



FACULTAD DE MEDICINA HUMANA Y CIENCIAS DE LA SALUD

ESCUELA PROFESIONAL DE ESTOMATOLOGÍA

EFEECTO DEL PROPÓLEO Y FORMOCRESOL EN LA
EXPRESIÓN DE LA INTERLEUCINA – 1 BETA (IL - 1 β) DE LA
PULPA DENTAL EN PACIENTES DE 12 A 16 AÑOS, AREQUIPA.

2015

Tesis presentada por el bachiller:

Rayniero Alonzo Manrique Rodríguez

para optar el Título Profesional de

Cirujano Dentista

AREQUIPA – PERÚ

2015

DEDICATORIA

A mis queridos padres, por su amor, trabajo y sacrificio todos estos años, por haberme motivado al estudio, superación personal y por ser mi fortaleza en la vida.

A mis hermanos, que siempre están presentes en todas las metas de mi vida.

A mis abuelitos Alonzo y Carola, que ahora están en el cielo, por su amor incondicional, por haber sido mis segundos padres y por haber querido estar presentes en este día, se los dedico con mucho amor para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores, especialmente a mi asesora Marita Gómez Muñoz, por su paciencia, valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo.

INDICE

Resumen	1
Abstract	2
Capítulo I:	
Introducción	3
Título.....	4
Justificación e importancia.....	4
Problema de investigación.....	5
Área del conocimiento.....	5
Objetivos.....	5
Capítulo II:	
Marco Teórico	7
Propóleo.....	8
Formocresol.....	21
Pulpa Dental.....	30
Interleucina 1-beta.....	46
Antecedentes Investigativos.....	52
Hipótesis.....	58
Capítulo III:	
Metodología	59
Ámbito de estudio.....	60
Tipo y diseño de investigación.....	60
Población y muestra.....	60
Técnicas y procedimientos.....	63
Producción y registro de datos.....	65
Recursos.....	80
Capítulo IV:	
Resultados y discusión	84
Presentación de resultados.....	85
Discusión.....	90
Conclusiones.....	95
Recomendaciones.....	96
Referencias Bibliográficas.....	97
Anexos.....	110

RESUMEN

Entre los fármacos usados en la terapéutica pulpar, el formocresol es el medicamento de elección, pero dados sus efectos colaterales es que se buscan alternativas que logren el objetivo clínico, radiográfico e histológico del tratamiento a lo largo del tiempo. Actualmente, se está optando por productos naturales como el propóleo. Investigaciones científicas le atribuyen numerosas propiedades como: analgésico, antiinflamatorio, regenerador tisular, antioxidante, anticancerígeno e inmunoestimulante. Los objetivos del presente estudio fueron el determinar el efecto del propóleo al 20% en la expresión de la interleucina-1 beta de la pulpa dental, determinar el efecto del formocresol 1:50 en la expresión de la interleucina-1 beta de la pulpa dental y comparar la expresión de la interleucina-1 beta de la pulpa dental frente a la exposición de propóleo al 20% y formocresol 1:50. El grupo de estudio fueron pulpas de piezas dentales sanas de pacientes en edades comprometidas entre 12 y 16 años. Usándose un diseño metodológico de tipo experimental, prospectivo y longitudinal.

Se evidenció que el propóleo al 20% inhibió a la IL-1beta en el tejido pulpar a las 12, 24 y 48horas, mientras que el formocresol en concentración 1:50, agotó de forma total el ARNm de la IL-1beta manifestando su toxicidad.

Concluyendo, que el propóleo es un material biocompatible a nivel genético, puesto que inhibió a la IL-1beta, evidenciando su potencial antiinflamatorio y regulador de la inmunidad.

Los resultados obtenidos fueron procesados en una hoja de cálculo de Excel versión 2013; utilizando para tal fin tablas de simple y doble entrada.

ABSTRACT

Among the drugs used in the pulp therapy, formocresol is the drug of choice, but given its side effects is that alternatives that achieve the clinical, radiographic and histological goal of treatment over time are sought. We are currently opting for natural products such as propolis. Scientific research has attributed many properties as analgesic, anti-inflammatory, tissue regenerative, antioxidant, anticancer and immunostimulating.

The objectives of this study were to determine the effect of propolis 20% in the expression of interleukin-1 beta dental pulp, determining the effect of formocresol 1:50 in the expression of interleukin-1 beta dental pulp and comparing the expression of interleukin-1 beta dental pulp from exposure to 20% propolis and formocresol 1:50. The study group were healthy tooth pulp in compromised patients aged between 12 and 16 years. Being used experimental methodological design, prospective and longitudinal type.

It showed that propolis 20% inhibited IL-1beta in the pulp tissue at 12, 24 and 48h, while the formocresol in concentration 1:50, totally exhausted from the mRNA of IL-1beta expressing toxicity .

It concluded that propolis is a biocompatible material at the genetic level, since inhibited IL-1beta, demonstrating its potential anti-inflammatory and immune regulator.

The results were processed in an Excel spreadsheet version 2013; using for this purpose tables single and double entry.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

1. TÍTULO

Efecto del Propóleo y Formocresol en la expresión de la interleucina-1 beta (IL-1 β) de la pulpa dental en pacientes de 12 a 16 años, Arequipa. 2015

2. JUSTIFICACIÓN E IMPORTANCIA DEL ESTUDIO

Cuando la pulpa dental se ve afectada se liberan citoquinas, siendo la interleucina-1 beta (IL-1 β) una de las más importantes, ya que es un mediador inflamatorio de la pulpa dental, pues estimula la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y a su vez la producción de prostanoïdes de las células pulpares; de esta manera, interviene en los procesos inflamatorios y de curación del tejido pulpar. Es por ello que, altos niveles de IL-1 β podría ser indicativo de magnitud de agresión pulpar y complejidad de la respuesta inflamatoria, ya sea proveniente de bacterias, traumatismos, calor o sustancias químicas usadas en las terapias pulpares; es así que, surge un interés en la odontopediatría hacia la aplicación de fármacos en tratamientos pulpares que demuestren un gran índice de éxito clínico, radiológico e histológico; cuyo objetivo primordial es la ausencia de agresión al tejido pulpar remanente.

