calendina, taninos, polisacáridos, sales de manganeso, ac. acetil salicílico, oxalato de calcio y largo etc.) no puede ser atribuida, en este trabajo, al mero azar u otros factores.

Y esto, porque, ya a los 10 días post-tratamiento, tanto en los recubrimientos pulpaes realizados con *Extracto de Caléndula*, como en los realizados con *Hidróxido de Calcio*, era posible observar una clara formación de dentina reparativa en toda una serie de preparaciones histológicas. Capacidad, que, por otro lado, con

alguna pequeña diferencia nada significativa, se ha puesto de manifiesto para ambos materiales en todos los periodos estudiados.

No obstante, según periodos, hemos de decir que, a los 10 días post-tratamiento, del comparando el número de preparaciones con dentina terciaria encontradas en los especímenes tratados con ambos materiales, el número de preparaciones con dentina de reparación, fue menor en los casos tratados con *Caléndula* (13,3% de las preparaciones) que en los tratados con *Hidroxido de Calcio*, (66,7% de la preparaciones) ( $p = 0.0078$ ).

A partir de aquí, sin que sea estadísticamente significativo como ya hemos dicho al principio, la capacidad para inducir dentina terciaria de ambos materiales de recubrimiento, fué del todo similar si nos atenemos a la frecuencia o número de preparaciones histológicas que mostraban su presencia.

El que esto sea así, nos parece lógico, puesto que lo primero que tenemos que tener en cuenta, es que estamos comparando un material natural pH ácido 4,9 (posiblemente de acción más lenta), con otro muy experimentado, cuya alcalinidad se ha considerado como la reponsable inicial de su capacidad para formar dentina. Una capacidad que, habitualmente, se atribuye, a que dicha alcalinidad estimula la enzima fosfatasa alcalina, relacionada con los procesos de mineralización. Es más, quienes dicen que la presencia de restos de hidróxido de calcio en la pulpa, actua como un irritante añadido que inhibe la motilidad de los macrófagos, disminuye los mecanismos de la inflamación y favorecen la neoformación de dentina por este

material. Un prueba más de los desconocimientos y controversias que el hidróxido de calcio, pese a ser el material de elección, suscita en el RPD. <sup>(64, 218)</sup>

Sea como fuere, lo cierto y verdad es que el *Extracto de Caléndula* por nosotros empleado, induce la formación de dentina terciaria; y, posiblemente, en virtud de sus principios activos; principios que como sus aceites esenciales, sus flavonoides, saponinas, triterpenos y taninos, tienen acciones demostradas, efectivas y directas sobre la cicatrización, la asepsia o la formación de hueso.

Pensando en la incidencia de los llamados defectos túneles (dentina no compacta o irregularidades de la dentina), autores como Cox y cols.; <sup>(64, 219)</sup> Kopel; <sup>(220)</sup> Schöder; <sup>(59)</sup> o Murray y García-Godoy, (2006) <sup>(221)</sup> señalan que, en realidad, la neoformación dentinaria o respuesta pulpar a la agresión, sería igual fuera cual fuere el material recubridor; por lo que, para ellos, lo verdaderamente importante para que un recubrimiento pulpar tenga éxito es que el material recubridor impida la penetración bacteriana.

Según esto, debemos pensar que la formación de una barrera dentinaria de reparación sería un indicador del éxito del tratamiento, siempre y cuando, la misma, hubiera evitado la contaminación pulpar; aunque otros autores, cuestionando esta idea, señalen que la formación de dentina terciaria es un hecho que va generalmente asociado a la presencia de inflamación crónica, microabscesos y necrosis del tejido pulpar subyacente.

En este sentido, debemos decir que, mientras que la capacidad del *Hidróxido de Calcio* como bactericida y bacteriostático, es atribuida a su alcalinidad, incompatible con la vida microorgánica, en el caso de la *Caléndula Off.*, la actividad antibacteriana se atribuye a las propiedades farmacológicas de sus principios activos: aceites esenciales de actividad antiséptica, polisacáridos de alto peso molecular de actividad inmunoestimulante, o los carotenoides y flavonoides que favorecen la destrucción de las bacterias via macrófagos. Aspecto diferencial que consideramos importante, porque ello, marcaría la posible utilización de la *Caléndula*, como un medicamento más, ya que, como fitoterápico, en Medicina Homeopática, en forma de colutorios, pastas dentrifica o infusiones, la misma se utiliza en casos de estomatitis, gingivitis, sangrados bucales y periodontopatías.<sup>(178, 203)</sup>

Ya hemos mencionado que en el año 2005 Sabir y cols.<sup>(171)</sup> utilizando un extracto hidro-alcohólico de *Propóleo* como material de recubrimiento pulpar, en RPDs realizados en ratas Sprague Dawley, llegaron a la conclusión de que la capacidad para formar dentina terciaria y sus efectos antiinflamatorios eran debidos a la acción de los flavonoides que contenía el extracto. Si esto es así, lo lógico es pensar que, como el extracto de *Caléndula* los posee en gran cantidad, su capacidad para inducir dentina terciaria también estará relacionada con la presencia de los mismos en su composición.

Es más, según varios trabajos farmacológicos, botánicos y bioquímicos, el extracto hidroalcohólico de flores de *Calendula*, no solo es muy rico en flavonoides, carotenoides y triterpenos entre otros principios activos, sino que, además, contiene

minerales que como el oxalatos de calcio, el magnesio o el fósforo, también podrían estar implicados en la formación de la dentina terciaria observada en los molares tratados con esta planta.<sup>(173,198)</sup>

En definitiva, sea en virtud de este o aquel principio activo, de aquel u otro estímulo, lo realmente importante en el presente trabajo de Tesis Doctoral, es que, según observaciones histológicas por nosotros realizadas, la hipótesis inicial de que el *Extracto Hidroalcohólico de Caléndula Off.*, como material de recubrimiento, podría inducir la formación de dentina terciaria, parece haberse confirmado.

Y no solo eso, sino, además, que, dicha inducción, se ha debido pura y llanamente al extracto; y no al azar u otros factores externo. Hecho que nos hace señalar que merece la pena seguir investigando sobre este tema y considerar pueda ser empleado, dentro de las nuevas líneas de investigación, como un material más dentro de la técnica de RPD.

Un material que hemos podido comprobar que, conforme pasan los días post-tratamiento, favorece la formación dentinaria hasta alcanzar el 73,3% de las preparaciones en los casos del grupo sacrificado a los 60 días; periodo de tiempo en el que, la pequeña diferencia con el *Hidróxido de Calcio*, en este sentido, carece de significación.

### *La Necrosis*

Desde el punto de vista de efectos secundarios o no deseados, el comportamiento de la *Caléndula*, aún cuando también produce focos de necrosis en la pulpa subyacente, en términos generales, dicho efecto, es algo menor que el que provoca el *Hidróxido de Calcio*, el cual, no solo hace que la necrosis aparezca de manera más rápida en la superficie situada bajo su aplicación, sino, además, de una manera mucho más intensa en un mayor número de preparaciones.

Así, pues, en cuanto a focos de necrosis se refiere, diremos que las observaciones realizadas a los 10 días post-tratamiento, arrojaron que estos aparecían más rápidamente y en mayor número de preparaciones en los casos tratados con *Hidróxido de Calcio*, que en los casos en los que utilizamos *Extracto de Caléndula* (100% y 80% , respectivamente, de las preparaciones observadas). Una diferencia que a lo largo de los periodos estudiados careció de significación estadística, ya que, salvo en el grupo de los 10 días, el número de preparaciones histológicas con necrosis superficial se mantuvo prácticamente igual para ambos materiales.