Buckley es uno de los pioneros en la aplicación de una droga para tratamientos pulpares. Allá por el año 1904, introduce el formocresol y hasta la actualidad se han venido realizando tratamientos pulpares con éxito clínico y radiográfico. Se ha intentado encontrar un sustituto al uso del formocresol probando diferentes materiales pero sin lograr el porcentaje de éxito clínico que se consigue con éste. También, en los últimos años se han realizado investigaciones que sugieren un efecto citotóxico del formocresol; es así, que se están buscando alternativas en la terapéutica pulpar, inclusive en la medicina natural, como es el caso del propóleo por su gran poder antimicrobiano, antiinflamatorio, anestésico y estimulador de la inmunidad celular.

Por otro lado, la repercusión que tiene la aplicación de formocresol y propóleo sobre la expresión genética en la pulpa dental ha sido muy poco investigada, destacando que la liberación, inducción o inhibición de un gen producto de la estimulación por una droga podría conducir al fracaso o éxito histológico del tratamiento, es por ello, que

se precisa resaltar la importancia de este estudio a nivel genético, particularmente sobre la expresión de la Interleucina 1-beta, citoquina que es inducible no constitutiva, es decir, no está presente en tejido pulpar sano pero se expresa frente a una agresión; por tanto, esta investigación brindará nuevos conocimientos acerca del efecto de estos dos fármacos sobre la expresión de la Interleucina-1 beta de la pulpa dental y su repercusión general en este tejido.

Así mismo, la presente investigación es factible de realizarla porque se cuenta con tiempo, con recursos humanos, materiales, financieros y acceso a los mismos.

3. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto del Propóleo y Formocresol en la expresión de la interleucina-1 beta (IL-1 β) de la pulpa dental en pacientes de 12 a 16 años?

4. ÁREA DE CONOCIMIENTO

- a. Área:** Ciencias de la Salud.
- b. Campo:** Odontología.
- c. Especialidad:** Odontopediatría.
- d. Línea:** Propóleo, Formocresol.
- e. Tópico:** Interleucina-1beta.

5. OBJETIVOS DE INVESTIGACIÓN

Determinar el efecto del propóleo en la expresión de la interleucina-1 beta de la pulpa dental.

Determinar el efecto del formocresol en la expresión de la interleucina-1 beta de la pulpa dental.

Comparar la expresión de la interleucina-1 beta de la pulpa dental frente a la exposición de propóleo y de formocresol.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

1. MARCO TEÓRICO

1.1 Propóleo

El propolis o propóleo es un compuesto resinoso y pegajoso, elaborado por la abeja *Apis mellífera*, a partir de exudados vegetales y mezclado con sustancias salivales. La palabra propolis deriva del griego pro, para o en defensa, y polis, la ciudad, es decir, “defensa de la ciudad (o la colmena)” 50

El propolis es un producto de composición compleja. Las abejas *Apis mellífera* lo obtienen por adición de cera y secreciones salivales al material resinoso, gomoso o balsámico que recolectan de yemas, brotes y heridas de diversas plantas. En la colmena, las abejas utilizan al propóleo con diversos fines tales como: cerrar grietas, reducir al mínimo las vías de acceso, recubrir y aislar restos de animales que se hayan introducido en la colmena evitando su descomposición, consolidar componentes estructurales, barnizar el interior de las celdillas con fines desinfectantes y evitar vibraciones. 50

Se registra que el uso del propóleo por parte del hombre data del año 300 a. de C., época en que ya era utilizado en la elaboración de remedios en la medicina tradicional. Sin embargo, es sólo en los últimos 50 años que se ha realizado la gran mayoría de los estudios tendientes a determinar la composición química, propiedades farmacológicas y en general, el uso farmacológico comercial de los preparados a base de propóleo. 50

Dentro de los productos apícolas, el propóleo se destaca por sus variadas y disímiles propiedades biológicas, lo que ha permitido que en los últimos años se haya incrementado su utilización en fitomedicina y en veterinaria. Es por lo tanto, una materia prima valiosa para la industria farmacéutica, de cosméticos y de alimentos. 50

- **Origen**

Existen dos teorías sobre la procedencia del propóleo elaborado por las abejas. Una teoría dice que es recolectado por las abejas de más de 15 días que, con sus mandíbulas, toman las partículas resinosas que hay sobre las yemas de diferentes plantas como el álamo, sauce, abedul, aliso, castaño silvestre, pino, enebro y algunas plantas herbáceas. Después de sujetar la partícula resinosa, la abeja mueve hacia atrás la cabeza hasta que logra desprenderla, almacenándola con sus patas en los cestitos del polen. Las enzimas de su boca participan también en la operación para evitar su adherencia. Cuando llega a la colmena con la carga, otras obreras le ayudan a descargar el propóleo, misión que llega a durar varias horas. Si el material no es bastante maleable, la abeja recolectora se instala en la piquera, donde espera a que el calor del sol ablande la carga y pueda desprenderse mejor de ella. Los vuelos que realiza la abeja desde la colmena a la planta portadora de resina duran de 15 a 20 minutos, y la época de máxima recolección tiene lugar al final de verano. Otra teoría sobre el origen del propóleo manifiesta que se trata de un producto resultante de la digestión del polen y que se efectúa en un pequeño órgano que la abeja posee entre el buche y el intestino medio. 81

- **Composición**

Las diferencias en la composición están determinadas principalmente por la flora del área ecológica, los ciclos evolutivos de las plantas proveedoras de resinas que condicionan cambios en las concentraciones de las mismas, microorganismos presentes en el entorno geográfico, factores climatológicos, influyendo también las características macroscópicas y organolépticas del propóleo y la técnica de obtención; sin embargo, presenta cualitativamente numerosas sustancias que se encuentran en éste de modo constante y relativamente estable. 51,75

La abeja elabora el propóleo de acuerdo a sus necesidades y probabilidades de fuentes de materia prima, por lo que está demostrado internacionalmente que

será muy difícil encontrar dos colmenas que produzcan propóleos idénticos, aun cuando estén ubicados en la misma zona geográfica. Es más, aún los propóleos de las distintas partes de la colmena no tendrán exactamente la misma composición, pero estas variaciones no están dadas por la diversidad de los elementos que están presentes en su composición que básicamente se mantendrán estables, sino en las cantidades de cada uno de ellos que estarán presentes en cada muestra. 81

En líneas generales en todos los propóleos encontraremos: 81

- Resinas y bálsamos aromáticos 50-55 %
- Cera 7.5-35 %
- Aceites volátiles 10 %
- Polen 4 - 5 %
- Sustancias orgánicas y minerales 5 %

De acuerdo a numerosos estudios, se ha determinado que los constituyentes principales del propóleo son las ceras, resinas, bálsamos, aceites esenciales y polen (además de impurezas mecánicas). La proporción de cada componente es variable y, depende tanto de la época de recolección como del origen vegetal de la resina, así como también de la raza de las abejas que lo produce. 23

- **Composición química del propóleo**

Estudios preliminares realizados por varios investigadores señalan que se ha encontrado mayor porcentaje de compuestos fenólicos en el propóleo que recubre los panales que en el destinado a reducir el ingreso de agentes extraños a la colmena. Se han identificado en el propóleo más de 160 compuestos, 50% de ellos fenólicos a los que se les atribuye acción farmacológica. 6, 7

Revisiones sobre la composición química de propóleo dan cuenta de los siguientes grupos químicos: aldehídos, ácidos y ésteres alifáticos, amino ácidos, ácidos y ésteres aromáticos, chalconas y dihidrochalconas, flavanonas, flavonas,

flavonoides, ácidos grasos, cetonas, terpenoides, esteroides y azúcares. 86

La literatura apunta que el grupo más importante de compuestos encontrado en el propóleo son los denominados fenoles, los cuales, constituyen más del 50% del peso total. Las propiedades médicas del propóleo son atribuidas principalmente a la presencia de estas sustancias. 17

Los flavonoides son pigmentos vegetales, sintetizados a partir del aminoácido fenilalanina, que generalmente exhiben brillantes colores como el de los pétalos de las flores. La mayoría de las veces emiten fluorescencia cuando son excitados por la luz UV, y se localizan en las células de las plantas verdes. Debido a esto, son usados por los botánicos para clasificación taxonómica. Estas sustancias regulan el crecimiento de las plantas e influyen en otras células biológicas de diversas maneras, además, inhiben o destruyen muchas especies bacterianas, inhiben importantes enzimas virales, tales como la transcriptasa reversa y otras diversas proteasas y algunos importantes protozoos. Es así, que estos compuestos fenólicos poseen actividad antialérgica, antiinflamatoria, antioxidante, atrapadora de radicales libres, antimutagénica y moduladora de actividad enzimática. 59

Los flavonoides desempeñan un papel considerable en la terapéutica por sus múltiples funciones fisiológicas, pues al poseer funciones antioxidantes que minimizan la peroxidación lipídica y el efecto de los radicales libres, contribuyen a reducir el riesgo de afecciones cardiovasculares por su acción directa en los capilares sanguíneos y el envejecimiento.^{50, 81} Además, se puede decir que aportan grandes beneficios para la salud al actuar como agentes quimiopreventivos en cáncer. 59

Muchos profesionales están incrementando el uso de flavonoides puros para tratar importantes enfermedades, debido a su comprobada habilidad de inhibir enzimas específicas, simular algunas hormonas y neurotransmisores, y eliminar radicales libres. 59

Los flavonoides y ácidos fenólicos, junto con sus ésteres, se consideran los

principales compuestos bioactivos del propóleo; se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal, en las plantas superiores, en las partes aéreas de las mismas, en capullos y hojas jóvenes especialmente en aquellas con sistema vascular. Son responsables de la coloración de numerosas flores y de ciertas frutas. 81, 73, 26

Según el instituto de Química Orgánica de Moscú, su análisis químico ha arrojado la presencia de un gran número de sustancias minerales y oligoelementos, primordialmente en forma de radicales libres o asociados a formas proteicas, entre los cuales se distinguen: aluminio, bario, boro, bismuto, cobalto, calcio, cobre, cromo, estaño, estroncio, fósforo, hierro, litio, manganeso, molibdeno, níquel, plata, plomo, potasio, selenio, silicio, titanio, vanadio, yodo y zinc. Muchas de estas sustancias desempeñan un papel importante a nivel de numerosas vías metabólicas celulares. 16

Existe otro grupo de compuestos que resultan de fundamental importancia en la actividad biológica del propóleo y en el metabolismo celular, destacando el ácido nicotínico y pantoténico; además de lactosas, polisacáridos y aminoácidos que representan un papel preponderante en numerosas reacciones celulares. En estudios del propóleo se han encontrado, vitaminas C, E, A, B2, B6, B1 Y PP, especialmente B3 o nicotinamida, sustancias de naturaleza proteica, ácidos grasos no saturados y ésteres de ácidos aromáticos, que justifican en parte su gran actividad biológica. 16

- **Características físico-químicas**

El propóleo es un material fuertemente adhesivo .Chaillou y cols, al analizar las propiedades físicas de una muestra de propóleo de Argentina, determinaron lo siguiente: 75, 6

1.- Características organolépticas: 100% presentó estructura homogénea, el

45% presentó un aspecto de trozos irregulares con brillo, el 30 % con poco brillo, y el resto trozos irregulares opacos. Los ensayos de consistencia mostraron que el 45% de las muestras eran poco blandas, el 40% duras y solamente un 15% blandas. Con respecto al color, el 65% de las muestras presentaron color marrón oscuro, un 20% marrón claro con tintes amarillos, un 10% con tintes castaños. El olor del 75% de las mismas fue resinoso, y el sabor de la totalidad de los propóleos fue picante.

2.- Punto de fusión: Su punto de fusión varía entre 60° C a 70° C, llegando en algunos casos hasta 100° C.

3.- Impurezas mecánicas, ceras y resinas: el valor medio de impurezas mecánicas analizadas fue de 24,063%, contenido de cera promedio, de 30,048% y el porcentaje de resinas, 44,770%.

4.- Índices de oxidación: el rango de valores del índice de oxidación osciló entre los 4 y 18 segundos, el promedio fue de 9,8 segundos.