Esto, en principio, parece corroborar lo que en la literatura se señala como una desventaja del *Hidróxido de Calcio* frente a otros materiales en el RPD: que la acción cáusticamente irritante de su alta alcalinidad (con hemólisis y coagulación de la albúmina) provoca una rápida y marcadas necrosis en las pulpas subyacente a su aplicación. Es verdad que el pH 4.9 del *Extractos de Caléndula* y su propiedades antiinflamatorias, antiedematosas, antiséptica, cicatrizantes y reparadora, atribuidas a

su ac. oleoico, a sus carotenoides, flavonoides y triterpenos (sobre todo al ester de foradiol ), aparentemente, frente al *Hidróxido de Calcio*, altamente alcalino, podrían dar una visión contradictoria a cerca de la presencia de focos de necrosis en la pulpa situada bajo este material.

En efecto, aunque ello pueda parecer así, no podemos olvidar que, estando esas cualidades en el fondo de esa inicial menor incidencia de necrosis, todo sabemos que la simple acción mecánica de cualquier trauma, la preparación de cualquier cavidad, la presencia de cualquier agente extraño o la agresión química que supone la aplicación de cualquier material o medicamento sobre ella, es susceptible de provocar, no solo inflamación, congestión venosa y vasodilatación, sino, incluso, necrosis pulpar; y no podemos olvidar que nosotros hemos provocado intencionadamente una exposición mediante la creación de cavidades, hemos colocado una material inerte y hemos aplicado un nuevo material como elemento a investigar. <sup>(222, 223)</sup>

### ***La Inflamación***

Respecto a esta inflamación, diremos que al principio fue muy marcada en ambos casos; y su presencia en las preparaciones histológicas, en el 100% de los cortes analizados a los 10 días post-tratamiento; pero mientras que con el *Hidróxido de Calcio* la misma fue intensa y estuvo presente en los tres periodos estudiados en el 100% de los cortes histológicos, a partir de los 10 días, en los casos tratados con *Caléndula* la frecuencia de cortes con inflamación fué disminuyendo de manera notable hasta casi desaparecer a los 60 días post-tratamiento, donde el número de

preparaciones con signos de inflamación no superó el 13,3% de los casos; una diferencia estadísticamente muy significativa ( $p = 0.0000$ ) que a nuestro entender habla en favor de ese poder antiinflamatorio que desde siempre se ha atribuido a esta planta en virtud de sus principios activos. Poder antiinflamatorio, que, según diversos autores (Akihisa, Hamburger, de Loggia) <sup>(188,186, 185)</sup> parece deberse a que los extractos hidroalcohólicos de esta planta, en virtud de los ya mencionados principios activos, flavonoides, carotenoides y triterpenos; sobre todo de los foradioles laurico, palmítico y mirístico, entre otros efectos, inhiben, la actividad de las enzimas 5-lipooxigenasa (5-LO) y cyclooxygenasa-2 (COX-2) las cuales son claves en la formación de lícosanoides pre-inflamatorios (Herold, Cremer, Calugaru y cols. 2003) <sup>(170)</sup>.

Así, pues, mientras lo irritante del *Hidróxido de Calcio* mantiene la inflamación, la *Caléndula* la inhibe en virtud de verdaderos principios activos farmacológicamente demostrados.

Según nuestros resultados, pues, en el RPD, la capacidad antiinflamatoria del *Hidróxido de Calcio*, es mucho menor que la que presenta el *extracto de caléndula*. Un hecho más que sugiere que la *Caléndula Off.* tiene posibilidades de poder ser usada en los RPDs. porque, además de inducir la formación de dentina terciaria provoca mucha menos inflamación.

### ***Puentes dentinarios y Calcificaciones***

Sobre si la caléndula forma puentes dentinarios o no, lo primero que debemos señalar es que nosotros hemos considerado como puente dentinario, no a la simple presencia de dentina terciaria en el tejido pulpar subyacente al material de recubrimiento, sino a la formación de una cantidad de dentina lo suficientemente extensa como para constituir una barrera defensiva que uniera los dos extremos de la dentina subyacente afectada por el traumatismo o cavidad practicada experimentalmente en el diente de la rata.

En este sentido hemos de decir que en los cortes realizados no pudimos encontrar ningún caso o preparación histológica que sugiriera tal formación; aunque también, y ello debemos señalarlo, pese a que se describen en la literatura, tampoco los pudimos encontrar en ninguno de los casos tratados con *Hidróxido de Calcio*.

Si entendiéramos por puente dentinario cualquier barrera o cantidad de dentina terciaria inducida por el material de recubrimiento (que es lo que parece desprenderse de la literatura consultada), habría que convenir entonces, que ambos materiales, en nuestro trabajo, por el simple hecho de formar una barrera dentinaria defensiva, forman puentes dentinarios.

Un hecho que no podemos olvidar en el análisis de esta variable y que pensamos habla en favor de nuestro estudio, es que nosotros hemos efectuado y analizado un total de 450 cortes histológicos (cinco cortes por cada pieza dentaria

tratada con RPD); y que, salvo los que refieren haber efectuado uno o dos cortes (muy pocos), no hemos encontrado trabajos en los que se especifique los cortes histológicos realizados para afirmar la existencia o no de esos puentes dentinarios en esta técnica.

Solo a partir de los 30 días post-tratamiento, y de la misma forma para ambos materiales, comenzaron a aparecer calcificaciones difusas en las pulpas subyacentes al material recubridor. Calcificaciones que pudieron detectarse, a los 60 días post-tratamiento en el 100% de las preparaciones de los casos tratados tanto con *Caléndula* como con *Hidróxido de Calcio Puro Pro-análisis*. La presencia de éstas calcificaciones difusas, de hecho, se consideran como un signo de que la pulpa subyacente se defiende, mantiene su vitalidad, y por lo tanto, sus funciones nutritivas, defensivas y reparadoras; algo a lo que el *Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula Off. Linn. Europea* por nosotros investigado también contribuye como hemos podido comprobar.

## VI. CONCLUSIONES

Vistos los resultados obtenidos en este trabajo, Tesis Doctoral, en el que se experimenta y aplica por primera vez, el extracto de una planta (*Caléndula Off. Linn. Europea*) como material de recubrimiento pulpar en RPDs realizados en un modelo animal (*Ratas Norvegicus Albinus*) nosotros creemos poder concluir que:

- 1.- En la población de animales de experimentación estudiada, el *Extracto Hidro-Alcohólico de Caléndula Off. Linn. Europea (2:1)* y el *Hidróxido de Calcio Puro Pro-análisis*, en el RPD, se comportan, frente a la pulpa dental, de manera similar.
- 2.- El extracto *Hidro-Alcohólico de Caléndula Officinalis Linn. Europea*, induce la formación de dentina terciaria o reparativa cuando se aplica como material de recubrimiento en el RPD.
- 3.- La inducción de dentina terciaria por dicho extracto, aumenta progresivamente conforme pasa el tiempo post-tratamiento.
- 4.- El extracto *Hidro-Alcoholico de Caléndula Off. Linn. Europea* provoca mucha menos inflamación en el tejido pulpar subyacente a este material que el *Hidroxido de Calcio*.

5.- Tanto el *Hidróxido de Calcio* como el extracto *Hidro-alcohólico de Caléndula*, producen en la pulpa subyacente zonas de necrosis superficial localizada.