- **Propiedades y actividad biológica**

El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos antiinflamatorios, analgésicos, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos, de regeneración tisular, antioxidantes y anticariogénicas. 74, 87, 103

Ensayos microbiológicos realizados con muestras de propóleo de diferentes sitios de la zona central de Chile, han mostrado una actividad heterogénea, y no se ha mostrado un patrón estable de actividad en las diferentes regiones geográficas, o durante las diferentes épocas del año. Sin duda, esto relata que la actividad del propóleo no solo está relacionada con el metabolismo de las especies botánicas, sino que también con su fenología, término que corresponde al estudio de los

fenómenos biológicos acomodados a cierto ritmo periódico como la brotación, la maduración de los frutos y otros, mostrando que las propiedades específicas de los compuestos son incrementadas cuando el propóleo de diferentes plantas es procesado en una fase específica de su desarrollo anual. 55

Por lo tanto, esto se relaciona con las preferencias de las abejas para la elaboración de propóleo en una estación específica del año. *Apis mellífera* puede detectar, seguramente cuáles son las plantas que se encuentran en un adecuado estado de desarrollo y, de esta manera, determinar cuál especie usar. 55

Además, varios componentes encontrados en el propóleo en otras partes del mundo, con ciertas propiedades protectoras, son volátiles, por lo que podrían ser detectados por las abejas a través de sus antenas o su sistema olfativo. 40, 15, 117

En particular, la actividad biocida del propóleo estudiada frente a bacterias de interés en medicina, ha mostrado resultados alentadores in vitro e in vivo, ya que inhibió el crecimiento de bacterias aerobias y anaerobias, tanto Gram positivo como Gram negativo. Sin embargo, se ha señalado que su efecto en contra de bacterias Gram (+) y levaduras, es mayor que sobre bacterias Gram (-).105

Otros estudios, indican que los efectos bacteriostáticos y bactericidas del propóleo dependen de la dosis y que las bacterias aeróbicas Gram (-) también se inhiben a concentraciones superiores a 2.8 mg/ml. Así pues, los extractos de esta droga natural inhiben significativamente a todos los microorganismos, en especial a las especies de *Actinomyces* pero, durante su almacenamiento disminuyen los contenidos de flavonoides y por tanto también su capacidad inhibidora. 105

Las actividades biológicas de algunos de los más importantes componentes del propóleo son:

Pinocembrina: tiene actividad antibacteriana, fungicida, y utilidad como anestésico local. 87

La Galangina: es uno de los flavonoides que con mayor frecuencia se han encontrado en el propóleo, presenta actividad antimutagénica, antioxidante, secuestrador de radicales libres y modulador de actividad de enzimas

metabólicas, pero se le destaca principalmente por su capacidad antígenotóxica como un potente agente quimioprotector frente al cáncer. Además posee actividad antibacteriana. 67

Acacetina: propiedades antiinflamatorias. Además, recientemente se ha visto que es un poderoso inhibidor de enzimas presentes en el Citocromo P450 (pertenecientes a la familia de las enzimas denominadas CYP1), que estarían involucradas en el metabolismo de los hidrocarburos policíclicos aromáticos y hormonas. Por ello se especula que estas enzimas tendrían un rol importante en la aparición de algunos tipos de cáncer, más aún, que han sido detectadas en algunas muestras de tejidos cancerígenos. 117

Conferido: promisorio agente anticarcinogénico al inducir directamente quinona reductasa y otras enzimas protectoras, sin promover la activación de otros carcinógenos. 67

En Brasil se realizó un estudio para investigar la actividad antibacteriana de propóleo sobre diferentes bacterias orales como *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis* y *Actinomyces naeslundii*. En todas las especies estudiadas se obtuvo inhibición de crecimiento. 95

El propóleo es una fuente natural de antioxidantes, que protegen a los aceites y lipoproteínas séricas de la oxidación. Sus propiedades antioxidantes se deben a su actividad antiradicalaria (radicales alcoxi y, en menor grado, superóxido) y al efecto inhibidor sobre el ión cuproso, iniciador de la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad. 28

También, existen numerosos reportes acerca de la capacidad de intensificar la proliferación epitelial y crecimiento de tejido de granulación. 53

- **Por su origen geográfico**

La composición química del propóleo es sumamente compleja, cada región presenta condiciones de flora diversa, dependiente de fenómenos locales, influenciados por la temperatura, las precipitaciones, el tipo de suelo, la humedad relativa y brillo solar. ⁹⁵

Se ha demostrado químicamente que los exudados de los árboles de tipo Poplar (*Populus alba*), son el principal recurso de propóleo de zonas con clima mediterráneo como la zona norte de Europa, Sudamérica, y oeste de Asia (China). Menos comúnmente, en otras partes del mundo, especies como Bétula, *Ulmus*, *Pinus*, *Quercus*, *Sáliz*, y *Acacia* son utilizadas como recurso para el propóleo. Así mismo, se evidenció que el propóleo cuyo origen botánico es género *Populus*, contiene principalmente fenoles, flavonas y flavonoides en importante proporción (mayoritariamente pinocembrina y galangina), y posee una mayor actividad antimicrobiana que aquellos de origen botánico mixto que contienen derivados de ácidos diperténicos, ácidos grasos hidroxilados o cinamil cinamato. ⁹⁸

- **Mecanismo de acción**

El mecanismo de acción antimicrobiano del propóleo es complejo y no está completamente entendido, la actividad en contra de los microorganismos está más relacionada al efecto sinérgico de los flavonoides (y otros fenoles), que a la acción de cada uno de ellos por separado. En general, la actividad antimicrobiana de este compuesto es más activo contra bacterias Gram positivas que contra bacterias Gram negativas. ¹⁵

Estos descubrimientos están de acuerdo con lo que estudió Takaisikikuni Schilcher, quienes observaron que la acción antibacteriana utilizaba varios mecanismos, tales como la formación de complejos streptocócicos pseudomulticelulares, desorganización del citoplasma, de la membrana plasmática, y de la pared celular, bacteriolisis parcial, e inhibición de la síntesis

de proteínas. Además se observó una inhibición de la división celular en presencia de propóleo, y este hecho sugirió que el propóleo podría actuar inhibiendo la replicación del DNA a través de la RNA polimerasa e, indirectamente, afectando la división celular bacteriana. 35

Su potencial antiinflamatorio ha sido atribuido a la capacidad de estimular la inmunidad celular ya que promueve la actividad fagocítica e inhibición de la síntesis de prostaglandinas, mediadoras de este proceso. Algunos de los componentes fenólicos del própolis, como el ácido cafeico y el éster del ácido fenil-etil cafeico, la quercetina y la naringenina, ejercen efectos antiinflamatorios actuando sobre la producción de eicosanoides, tanto in vitro, suprimiendo la generación de prostaglandinas, leucotrienos y citoquinas en macrófagos peritoneales, como in vivo, en la inflamación peritoneal aguda inducida por la zimosina.

El propóleo por vía oral suprime de forma significativa la vía de la lipooxigenasa en el metabolismo del ácido araquidónico y, el éster del ácido fenil-etil cafeico es, de entre los componentes conocidos del própolis, el modulador más potente de la cascada del ácido araquidónico. Ambos productos disminuyen la actividad de la ciclooxigenasa en macrófagos, medida en función de la producción de prostaglandina E2, y protegen, al tejido cartilaginoso y a los condrocitos humanos, de los daños producidos por la interleuquina-1 β . 80

- **Dosis**

El propóleo presenta un efecto marcadamente mayor frente a bacterias Gram +, con valores de concentración mínima inhibitoria (CMI) entre 0.025 y 10 mg/mL.

33

Para uso externo, se puede administrar ad libitum (a placer). No se han encontrado contraindicaciones.

- **Uso en odontología**

Actividad Anticariogénica:

El potencial anticariogénico del propóleo ha sido demostrado a través de varios estudios los cuales han revelado la reducción de la incidencia de caries y acumulación de placa dental in vitro e in vivo, sugiriendo que existen dos mecanismos asociados con las propiedades anticariogénicas/ antiplaca del propóleo como son la actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas y la inhibición de la enzima glucosiltransferasa. 99

La efectividad antimicrobiana de los extractos depende del solvente empleado, la procedencia del propóleo y de la especie bacteriana evaluada, siendo los extractos etanólicos (EEP) los más efectivos. La composición química del propóleo revela que los componentes farmacológicos activos más importantes son los flavonoides y varios compuestos fenólicos, terpenoides y aromáticos. Entre estos la apigenina (flavonoides) y el tt-farnesol (terpenoides) han demostrado tener las mayores propiedades antimicrobianas contra *Streptococcus mutans*, basados sobre todo en su capacidad de inhibir las glucosiltransferasas y en su efecto bactericida. 99

Actividad anestésica

La actividad anestésica del propóleo ha sido sugerida por Manara y cols, donde señalan que la solución de propóleo al 0,01%, utilizando como solución anestésica es hasta cuatro veces tan efectiva como la procaína al 5%, y de 3 a 5 veces más eficaz que la cocaína, sugiriendo que es un anestésico de superficie con un significativo poder penetrante y pudiendo ser implementado para infiltraciones cutáneas y en tratamientos estomatológicos. Un extracto alcohólico de propóleo al 50% también ha sido usado en el tratamiento de otitis crónica, donde el resultado anestésico fue obtenido en aproximadamente 10 minutos. 99

Uso en Periodoncia:

El efecto que ha tenido el propóleo sobre el periodonto ha sido de gran satisfacción puesto que ha demostrado tener actividad antiinflamatoria, antimicrobiana, anestésica y cicatrizante, en casos de gingivitis crónicas y úlceras bucales recurrentes e inespecíficas; siendo de ayuda para mejorar el tratamiento periodontal, más aún si tenemos en cuenta que la consecuencia fundamental a largo plazo es la pérdida de todos los dientes. Otras investigaciones han reportado que las soluciones de propóleo tienen efecto sobre los gérmenes Gram positivos de la placa supragingival conllevando a una recuperación más rápida, incrementando también la respuesta inmune local. Como agente antiinflamatorio, el propóleo inhibe la síntesis de prostaglandinas, y ayuda al sistema inmune promoviendo la actividad fagocitaria y estimulando la inmunidad celular. 99

Uso en Endodoncia

Hasta el momento se han utilizado diversidad de medicamentos para la irrigación y limpieza del conducto radicular siendo el hidróxido de calcio ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) el tratamiento endodóntico de elección; sin embargo Tellería y cols, emplearon un propóleo acuoso al 22% como tratamiento pulporadicular y lo compararon contra el $\text{Ca}(\text{OH})_2$ observando que a los 21 días del tratamiento, el 82,2% (54/70) de los pacientes tratados con el propóleo acuoso al 22% presentaron sus conductos en condiciones de ser obturados, en contraste con el 85,7% (60/70) tratados con $\text{Ca}(\text{OH})_2$, y a los 28 días del tratamiento el 92,8% (65/70) de los pacientes tenían sus conductos listos para ser obturados sin presentar casos de empeoramiento o alergia al medicamento con respecto al 97,1% (68/70) del grupo control ($\text{Ca}(\text{OH})_2$); indicando que el Propóleo Acuoso al 22% es un producto eficaz en el tratamiento endodóntico ya que sus resultados son similares a los obtenidos con el tratamiento de los conductos radiculares con $\text{Ca}(\text{OH})_2$. 50 De tal manera que el propóleo representa una alternativa de tratamiento, donde el costo por paciente es muy bajo, además que no afecta la coloración del diente, dificultad que se ha presentado con otros productos. 99

En un estudio se comparó los efectos citotóxicos del propóleo en diferentes concentraciones y el hidróxido de calcio sobre fibroblastos de la pulpa dental y ligamento periodontal. Los datos mostraron que el tratamiento de los fibroblastos con concentraciones de 2 o 4mg/ml de propóleo resultó en una viabilidad celular del 75 % a las 20 horas; así mismo el tratamiento de los fibroblastos de la pulpa con 1mg/ml de propóleo resultó en una viabilidad del 90%, indicando que no es citotóxico. 94

Cirugía

El propóleo en cirugía oral ha sido utilizado en heridas quirúrgicas (alvéolos) post extracciones dentarias, realizando experimentos con una solución hidroalcohólica al 10% de propóleo y una solución hidroalcohólica pura aplicados en alvéolos inmediatamente post extracción, evaluando su efecto sobre la epitelización de las heridas y aceleración de la cicatrización post extracción dentaria, encontrando efectos positivos. 99

- **Efectos adversos**

Las reacciones adversas a la aplicación local de propóleo son escasas y se refieren generalmente a reacciones alérgicas de hipersensibilidad de tipo dermatitis de contacto. Se han descrito hasta la fecha un total de 250 casos de alergias por dermatitis de contacto al propóleo. Los reportes generalmente se describen con dermatitis en las zonas palmares y dedos, correspondiente a la manipulación de partes de la colmena que contienen propóleo, o bien, se han visto reacciones alérgicas en la mucosa oral, mucositis orales agudas con ulceraciones, debido a la ingesta de grageas o gotas de esta sustancia natural. 42 El principal agente sensibilizante descubierto en la composición de propóleo corresponde a 3-metil-2-butenil cafeato y feniletil cafeato. Posiblemente existan otros alérgenos no descubiertos a la fecha. 42

1.2. Formocresol

- **Origen**

Buckley en 1904 promovió el formocresol, y afirmaba que partes iguales de formalina y tricresol reaccionarían químicamente con productos intermedia y finales de la inflamación pulpar para formar un “compuesto nuevo incoloro y no infectante, de índole inocua”. 82, 115

En los últimos 20 años se han realizado estudios exhaustivos sobre la eficacia de este medicamento con unos índices de éxito clínico que oscilan entre 70% y 100%. 3

- **Composición química del Formocresol**

La fórmula de Buckley, que es todavía la que se utiliza con mayor frecuencia consiste en tricresol, formaldehído acuoso, glicerina y agua. En los siguientes porcentajes:

19% de formaldehído, 35% de tricresol, en una solución de 15% glicerina y 51% de agua, con un pH aproximadamente 5.1. 12, 104, 100

Los componentes activos del formocresol son el formaldehído y el cresol.