6.- La necrosis subyacente provocada por el *Hidróxido de Calcio*, es más intensa y aparece antes en un mayor número de preparaciones que la que se observa aplicando *Extracto de Caléndula*.

7.- En el sentido de formar barrera completa de dentina, en los periodos estudiados, ninguno de estos materiales llegó a constituir verdaderos puentes dentinarios. Solo extensas zonas de dentina reparativa.

8.- Ambos materiales dieron lugar a la aparición de calcificaciones difusas en la pulpa dental subyacente al tratamiento.

9.- Pensamos que tras mayores y extensos trabajos, el Extracto de *Caléndula Off. Linn. Europea*, podría ser un material susceptible de ser aplicado en el RPD como alternativa al *Hidróxido de Calcio*.

10.- Creemos que a tenor de las nuevas tendencias en investigación, dado el interés que hoy existe por encontrar nuevos principios activos susceptibles de ser aplicados en Farmacología, Medicina y Odontología, esta es una planta que, por principios activos, acciones, resultados y posibles aplicaciones, merece la pena seguir investigando dentro de la Odontología.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**

1. Gómez de Ferraris ME, Campos MA. Complejo Dentino-Pulpar II: Dentina. En: Gómez de Ferraris ME, Campos MA, editores. *Histología y Embriología Bucodental*. Madrid. Panamericana; 1999. p.198-225.
2. Gómez de Ferraris ME, Campos MA. Complejo Dentino-Pulpar I: Pulpa Dental. En: Gómez de Ferraris ME, Campos MA, editores. *Histología y Embriología Bucodental*. Madrid. Panamericana; 1999. p. 176-193.
3. Trowbridge H, Kim S. Desarrollo de la pulpa, estructura y función. En: Cohen S, Burns R, editores. *Vías de la pulpa*. 7ª edición. Madrid. Harcourt; 1999. p. 362-400.
4. Saralegui CA, González LC. *Histología Dental*. En: García BJ, editor. *Patología y Terapéutica Dental*. Madrid. Síntesis; 1997. p. 42-59.
5. Uribe EJ, Gladis PE, Núñez de Uribe EN. Protectores dentino-pulpaes. En: Uribe EJ editor. *Operatoria Dental. Ciencia y Práctica*. Madrid. Avances; 1990.p.147-193.
6. D'Souza RN, Bachean T, Baumgardner KR, Butler WT, Litz M. Characterization of cellular responses involved in reparative dentinogenesis in rat molars. *J Dent Res* 1995; 74 (2): 702-9.
7. Stanley HR, White CL, McCray L. The rate of terciary (reparative) dentin formation in the human tooth. *Oral Surg* 1966; 21(2):180-9.
8. Pashley DH, Walton RE. *Histología y fisiología de la pulpa dental*. En: Ingle JI, Bakland LK, editor. *Endodoncia*. México; 1996.p.336-437.

9. Mjör IA, Sveen B, Heyeras KJ. La biología de la pulpa-dentina (I): estructura y fisiología normal. *Quintessence Inter* 2002; 15 (8): 460-82.
10. Mjör IA, Smith MR, Ferrari M, Mannocci F. The structure of dentine in the apical region of human teeth. *International Journal Endodontics* 2001; 34 (5): 346-53.
11. Takahashi KK, Kim S. A scanning electron microscope study of the blood vessels of the dog pulp using corrosion resin cast. *Journal Endodontics* 1982; 8: 131-6.
12. Isokava S. Über das lymph System des Zahnes. *Z Zellforsch* 1960; 52: 140.
13. Kilhara T. Das extravasculare Saftbahnsystem, *Okajimas Folia. Anat. Jpn* 1956; 28: 601.
14. Bishop MA. Extracellular fluid movement in the pulp: the pulp-dentin permeability barrier. *Proc Finn Dent Soc* 1992, 88 (1): 331-5.
15. Marchetti C, Piacentini C. Examin au microscope photonique et au microscope electronique des capillaries lymphatiques de al pulpe dentaire humaine, *Bulletin du Groupement International Pour la Recherche. Scientifique en Stomatologie et Odontologie* 1990; 33:19.
16. Bernik S. Lymphatic vessels of the human dental pulp. *J Dent Res* 1977; 56 (1):70-77.
17. Walton RE, Langeland K. Migration of materials in the dental pulp of monkeys. *JOE* 1978; 4 (6): 167-77.

18. Levy BM, Bernick S. Studies on the biology of the periodontium marmosets. Lymphatic vessels of the periodontal ligament. *J Dental Res* 1968; 47 (6): 1166.
19. Massler M, Consideraciones biológicas en la selección y aplicación de los materiales restauradores. *Odont Clin Norte Amér* 1969; 25: 177-198.
20. Weine FS. *Terapéutica en Endodoncia*, 2ª edición. Barcelona. Salvat; 1992.
21. Conejo FB. Fisiopatología dentaria. En: García Barbero J, editor. *Patología y terapéutica dental*. Madrid. Síntesis; 1997. p. 65-79.
22. Ginjeira AM. Protecções pulpares. *Revista Portuguesa de Estomatología e Cirurgia Max* 1984; 25(3):935-51.
23. Lasala A. *Endodoncia*. 3ª edición. Barcelona. Salvat; 1979. p.238.
24. Camejo SM, Respuesta pulpar ante el recubrimiento pulpar directo. Revisión de la literatura. *Acta Odontológica Venezolana* 1999; 37(3): 205-15.
25. Maroto EM. Estudio clínico del agregado trióxido mineral en pulpotomías de molares temporales. Madrid: Departamento de Estomatología IV de la Universidad Complutense de Madrid; 2003.
26. Basrani E, Di Nallo R. Endodoncia en dientes permanentes jóvenes. En: Basrani E, editor. *Endodoncia Integrada. Actualidades médicas odontológicas*, 1999.
27. Mc Donald RE, Avery DR. *Odontología pediátrica y del adolescente*. 6ª edición. Madrid. Mosby; 1995. p. 417-18.
28. Fuks AB. Pulp therapy for the primary and young permanent dentitions. *Dental Clin North Am* 2000; 44 (3): 571-96.

29. Gani O, Cosa ME. Órgano dentino pulpar: fundamentos biológicos acerca de la respuesta clínica por aplicación del  $\text{Ca(OH)}_2$ . *Revista Esp de Endodoncia* 1989; 7(3):129-36.
30. Barbería Leache E, Boj Quesada JR, Catalá Pizarro M. *Odontopediatría*. 2ª Edición. Barcelona. Masson; 2001. p. 255-269.
31. Dummet C, Kopel H. *Endodoncia Pediátrica*. En: Ingle Bakland L, editor. *Endodoncia*. 4ª edición. México. Mc Graw Hill Interamericana; 2003.p.873-914.
32. Sazak H, Gunday M, Alatli C. Effect of calcium hydroxide and combinations of Ledermix and calcium hydroxide on inflamed pulp in dog teeth. *Journal Endodontics* 1996; 22(9): 447-9.
33. Baume LJ, Holz J. Long term clinical assessment of direct pulp capping. *International Dental Journal* 1981; 31: 251-260.
34. Cox CF, Bergenholtz G, Heys D, Syed SA, Fitzgerald M, Heys RJ. Pulp capping of the dental pulp mechanically exposed to oral microflora: a 1-2 year observation of wound healing in monkey. *J Oral Pathol* 1985; 14:156-168.
35. Swiift J, Trope M, Ritter AV. Vital pulp therapy for the mature tooth-can it work?. *Endodontic Topics* 2003; 5: 49-562.
36. Camp J. Tratamiento endodóntico en pediatría. En: Cohen S, Burns R, editores. *Vías de la pulpa*. 7ª edición. España. Mosby; 2002: 694-734.
37. Stanley HR. Pulp capping: Conserving the dental pulp-Can it be done? Is it worth it?. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 68: 628-39.
38. Stanley HR. Criteria for standardizing and increasing creability of direct pulp capping studies *Proceeding of Symposium Current Concepts and Controversies in Vital Pulp Capping*. *American Journal Dental* 1998; 11: S11-S16.

39. Long HP. Oral and dental trauma in children and adolescents. Oxford University. London 1996; 39-53.
40. Seltzer S, Bender IB. Recubrimiento pulpar y pulpotomía. En: Seltzer S, Bender IB, editores. La pulpa dental. Consideraciones biológicas en los procedimientos odontológicos. 3º Edición. México. El manual; 1987. p. 265-84.
41. Matsuo T, Nakanishi T, Shimizu H, Ebisu S. A clinical study of direct pulp capping applied to carious- exposed pulps. J Endod 1996; 22 (10): 551-6.
42. Cvek M. A clinical report of partial pulpotomy and capping with calcium hydroxide in permanent incisors with complicated crown fractures. J Endod 1978; 4: 232.
43. Cvek M, Lungberg M. Histological appearance of pulps alter exposure by crown fracture, partial pulpotomy, and clinical diagnosis of healing. J Endod 1983; 9:8.
44. Cvek M, Cleaton-Jones PE, Austin JC, Andreasen JO. Pulp reactions to exposure alter experimental crown fracture or grinding in adult monkeys. J Endod 1982; 8: 391.
45. Escobar MF. Odontología pediátrica. 2ª edición. Madrid. Amolca; 2004. p. 249-251.
46. Boj. JR, Catalá M, García BC, Mendoza A. Odontopediatria. Barcelona. Masson; 2004. p.188.
47. González ER, Ruiz ML. Diagnóstico y tratamiento pulpar en dentición temporal. En: Boj JR, Catalá M, García BC, Mendoza A, editores. Odontopediatria. Barcelona. Masson; 2004. p.173-183.

48. Álvarez AI, Ruiz del Árbol LJ. Tratamientos pulpares en dentición permanente joven. En: Boj JR, Catalá M, García BC, Mendoza A, editores. Odontopediatría. Barcelona. Masson; 2004 .p. 185-90.
49. Fregoletto H. Association between deciduous dentine sclerosis and calcium hydroxide matrix celulous base material. J Dent Assoc 1961; 63: 76-79.
50. Hidalgo AJ. Restauraciones directas mixtas. Bases cavitarias. En: García Barbero J, editor. Patología y terapéutica dental. Madrid. Síntesis; 1997.p.530.
51. Moreira M. Protección del complejo dentino-pulpar. Resúmenes de curso y conferencias. 9º Congreso de la Asociación Latinoamericana de Operatoria dental y Biomateriales. Perú, 2002; 1:54-7.
52. Azabal AM, Vega del Barrio JM. Cementos en odontología (II): Cementos de hidróxido de calcio. Cementos de óxido de cinc-eugenol. En: Vega del Barrio, editor. Materiales en odontología, fundamentos biológicos, clínicos, biofísicos y físico-químicos.Madrid. Avances; 1996. p. 387-403.
53. Fava LR, Saunders WP. Calcium hydroxide pastes: classification and clinical indications. Int Endod J 1999; 32(4): 257-82.
54. Graham L, Cooper PR, Cassidy N, Nor JE, Sloan AJ, Smith A.The effect of calcium hydroxide on solubilisation of bio-active dentin matrix components. Biomaterials 2006; 27 (14): 2865-73.
55. Canalda C, Brau E. Endodoncia. Técnicas clínicas y Bases Científicas. Barcelona Masson; 2001.
56. Stanley HR, Lundy T. Dycal therapy for pulp exposures. Oral Surg 1972; 34 (5):818-27.

57. Wakabayashi H, Horikawa M, Funato A, Onodera A, Matsumoto K.. Bio-microscopical observation of dystrophic calcification induced by calcium hydroxide. *Endod Dent Traumatol* 1993; 9 (4): 165-70.
58. Subrammaniam P, Konde S, Prashanth P. An in vitro evaluation of pH variations in calcium hydroxide liners. *J Indian Soc Pedod Prev Dent*. 2006; 24(3): 144-5.
59. Schöder U. Effects calcium hydroxide containing pulp capping agents on pulp cell migration, proliferation and differentiation. *J Dent Res* 1985; 64: 541-548.
60. Yamamura T. Differentiation of pulpal cells and inductive influences of various matrices with referente to pulpal wound healing. *J Dent Res* 1985; 64: 530-40.
61. Schuurs AH, Gruythuysen RJ, Wesselink PR. Pulp capping with adhesive resin-based composite vs. Calcium hydroxide: a review. *Endod Dent Traumatol* 2000; 16(6): 240-250.
62. Yoshida K, Yoshida N, Nakamura H, Iwaku M, Ozawa H. Immunolocalization of fibronectin during reparative dentinogenesis in human teeth alter pulp capping with calcium hydroxide. *J Dent Res* 1996; 75(8): 1590-97.
63. Gómez M. Efectos del uso del hidróxido de calcio ante diferentes situaciones clínicas. *Universitas Odontológica* 1984; 69-77.
64. Cox CF, Subay RK, Ostro E, Suzuki S, Suzuki SH. Tunnel defects in dentin bridges: their formation following direct pulp capping. *Oper Dent* 1996; 21(1): 4-11.
65. Pereira JC, Bramante CM, Berbera A, Mondelli J. Effect of calcium hydroxide in powder or in paste form on pulp capping procedures: histopathologic and radiographic analysis in dog's pulp. *Oral Surg* 1980; 50(2): 176-86.

66. Safavi KE, Nichols FC. Effect of calcium hydroxide on bacterial lipopolysaccharide. *J Endod* 1993; 19: 76-8.
67. Safavi KE, Nichols FC. Alteration of biological properties of bacterial lipopolysaccharide by calcium hydroxide treatment. *J Endod* 1994; 20:127-29.
68. Cvek M, Hollender L, Nord CE. Treatment of non- vital permanent incisors with calcium hydroxide.VI. A clinical, microbiological and radiological evaluation of treatment in one sitting of teeth with mature or immature root. *Odontol Revy* 1976; 27(2): 93-108.
69. Cvek M, Nord CE, Hollender L. Antimicrobial effect of root canal debridement in teeth with immature root. A clinical and microbiologic study. *Odontol Revy* 1976; 27(1): 1-10.
70. Bystrom A, Claesson R, Sundqvist G. The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1985; 1:170-5.
71. Safavi KE, Dowden WE, Intracaso JH, Langeland KA. Comparasion of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine. *J Endod* 1985; 11: 454.
72. Matsumiya S, Kitamura M. Histo-pathological and histo-bacterial studies of the relation between the codition of sterilization of the root canal and healing process of periapical tissues in experimentally infected root canal treatment. *Bull Tokyo Dent Coll* 1960; 1:1-19.
73. Siqueira J, Lopes H. Mechanisms of antimicrobial activity of calcium hydroxide: a critical review. *Int Endod J* 1999; 32:361-69.
74. Foreman PC, Barnes IE. A review of calcium hydroxide. *Int Endod J* 1990; 23(6): 283-97.