El Formaldehído:

Es un aldehído, el principal componente activo del formocresol. Actúa como agente desvitalizante, además es bactericida porque precipita las proteínas bacterianas, provocando trombosis de los vasos pulpares (isquemia) e interactúa con las proteínas produciendo fijación y evita la autólisis del tejido por su unión con proteínas, interactuando con los grupos de aminas libres. Las reacciones entre el formaldehído y las proteínas son reversibles y los productos son inestables. 25

El contacto con el Formaldehído o sus soluciones puede ocasionar dermatitis en los individuos hipersensibles. Para reducir la irritación se ha utilizado en

combinación con Cresol.

El Cresol:

Es un metil-fenol, compuesto fenólico que se extrae del alquitrán de hulla, además, es un componente activo del formocresol, disuelve la membrana celular cuando está en contacto con los tejidos, altera las proteínas expuestas, disminuye el poder irritante del formaldehído y actúa como antiséptico. 135

La Glicerina y El Agua:

Actúan como vehículo. Además, la glicerina es emulsificador, evitando así, la polimerización del formaldehído y disminuyendo su poder irritante. 135

- **Mecanismo de acción**

El Objetivo fundamental de tratar la pulpa con formocresol es desvitalizar el tejido lesionado y destruir los microorganismos invasores. 34

Se ha comprobado que el formaldehído es el componente del formocresol que interactúa con la fracción proteica de las células. 34

La reacción histológica observada en el tejido pulpar vital después de la aplicación del formocresol depende del tiempo en que es aplicada y la concentración utilizada. 34

Acciones del formocresol: 34

- Fijación con fibrosis progresiva

- Histológicamente se encuentran tres zonas distintas:
 - a) Zona acidófila de fijación, (capa de tejido fibroso acidófilo en la parte más coronal en el lugar de la amputación).
 - b) Zona acelular, con disminución de células y fibras (atrofia).
 - c) Zona de células inflamatorias que va hasta el ápice.
- Bactericida
- No se forma puente dentinario, pero se puede evidenciar cambios de calcificación.

Las torundas de algodón saturadas con el formocresol ocasionan que la superficie de la pulpa se torne fibrosa y acidófila en pocos minutos. La reacción de las pulpas primarias varía desde fijación superficial (5min a 3 días) hasta una degeneración cálcica completa (más de 3 días). 34

El formocresol tiene capacidad momificante; es decir, provoca la desnaturalización de las proteínas de la pulpa radicular (la parte más cercana a la cámara pulpar) propagándose hacia la pulpa más apical, fijando los tejidos. 104 Pashley y Papagiannoulis reportan que las evaluaciones histológicas de pulpas radiculares fijadas con formocresol, revelan zonas de tejido pulpar con inflamación crónica y necrosis. 104

Los vapores del formocresol pasan a través del ápice radicular afectando así el área periapical, además durante el curso de instrumentación la permeabilidad de la dentina se incrementa. 12

- **Propiedades**

Sus principales propiedades son: 12

- Potente bactericida.
- Desinfectante muy poderoso.

- De fácil unión a las proteínas.
- Fijador del tejido pulpar radicular, debido al pequeño tamaño de su molécula.

El formocresol, es el medicamento más utilizado desde hace más de 60 años a nivel mundial, como principal material de fijación pulpar en las pulpotomías de dientes primarios. 12, 54

El área de necrosis que se produce en el tejido pulpar adyacente va disminuyendo conforme va progresando apicalmente el medicamento, Así mismo, la zona de fijación que se produce en aquel lugar donde el fármaco entra en contacto con tejido vital, es un área libre de bacterias, es inerte, resistente a la autólisis y ejerce protección a infiltraciones microbianas posteriores. 106

- **Dosis y Toxicidad**

Existen algunos factores que van a influir en la reacción del tejido pulpar frente al formocresol, tales como: tiempo de aplicación y concentración del medicamento. Por ello, es recomendable utilizar la solución de Buckley que es formocresol puro pero diluyéndolo al 20% (1:5). 100 Se debe aplicar con una torunda de algodón estéril, en contacto con la pulpa radicular durante 5 minutos. 12

Existe cierta controversia en los diversos estudios acerca de la respuesta exacta del tejido pulpar en contacto con formocresol, pero todos los autores parecen coincidir en que el formocresol, no sólo produce fijación del tejido pulpar sino también inflamación y necrosis del mismo.

La activación o no de los macrófagos producida por la droga que se adiciona al medio de cultivo, puede alterar el índice de adherencia y la morfología celular, indicando su potencial citotóxico. 21

Se han realizado estudios en relación a distribución sistémica del formaldehído después de la aplicación tópica del formocresol con efectos potencialmente tóxicos mutagénicos y carcinogénicos. Ranly (1984), revela que el formaldehído

tiene capacidad para interferir con los procesos de replicación celular pudiendo provocar mutaciones. Utilizándose formocresol marcado con C14 se observó que ingresa rápidamente en la circulación sistémica; sin embargo, para provocar efectos adversos sería necesaria su presencia en grandes cantidades. Con todo, el nivel, de formaldehído que se distribuye sistémicamente después del tratamiento pulpar con formocresol no es capaz de producir respuestas mutagénicas o carcinogénicas. 60

Para Lewis (1998), es inconcebible que aún se continúe con el uso del formocresol conociendo sus efectos nocivos para el paciente. Si bien se ha tratado de establecer una formulación menos tóxica, esta no es fiable, teniéndose en cuenta que la misma fórmula original de Buckley la encontró arbitraria y que, por consiguiente, una enorme cantidad de formaldehído también puede ser arbitraria hasta el presente. 60

En un estudio se comparó la reacción inflamatoria del tejido pulpar de dientes pulpotomizados tratados con formocresol y otros fármacos, demostrando que a nivel histológico los dientes pulpotomizados con formocresol presentaron a los 5 días de la intervención un 40% de viabilidad celular, con evidencia de pulpa fibrosa y 60% de necrosis pulpar. 137