75. Çagin AY, Aksoy A, Ertas E, Güvenç D. The pH changes of calcium hydroxide mixed with six different vehicles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;103 (5): 712-17.
76. Momson DC, Ryan JL. Endotoxins and disease mechanisms. *Ann Rev Med*, 1987; 38: 417-32.
77. Gardner DE, Mitchell DF, Mc Donald ER. Treatment of pulps of monkeys with vancomycin and calcium hydroxide. *Journal of Dental Research* 1971; 50 (5): 1273-77.
78. Mani SA, Charla HS, Tewari A, Goyal A. Evaluation of calcium hydroxide and zinc oxide eugenol as root canal filling materials in primary teeth. *Journal of dentistry for children*, 2000:142-7.
79. Verde S. Aplicaciones del hidróxido de calcio en la terapia endodóntica. [Revista electrónica] 1997; : Disponible en: <http://www.endodental.ucv.com>.
80. Boj JR, Cortés O, Canalda C. Tratamiento de un molar permanente inmaduro necrótico mediante pulpotomía. *Endod* 1995; 13(3):148-52.
81. Nobuke H. The effects of calcium hydroxide eugenol agents on pulp of primary teeth of young dogs. *Japanese J Pedod* 1989; 27:915-21.
82. Sorbe R, García FJ. Conceptos básicos en Odontología Pediátrica. Venezuela, Disinlimed CA; 1996.
83. Markowitz K, Moynihan ML, Kim SK. Biologic properties of Eugenol and Zinc oxide-eugenol. *Oral Surg* 1992; 73:729-39.
84. Gossel TA. Relieving the pain of toothache. *US-Pham* 1986; 11:23, 4, 28, 31-2.

85. González ER. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. *Rev Cubana Estomatol* 2002; 39(2):139-56.
86. Tchaou W, Turng BF, Minah GE, Coll JA. In vitro inhibition of bacteria from root canals of primary teeth by various dental material. *Pediatric Dent* 1995; 17 (5): 351-5.
87. Hassan FM, Farid AM. The antibacterial effect of calcium hydroxide and zinc oxide eugenol cements on carious dentine. *Egyp Dent J* 1988; 31(1):17-28.
88. Chaung HM, Hong CH, Chiang CP, Lin SK et al. Comparison of calcium phosphate cement mixture and pure calcium hydroxide as direct pulp capping agents. *J Formos Med Assoc* 1996; 95 (7): 545-50.
89. Weiner RS. Liners, bases and cements: a solid foundation. *Gent Dent* 2002; 50 (5): 442-6.
90. Tronstad L, Mjör IA. Pulp reactions to calcium hydroxide containing materials. *Oral Surg* 1972; 33 (6):961-5.
91. Isaia V, Guimarães C. Formação de dentina cicatricial em polpas sob proteção direta com hidróxido de cálcio, formagen e óxido de zinco e eugenol. *Estomat. & Cult.*, 1975; 9 (2):265-70.
92. Costa C, Mesas A, Hebling J. Pulp response to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dentist* 2000; 13(2): 81-87.
93. Lee S, Monsef M, Torabinejad M. Sealing ability of a mineral trioxide aggregate for repair of lateral root perforations. *J Endod* 1993; 19(11):541-4.
94. Torabinejad M, Chivian N. Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 1999; 25 (3): 197-205.

95. Bóveda CZ. Aplicación clínica del Agregado Trióxido Mineral (MTA) en endodoncia. [Revista electrónica] 2000; Disponible en: <http://www.carlosboveda.com/Odontologosfolder/odontoinvitadoold/odontoinvitado7.htm>.
96. Torabinejad M, Hong CU, Mc Donald F, Pitt Ford TR. Physical and Chemical Properties of a new end filling material. *J Endod* 1995; 21(7): 349-53.
97. García Barbero E, Vera GV, Velásquez CJ. Nuevas posibilidades terapéuticas en endodoncia. *Rev Europea de Odonto-Estomatología* 2000; 12(6):325-30.
98. Miñana GM. El agregado de trióxido mineral (MTA) en endodoncia. *RCOE* 2002; 7(3): 283-289.
99. Myers K, Kamiinski E, Lautenschlager E, Millar D. The effects of Mineral Trioxide Aggregate on the dog pulp. *J Endod* 1996; 22(4):198.
100. Aeinehchi M, Eslami B, Gahanbariha M, Saffar AS. Mineral trioxide aggregate (MTA) and calcium hydroxide as pulp-capping agents in human teeth: a preliminary report. *Int Endod J* 2003; 36 (3): 225-31.
101. Faraco Junior IM, Holland R. Histomorphological response of dog's dental pulp capped with white mineral trioxide aggregate. *Braz Dent J* 2004; 15 (2): 104-8.
102. Holland R, Bisco FL, de Souza V, Otoboni Filho JA, Murata SS, Dezan EJr. Reaction of the lateral periodontium of dog's teeth to contaminated and noncontaminated perforations filled with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 2007; 33 (10): 1192-7.
103. Pariookh M, Asgary S, Eghbal M, Stowe S, et al. A comparative study of white and grey mineral trioxide aggregate as pulp capping agents in dog's teeth. *Dent Traumatol* 2005; 21:150-154.

104. Iwamoto CE, Adachi E, Pameijer CH, Barnes D, Romberg E, Jefferies S. Clinical and histological evaluation of white ProRoot MTA in direct pulp capping. *Am J Dent* 2006; 19(2): 85-90.
105. Briso FA, Rahal V, Menestreneker RS, Junior DE. Biological response of pulps submitted to different capping materials. *Brazilian Oral Research*, 2006; 20(3): 219-25.
106. Ford PT, Torabinejad M, Abedi HR, Bakland LK, Kariyawasam SP. Using mineral trioxide aggregate as pulp capping material. *J Am Dent Assoc* 1996;127(10): 1491-4.
107. Schmitt D, Lee J, Bogen G. Multifaceted use of ProRoot MTA root canal repair material. *Pediatr Dent* 2001; 23(4) 326-330.
108. Abedi HR, Torabinejad M, Mc Millan P. The effect of demineralization of resected root ends on cementogenesis. *J Endod* 1997; 23(4): 258.
109. Abedi HR, Torabinejad M, Pitt Ford RT, Bakland LK. The use of Mineral Trioxide Agregate cement (MTA) as direct pulp capping agent. *Journal of Endod* 1996; 22(4):199.
110. Miñana GM. El agregado de trióxido mineral(MTA) en endodoncia. *RCOE*, 2002; 7(3): 283-289. Disponible en: <http://scielo.isciii.es>.
111. Crane LE. Hard tissue barrier formation after pulp capping?. *The journal of evidence-based dental practice*, 2006; 7 (4): 95.
112. Faraco IM, Holland R. Response of the pulp of dogs to capping with mineral trioxide aggregate or a calcium hydroxide cement. *Dent Traumatol* 2001; 17 : 163-66.

113. Jiménez PA, Cadaval R, Manzanares JR, Egea SJ. Sistemas adhesivos. En :  
Materiales en odontología, fundamentos biológicos, clínicos, biofísicos y físico-  
químicos. Ediciones Avances. Madrid, 1996. p. 315-331.
114. Stockton LW. Vital pulp capping: a worthwhile procedure. A review. J Can  
Dent Assoc 1999; 65(6): 328-31.
115. Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araujo VC. Adverse  
effects of human pulps alter direct pulp capping with the different components from  
a total-etch adhesive system. Dent Mater 2005; 21(7): 599-607.
116. Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araujo VC. Response  
of human pulp capped with a bonding agent after bleeding control with hemostatic  
agents. Oper Dent 2005; 30(2): 147-55.
117. Szep S, Kunkel A, Ronge K, Heideman D. Cytotoxicity of modern dentin  
adhesives in vitro testing on gingival fibroblasts. Mat Res 2002; 63: 53- 60.
118. Costa CA, Hebling J, Hanks CT. Current status of pulp capping with dentin  
adhesive systems: a review. Dent Mater 2000; 16: 188-197.
119. Costa CA, do Nascimento LA, Teixeira HM, Fontana UF. Response of human  
pulp capped with a self-etching adhesive system. Dent Mater 2001; 17:230-240.
120. Demarco FF, Tarquinio SB, Jaeger MM, de Araujo VC, Matson E. Pulp  
response and cytotoxicity evaluation of 2 dentin bonding agents. Quintessence Int  
2001; 32(2): 211-20.
121. Tsuneda Y, Hayakawa T, Yawamoto H, Ikemi T, Nemoto K. A histopathological  
study of direct pulp capping with adhesive resins. Oper Dent 1995;20(6):223-29.

122. Subay RK, Demirci M. Pulp tissue reactions to a dentin bonding agent as a direct capping agent. *J Endod* 2005; 31(3): 201-4.
123. Horsted-Bindslev P, Vilkinis V, Sidlauskas A. Direct capping of human pulps with a dentin bonding system or with calcium hydroxide cement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 2003; 96(5):591-600.
124. Ölmez A, Öztas N, Basak F, Sabuncuoglu B. A histopathologic study of direct pulp capping with adhesive resins. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 86: 98-103.
125. Kiba H, Hayakawa T, Nakanuma K, Yamazaki M, Yamamoto H. Pulpal reactions to two experimental bonding systems for pulp capping procedures. *J Oral Science* 2000; 42 (2): 69-74.
126. Koliniotou -Koumpia E , Tziafas D. Pulpal responses following direct pulp capping of healthy dog teeth with dentine adhesive systems. *J Dent* 2005; 33(8): 639-47.
127. Parmeijer C, Stanley H. The disastrous effects of the “ Total Etch” technique in vital pulp capping in primates. *Am J Dent* 1998; 11(3):148-54.
128. Lu Y, Liu T, Li X, Li H, Pi G. Histologic evaluation of direct pulp capping with a self-etching adhesive and calcium hydroxide in beagles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 102 (4): 78-84.
129. Silva GA, Lanza LD, Lopes-Junior N, Moreira A, Alves JB. Direct pulp capping with a dentin bonding system in human teeth: a clinical and histological evaluation. *Oper Dent* 2006; 31 (3): 297-307.

130. 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 Endod* 2003; 29 (11):729-34.
131. Pereira JC, Segala DA, Costa SC. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000; 13: 139-147.
132. Swift J, Trope M, Ritter AV. Vital pulp therapy for the mature tooth-can it work?. *Endod Topics* 2003; 5: 49-562.
133. Ersin NK, Eronat N. The comparison of a dentin adhesive with calcium hydroxide as pulp capping agent on the exposed pulps of human and sheep teeth. *Quintessence Int* 2005; 36(4): 271-80.
134. Gonzalez LS, Bolanos CV. Long- term evolution of a case of direct pulp capping by adhesion to dentin. *Quintessence Int* 2005; 36 (10): 797-803.
135. Medina VO 3rd, Shinkai K, Shirono M, Tanaka N, Katoh Y. Histopathologic study on pulp response to single- bottle and self-etching adhesive systems. *Oper Dent* 2002; 27(4): 330-42.
136. Kitasako Y, Shibata S, Pereira PN, Tagami J. Short- term dentin bridging of mechanically-exposed pulps capped with adhesives resin systems. *Oper Dent* 2000; 25:155-162.
137. Hidalgo AJ. Cementos en odontología (III): Cementos de vidrio ionómero. En: Vega de Barrio JM, editor. *Materiales en odontología fundamentos biológicos, clínicos, biofísicos y físico-químicos*. Madrid. Avances; 1996.p. 405-420.
138. Do Nascimento AB, Fontana FU, Teixeira HM, Costa CA. Biocompatibility of a resin-modified glass-ionomer cement applied as pulp capping in human teeth. *Am J Dent* 2000; 13(1):28-34.

139. Costa CA, Oliveira MF, Giro EM, Hebling J. Biocompatibility of resin based materials used as pulp capping agents. *Int Endod J* 2003; 36(12): 831-9.
140. De Souza CC, Aparecida GE, Do Nascimento BL, Teixeira MH, Hebling J. Short term evaluation of the pulpo-dentin complex response to a resin modified glass ionomer cement and bonding agent applied in deep cavities. *Dent Mat* 2003; 19(8): 739-746.
141. Tarim B, Hafez AA, Cox CF. Pulpal response to a resin modified glass ionomer material on nonexposed and exposed monkey pulps. *Quintessence Int* 1998; 29(8): 535-42.
142. Demirci M, Üçok M, Küçükkeles N, Soydan N. Pulp reaction to a tri-cure resin modified glass ionomer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol End* 1998; 85(6): 712-19.
143. About I, Murray PE, Franquin JC, Remusat M, Smith AJ. Pulpal inflammatory responses following noncarious class V restorations. *Oper Dent* 2001; 26(4): 336-42.
144. Decup F, Six N, Palmier B, Buch D, et al. Bone sialoprotein- induced reparative dentinogenesis in the pulp of rat's molar. *Clin Oral Invest* 2000; 4: 110-119.
145. Golberg M, Six N, Decup F, Buch D, et al. Application of bioactive molecules in pulp capping situations. *Adv Dent Res* 2001; 15: 91-95.
146. Golberg M, Six N, Decup F, Lasfargues JJ, et al. Bioactive molecules and the future of pulp therapy. *Am J Dent* 2003; 16 (1): 66-76.
147. Golberg M, Lacerda PS, Jegat N, Six N, et al. The impact of bioactive molecules to stimulate tooth repair and regeneration as part of restorative dentistry. *Dent Clin* 2006; 50: 277-298.

148. Rutherford RB, Whale J, Rueger D, Charette M. Induction of reparative dentine formation in monkeys by recombinant human osteogenic protein-1. *Arch Oral Biol* 1993; 38(7): 571-6.
149. Hu CC, Zhang C, Qian Q, Tatum NB. Reparative dentón formation in rat molars alter direct pulp capping with growth factors. *J Endod* 1998; 24(11): 744-51.
150. Klaiber B, Düker J, Joos U, Perino W. Pulp reaction and formation of hard substances alter direct capping with a lyophilized collagen preparation. *Dtsch Zaharztl Z* 1980; 35(8): 809-11.
151. Nakamura Y, Hammarström L, Lundberg E, Ekdahl H, et al. Enamel matrix derivate promotes reparative processes in the dental pulp. *Adv Dent Res* 2001; 15:105-7.
152. Ishizaki NT, Matsumoto K, Kimura Y, Wang X, Yamashita A. Histopathological study of dental pulp tissue capped with enamel matrix derivative. *J Endod* 2003; 29(3): 176-9.
153. Lovschall H, Fejerskov O, Flyvbjerg A. Pulp capping with recombinant human insulin-like growth factor I (rhIGF-I) in rat molars. *Adv Dent Res* 2001; 15:108-12.
154. Cullum DR, Kline LW. Pulp response after calcitonin treatment of direct exposures in the dog. *Oral Surg* 1985; 60(2): 218-23.
155. Sena M, Yamashita Y, Nakato Y, Ohgaki M, et al. Octacalcium phosphate-based cement as pulp capping agent in rats. *Endod* 2004; 97(6): 759-755.
156. Su Q, Ye L, Zhou XD. Experimental study of the pulpal response of dogs capping with Nha-pa66. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban iotechnological Equipment*, 2007; 21(2): 198-204.