Por todas estas consideraciones existen dudas en cuanto a la continuidad del uso del formocresol, permaneciendo abierta la discusión sobre su toxicidad sistémica, mientras algunos investigadores sostienen que serían necesarias más de tres mil pulpotomías simultáneamente para obtener niveles tóxicos de formaldehído, otros más recientemente, afirman que poco menos de dieciséis pulpotomías podrían provocar alteraciones a nivel hepático y renal. 60

Después de la realización de pulpotomías con formocresol marcado con isotopo radioactivo C en animales, hubo reabsorción sistémica del 1% de la sustancia. La

administración sistémica del formocresol de Buckley ocasionó efectos tóxicos agudos en perros, como arritmias cardíacas, descenso de la presión sanguínea, alteraciones enzimáticas, aumento de la bilirrubina en la orina, edema glomerular y neumonitis atípica, entre otros. 77

Se determinó que el formocresol, además de ser tóxico para la pulpa, puede ser tóxico a nivel sistémico afectando otros órganos, cuando se utiliza en múltiples pulpotomías, además de su capacidad para iniciar una respuesta inmune. 77

Paralelamente, también se ha atribuido al formaldehído un potencial mutagénico y carcinogénico. Este medicamento indujo la mutación en células diploides humanas de la línea linfoblástica en cultivo de células, sugiriendo que el formaldehído es carcinogénico y mutagénico en humanos. Evaluando la mutagenicidad de diferentes selladores endodónticos que contenían formaldehído en su composición, se observó que estos producían mutaciones en la salmonella typhimurium. 77

También en estudios del epitelio nasal de ratones y mucosa oral de conejos se demostró que el contacto prolongado con el formaldehído puede producir alteraciones precancerosas y cancerosas. 77

En 1989, la agencia internacional de investigaciones sobre cáncer (IARC) reportó que hay evidencias suficientes en relación a la carcinogenicidad del formaldehído, en animales y humanos. 77

El formaldehído también tiene capacidad mutagénica, induciendo mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas en varios modelos experimentales y por lo tanto debe ser considerado como sustancia de riesgo carcinogénico para seres humanos. En 1992 durante “The Federal Panel Formadeyde”, se concluyó que debido a los incontables experimentos ya realizados en varias áreas, el

formaldehído debería ser considerado como sustancia química con potencial mutagénico y carcinogénico, capaz de inducir mutaciones genéticas, alteraciones cromosómicas y desordenes respiratorios crónicos. 77

La preocupación por los efectos del contacto directo y frecuente a que los anatomistas, técnicos en histología y estudiantes de medicina son sometidos, llevaron a realizar estudios en los cuales se observó que los individuos expuestos a dosis variadas de formaldehído, presentaron mayor riesgo de desarrollar irritaciones en los ojos y tracto respiratorio, además de dermatitis de contacto y efectos tóxicos agudos. 77

La ruptura de ADN es una de las primeras alteraciones que ocurren en las células expuestas a agentes carcinogénicos. Eso ocurre, in vitro, en experimentos con formaldehído, siendo este posiblemente el mecanismo de la carcinogenicidad del fármaco en humanos. 77

En los EUA, el formocresol se encuentra en el comercio especializado en frasco con aviso de precaución “alerta” descrita en su envoltorio, advirtiendo a la población sobre su riesgo de cáncer. 77

- **Uso en odontología**

EL formocresol comenzó a usarse en la estomatología en 1904, ha sido empleado durante muchos años y a pesar de no tener atributos curativos, ha demostrado éxito clínico en tratamientos pulpares alcanzando gran popularidad. Buckley consideró que la pulpa necrótica remanente podía ser fijada con formaldehído y convertida en inocua, añadiéndole tricresol, glicerina y agua para aumentar la solubilidad y difusión del compuesto.

En la Odontopediatría, viene utilizándose desde 1930 como medicamento de elección principal en pulpotomías. Sweet (referido en Lewis y Law) inició el uso clínico del formocresol en tratamientos pulpares de piezas primarias con un índice

de éxito del 97%. 10, 12

- **Efectos adversos**

Se han realizado numerosos estudios clínicos e histológicos para evaluar la respuesta del tejido pulpar al tratamiento con formocresol y se han manifestado diferentes opiniones sobre los resultados obtenidos, que pasan de una presencia de infiltrado inflamatorio a una total fijación de la pulpa y necrosis. 110

- **Efectos Locales Del Formocresol**

La permanencia del formocresol en la región apical es la fuente principal de disputa entre los autores. Algunos creen que ese tejido es pulpa vital, mientras que otros lo identifican como una inserción de tejido conectivo. 37

Investigadores más conservadores aún indican que el formocresol se expandiría por el tejido pulpar y llegaría a los tejidos periapicales, originando serios daños y determinando un progresivo proceso inflamatorio en esa zona pocos minutos después de colocar el formocresol sobre la pulpa radicular. 104

Consecuencias sobre el tejido periapical:

- Irritación
- Inflamación
- Resorción y anquilosis
- Descomposición del tejido pulpar radicular.
- Hipoplasias en dientes sucedáneos
- Aumento de la actividad antibacterial con el tiempo debido a que es altamente tóxico para las células, bloquea la síntesis de proteínas y RNA. 126

El formocresol procedente de una pulpotomía, además de acumularse en la dentina y pulpa radicular, se expandiría también a los tejidos adyacentes llegando a niveles detectables en el cemento, ligamento periodontal y hueso apical, causando daños a la salud periodontal. 37

Existe una relación entre dientes primarios tratados con formocresol y defectos en el esmalte en el permanente, además acelera la exfoliación de los molares primarios tratados. 114

Con respecto a los defectos de esmalte, se reportan más relaciones con dientes primarios infectados, ya que infecciones invasivas provenientes de enfermedad pulpar pueden causar erosión y permeabilidad del folículo dental protector. 114

El proceso inflamatorio periapical de dientes primarios se extiende hasta el capuchón de desarrollo del diente permanente afectándolo durante su etapa pre funcional de erupción. En adición, la exfoliación completa del folículo dental puede ocurrir con inflamación local y supuración. 114

- **Efectos sistémicos del Formocresol**

Se reportaron casos de efectos sistémicos cuando se hacen pulpotomías múltiples bajo anestesia general. 126

La distribución sistémica del formocresol, proveniente de pulpotomías; se ha evidenciado en diferentes estudios realizados en animales, en los cuales se ha observado alteraciones en algunos órganos internos como: hígado y riñón. Lo cual indica tener un potencial para provocar alteraciones sistémicas en humanos. Además, se ha evidenciado que la cantidad de formaldehído circulante se incrementa con el número de dientes tratados. 77