157. Yildirin S, Alaçam A, Saritaş ZK, Oygür T. In vivo effect of calcium phosphate biomaterials on dog dental pulp. *Biotech and Biotechnol Equip* 2007; 21(2): 198-204.
158. Polunin M, Robbins C. *The Natural Pharmacy*. New York. Collier Books. Macmillan Publishing Company; 1992.
159. Cowen DL, Helfand WH. *Historia de la farmacia. Volumen I*. Barcelona. Doyma; 1992. p.4, 15-17.
160. Ramos e Silva M. Saint Hildegard von Bingen (1098-1179): The light of her people and of her time. *Int J Dermat* 1999; 38(4): 315-320.
161. Mamani Tincusi B. Metabolitos secundarios bioactivos de la flora medicinal iberoamericana: pipernelongatum, copaifera paupera, crossopetalum tonduzii y maytenus cuzcoina. La Laguna: Departamento de Química Orgánica de la Universidad de la Laguna [tesis doctoral inédita]; 1999. p.4-10.
162. Pareja B, Juárez J, García M, Gorriti A, et al. Plantas empleadas en medicina tradicional (revisión). *Folia Dermatológica Peruana* 2000;11(1)[revista electrónica] Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/fofia/Vol11\\_N1/plantas20empl eadas.htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/BVrevistas/fofia/Vol11_N1/plantas20empl eadas.htm).
163. Li Y, Jiang R, Ooi LS, But PP, Ooi VE. Antiviral triterpenoids from the medicinal plant *Schefflera heptaphylla*. *Phytother Res* 2007; 21(5):466-70.
164. De Castro P, Hoshino A, da Silva J, Mendes FR. Possible axiolytic effect of two extracts of *passiflora quadrangularis* L. in experimental models. *Phy Res* 2007; 21: 481-484.
165. Suzutani T, Ogasawara M, Yoshida I, Azuma M, Knox YM. Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phy Res*, 2003; 17(6):609-13.

166. Lahoud SV, Gutierrez MJ, Romero DM, Ortiz E. Análisis histológico del recubrimiento pulpar directo con pasta a base de *Uncaria Tormentosa*. Uña de gato, Odontología Sanmarquina, 2000; 1 (5) [revista electrónica] Disponible en: <http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bvrevistas/odontologia>.
167. Gutierrez Lara JP. Estudio de la respuesta tisular a una asociación experimental versus cemento convencional. Lima: Departamento EAP de odontología de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos; 2002: Disponible en: [http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bibvirtual/tesis/Salud/Gutierrez\\_L\\_J/htm](http://sisbib.unmsm.edu.pe/Bibvirtual/tesis/Salud/Gutierrez_L_J/htm).
168. Rosen S, Elvin LM, Beck FM, Beck EX. Anticariogenic effects of tea in rats. J Dent Res, 1984;63(5):658-60.
169. Yu H, Oho T, Tagomori S, Morioka T. Anticariogenic effects of green tea. Fukuoka Igaku Zasshi 1992; 83(4):174-80.
170. Herold A, Cremer L, Calugaru A, Tamas V, et al. Hydroalcoholic plant extracts with anti-inflammatory activity. Rom Arch Microbiol Immunol 2003; 62(1-2): 117-29.
171. Sabir A, Tabbu CR, Agustiono P, Sosroseno W. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. J Oral Science 2005; 47(3): 135- 138.
172. Cáceres A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala. Universitaria; 1996. p. 108-111.
173. Águila GB, Menéndez CR, González RC, Fernández FD. Extracto acuoso de *caléndula officinalis*. Estudio preliminar de sus propiedades. Rev Cubana Planta Medica, 2000; 5(1): 30-1.
174. Lastra Valdes H, Piquet Garcia R. *Caléndula Officinalis*. Rev Cubana Farm 1999; 33(3):15 - 21.

175. Bako E, Deli J, Toth G. HPLC study on the carotenoid composition of Calendula products. *J Biochem Biophys Methods* 2002;53(1-3):241-50.
176. Pietta P, Bruno A, Mauri P, Rava A. Separation of flavonol-2-O-glycosides from *Calendula officinalis* and *Sambucus nigra* by high-performance liquid and micellar electrokinetic capillary chromatography. *J Chro* 1992; 593(1-2):165-70.
177. Dumenil G. Evaluation of antibacterial properties of *Calendula Officinalis* flowers and mother homeopathic tinctures of *C. Officinalis*. *Ann. Pharm Fr* 1980; 38 (6): 493-499.
178. Balducci-Roslindo E, Gonzales Silverio K, Mercaldi Malagoli D. Processo de reparo em feridas de extração dentaria em camundongos tratados com o complexo *Syphytum officinale* e *Calendula officinalis*. *Rev Odont Univ Sao Paulo* 1999; 13 (2): 181-187.
179. Kishimoto S, Maoka T, Sumitomo K, Ohmiya A. Analysis of carotenoid composition in petals of calendula (*Calendula officinalis* L.). *Biosci Biotechnol Biochem* 2005; 69(11):2122-8.
180. Chushenko V. Carbohydrates from inflorescence of *calendula officinalis*. *Khim Prir Soedin* 1988; 4: 585-6.
181. Istudor V. Chemical study of calendula flower products, preparation of the type extract and determination of the control methodology. *Farm* 1981; 29(1):41-8.
182. Dedio I. Value of *calendula officinalis* as a tannin source. *Herba Pol* 1983; 29 (3-4): 211-6.
183. Yoshikawa M, Murakami T, Kishi A, Kageura T, Matsuda H. Medicinal flowers. III. Marigold. (1): hypoglycemic, gastric emptying inhibitory, and gastroprotective principles and new oleanane-type triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull* 2001; 49(7): 863-70.

184. Marukami T, Kishi A, Yoshikawa M. Medicinal flowers. IV. Marigold (2): Structures of new ionone and sesquiterpene glycosides from Egyptian *Calendula officinalis*. *Chem Pharm Bull* 2001; 49(8): 974-78.
185. Della Loggia R, Tubaro A, Sosa S, Becker H. The role of triterpenoids in the topical anti-inflammatory act of *Caléndula Officinalis* flowers. *Planta Med* 1994; 60(6): 516-20.
186. Hamburger M, Adler S, Baumann D, Forg A, Weinreich B. Preparative purification of the major anti-inflammatory triterpenoid esters from Marigold (*Calendula officinalis*). *Fitoterapia* 2003; 74(4): 328-38.
187. Zitterl EK, Sosa S, Jurenitsch J, Shubert-ZM, Della Loggia R, Tubaro A, et al. Anti-oedematous activities of the main triterpendiol esters of marigold (*Calendula officinalis* L.). *J Ethnopharm* 1997;57(2): 139-44.
188. Akihisa T, Yasukawa K, Oinima H, Kasahara Y, et al. Triterpene alcohols from the flowers of *compositae* and their anti-inflammatory effects. *Phytochem* 1996; 3(6): 1255-60.
189. Oliveira Simoes CM, Schenkel EP, Gosmann G. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Portoalegre/Florianópolis: Editora da Universidade; 2002.
190. Krazhan IA, Garazha NN. Treatment of chronic catarrhal gingivitis with polysorb-immobilized calendula. *Stomathologia* 2001; 80 (5): 11-13.
191. Gasiorowska I, Jachimowicz M, Patalas B, Mlynarczyk A. The use of *Calendula officinalis* in the treatment of periodontopathies. *Czasopismo Stomatologiczne* 1983; 36(4): 307-11.
192. Kalvatchev Z, Walder R, Garzaro D. Anti HIV activity of extracts from *Calendula officinalis* flowers. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 1997; 51(4): 176-80.

193. Lavagna SM, Secci D, Chimenti P, Bonsignore L, Ottaviani A, Bizzarri B. Efficacy of Hypericum and Calendula oils in the epithelial reconstruction of surgical wounds in childbirth with caesarean section. *Farmaco* 2001; 56(5-7):451-3.
194. Corina P, Dimitris S, Emanuil T, Nora R. Treatment with acyclovir combined with a new Romanian product from plants. *Oftalmologia* 1999;46(1): 55-7.
195. Duran V, Matic M, Jovanovic M, Mimica N, Gajinovic Z, Poljacki M, et al. Results of the clinical examination of an ointment with marigold (*Calendula officinalis*) extract in the treatment of venous leg ulcers. *International Journal Tissue React*, 2005; 27(3): 101-6.
196. Bashir S, Janbaz KH, Jabeen Q, Gilani AH, Studies on spasmogenic and antispasmodic activities of *Calendula officinalis* flowers. *Phyto Res* 2006; 20(10): 906-10.
197. Pommier P, Gomez F, Sunyach MP, D'Hombres A, Carrie C, Montbarbon X. Phase III randomized trial of *Calendula officinalis* compared with trolamine for the prevention of acute dermatitis during irradiation for breast cancer. *J Clin Oncol* 2004; 22(8): 1447-53.
198. Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual in vivo effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 2006; 5;6:119.
199. Teske M, Trentini M. *Compendio de fitoterapia*. 2ª ed. Curitiba: Herbarium Laboratorio Botánico Ltda; 1995 p. 66-68.
200. Michel F. *Apis Mellifica* and *Calendula officinalis* combination active against sunburn. *Ger Offen*, 1977. En: Humberto Lastra Valdés. *Caléndula officinalis*. Artículos de revisión. *Rev Cubana Farm* 1999;33(3):188-94.

201. Fleischner AM. Plants extract to accelerate healing and reduce inflammation. Cosmet toilet, 1985;100:45-6,48-51,54-8. En: Humberto Lastra Valdés. *Caléndula officinalis*. Artículos de revisión. Rev Cubana Farm 1999;33(3):188-94.
202. Iauk L, Lo Bue AM, Milazzo I, Rapisarda A, Blandino G. Antibacterial activity of medicinal plant extracts against periodontopathic bacteria. Phy Res 2003; 17(6): 599-604.
203. Wagner H. Immunostimulating polysaccharides of higher plants. *Arzneimittelforschung* 1984; 34(6):659-61. En: Humberto Lastra Valdés. *Caléndula officinalis*. Artículos de revisión. Rev Cubana Farm 1999;33(3):188-94.
204. Rocaud MA. Citotoxic and antitumoral activity of *C. officinalis* extracts. Pharm 1988; 43(3): 220-1. En: Humberto Lastra Valdés. *Caléndula officinalis*. Artículos de revisión. Rev Cubana Farm 1999;33(3):188-94.
205. Sánchez CA, Ibarra MH, Inda CR, Ruiz OS, Tiznado OG. Acción del extracto de *caléndula officinalis* en la formación de hueso alveolar post extracción en conejo. Rev ADM, 1995; 52 (2): 89-94.
206. Scherer W, Gultz J, Lee SS, Kaim J. The ability of an herbal mouthrinse to reduce gingival bleeding. *Journal Clin. Dental* 1998; 9(4):97-100.
207. Lauten JD, Boyd L, Hanson MB, Lillie D, Gullion C, Madden TE. A clinical study: Melaleuca, manuca, *caléndula* and green tea mouth rinse. *Phy Res* 2005; 19(11): 951-7.
208. Barajas FL, Pérez CJ, Arce PE, Fattel FS, Alemán LL, Hernández GS, et al. A dual and opposite effect of *Calendula officinalis* flower extract: chemoprotector and promoter in rat hepatocarcinogenesis model. *Planta Med* 2006;72(3)217-21.

209. Perez CJ, Cruz JG, Licea VJ, Arce P, Fattel FS, Villa TS. Genotoxic and anti-genotoxic properties of *Calendula officinalis* extracts in rat liver cell cultures treated with diethylnitrosamine. *Toxicol In Vitro*, 2002;16(3):253-8.
210. Chiasson RB. *Laboratory Anthomy of the White Rat*. Arizona: WCB; 1985. p. 11-14.
211. Schour I, Massler M. The teeth. En: Farris EJ, Griffith JQ, editors. *The rat in laboratory investigation*. 2<sup>a</sup> ed. New York: Hafner Press; 1949.p.18-20.
212. Teles R, Wang C, Stashenko P. Increased susceptibility of RAG-2 SCID Mice to dissemination of endodontic infections. *Infection and Immunity* 1997; 65(9):3781-3787.
213. *Pharmacopea Helvética*, 1989. Ed. Francesa. Conseil Federal Suisse. Annexe é l'Ordennance du 4 avril 1990 sur la pharmacopée. Ed. Departement Federal de L'Interieur 3003 Berne; 1994.
214. Baratieri L, de Andrada MA, Monteiro S, et al. Restauración de dientes anteriores fracturados En: Baratieri et al. *Operatoria Dental*. Procedimientos preventivos y restauradores. Quintessence 1993; 257-93.
215. Imanishi K, Matsuo T, Nakashi Y, Samejima Y, Ebisu S, Okada H. Clinical findings in relation tooth the success rate of direct pulp camping. *Jpn J Conserv Dent* 1989; 32: 1745-50.
216. Fitzgerald M, Heys RJ. A clinical and histological evaluation of conservative pulpal therapy in human teeth. *Oper Dent* 1991; 16(3):101-12.
217. Louis ZG, Touyz BD, Amsel R. Efectos del té negro (*Camelia sinensis*) en ratas proclives a la caries. *Quintessence* 2003; 16(6): 367-70.
218. Navajas MJ, Mondelo R. Protección del complejo pulpodentinario. En: Canalda CS, Brau EA, editores. *Endodoncia. Técnicas clínicas y bases científicas*. Barcelona; 2006. p. 121-31.

219. Cox CF, Hafe AA, Akimoto N, Outsuki M, Suzuki SM, Tarim B. Biocompatibility of primer, adhesive and resin composite systems on no-exposed and exposed pulps of non-human primate teeth. *Am J Dent* 1998; 11: 55-63.

220 Kopel HM, The pulp capping procedure in primary teeth “revisited”. *J Dent Child* 1997; 64 (5): 327-33.

221. Murray PE, García GF. The incidence of pulp healing defects with direct capping materials. *Am J Dent* 2006; 19 (3): 171-7.

222. Pozzetti GL. Medicamentos homeopáticos: algunas monografías. Riberão Preto: Inst. François Lamasson; 1988.p.100.

223. Thomsom WA. Guía práctica ilustrada de las plantas medicinales. Barcelona: Blume; 1981.p.103.