1.3. Pulpa Dental

- **Fisiología Pulpar**

El tejido de la pulpa dentaria remeda al tejido conectivo embrionario y aloja elementos tisulares, células, fibras, nervios, vasos, sustancia fundamental y fibroblastos. Mediante estudios embriológicos se ha demostrado que la pulpa dentaria deriva de la cresta neural cefálica, cuyas células migran hacia la zona de la mandíbula y el maxilar formando los gérmenes dentales. La formación de las piezas dentarias comienza en la sexta semana de vida intrauterina. Se establece una actividad proliferativa y la consecuente formación de las láminas dentales primarias, cada una de las cuales se dispone en una lámina vestibular y otra dental. 19

Numerosas investigaciones han determinado que el desarrollo embrionario de un tejido se produce por la interacción con un tejido adyacente. En el desarrollo dental se producen interacciones epiteliales complejas que han sido ampliamente estudiadas. Las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular dirigen la diferenciación de los ameloblastos y odontoblastos. 19

La pulpa dental está dividida histológicamente en dos zonas bien definidas que han sido denominadas una zona central y otra zona periférica. 19

En general la pulpa presenta homogeneidad en su combinación de células, sustancia intercelular, elementos fibrilares, vasos y nervios. 5, 134

La zona periférica está rodeada por la dentina calcificada. La célula presente en esta zona es la empalizada de odontoblastos, hacia el centro, una zona subodontoblástica, que está libre de células y es denominada zona basal de Weil. Aquí se ramifican plexos capilares y fibras nerviosas pequeñas. Más hacia el centro se encuentra una zona rica en células que forman parte del estroma pulpar. Esta zona está formada por fibroblastos, células no diferenciadas que pueden reemplazar a los odontoblastos diferenciándose y proliferando. 5, 134

La zona pulpar central posee grandes vasos y nervios, fibroblastos, sustancia fundamental y colágeno. 58

Los fibroblastos presentes varían ampliamente en su grado de diferenciación, sintetizan y secretan la mayor parte de los componentes extracelulares como el colágeno y la sustancia fundamental o matriz extracelular que fue demostrado por Weinstock y Leblond 22, y también el fibroblasto no es solo el principal productor de colágeno, sino que también elimina el exceso o participa en su recambio en el tejido pulpar por la resorción de fibras de colágeno. También se encuentran macrófagos, que pueden eliminar bacterias y cuerpos extraños, células muertas y otros residuos. Estas células guardan relación con la vigilancia inmunitaria pulpar. 58, 132, 124, 129

Los neutrófilos no se hallan en pulpas normales, pero cuando hay lesión o muerte, migran con rapidez hacia la zona afectada desde los vasos cercanos a la injuria. Son las principales células de los microabscesos y muy eficientes en fagocitar y destruir bacterias o células muertas. Mediante esta participación, seleccionan células sanas vecinas y puede generarse una inflamación más amplia. 71

La presencia de linfocitos y plasmocitos aparece ante la permanencia de algún irritante ya que estas células se caracterizan por estar presentes en reacciones inmunitarias. 71

Las células cebadas son muy comunes en pulpas inflamadas, Estas células liberan los gránulos que contiene repletos de histamina y heparina hacia el tejido adyacente ante un proceso inflamatorio. La histamina liberada en la zona cercana a los vasos produce vasodilatación, lo que aumenta la permeabilidad del vaso y el líquido y así los leucocitos pueden extravasarse. 41, 133

Los odontoblastos son las principales células formadoras de dentina, cuyo origen está en las células mesenquimatosas periféricas de la papila dental, durante el desarrollo dentario, y los odontoblastos se diferencian adquiriendo su forma y su capacidad de sintetizar y secretar glucoproteínas. Las glucoproteínas forman la

matriz de la predentina, primero a nivel de la unión de esmalte y dentina mediante la formación de vesículas de matriz. 41, 133

La estructura dentinaria puede ser modificada mediante la producción de dentina peritubular. Es un recubrimiento hipermineralizado con poca matriz orgánica en el interior del túbulo que va reduciendo su luz. Cuando el odontoblasto es irritado, éste puede acelerar la formación de dentina peritubular pudiendo llegar a obliterar totalmente el túbulo en el que se encuentra haciendo que disminuya la sensibilidad dentinaria. 41, 133

En otras situaciones clínicas el odontoblasto irritado puede secretar colágeno, material amorfo o grandes cristales, hacia la luz del canalículo, lo que disminuye la permeabilidad dentinaria a los irritantes. 63

Las células dendríticas son células inmunocompetentes de los sistemas y de la piel, linfoides y hemopoyéticas. También se llaman las células interdigitantes, reticulares, y veladas. Funcionan morfológica y fenotípicamente procesando los antígenos o presentándolos a las células T, de tal modo que estimulan la inmunidad celular. 91

La identificación de las células dendríticas pulpares (DCs) ha generado actividades de investigación que han llevado a un concepto de cómo un desafío antigénico puede evocar una respuesta inflamatoria pulpar. Aunque las células dendríticas pulpares no pueden identificar específicamente a los antígenos extraños, proporcionan señales necesarias para activar los linfocitos T, que alternadamente orquestrarán a otras células inmunocompetentes para desplegar la defensa inmune local de la pulpa dental. 91

En un estudio se concluyó, que la inmunoexpresión de células dendríticas está presente en el tejido conectivo pulpar sano, localizándose en zonas estratégicas como la zona odontoblástica y la zona central de la pulpa. La localización específica en una zona determinada de la pulpa por parte de las CD puede ser debida al estado de inflamación. Los procesos de inflamación clínica de grado

irreversible dan lugar a un aumento en el grosor de las fibras colágenas convirtiendo a la pulpa en un tejido fibroso denso, disminuyendo el número de elementos celulares y dando lugar a la presencia de calcificaciones. Lo cual puede conducir a la disminución de CD en el tejido pulpar. 44

Elementos extracelulares de la pulpa dentaria

Fibras y sustancia fundamental o matriz extracelular

Fibras:

La mayoría de las fibras presentes en el tejido pulpar son fibras de colágeno, que forman una estructura reticular laxa para sostener a los elementos estructurales del tejido pulpar. 56

El colágeno es sintetizado y secretado por los odontoblastos y los fibroblastos. El colágeno producido por los odontoblastos luego es mineralizado a diferencia del producido por los fibroblastos, que no calcifica, también se diferencia por el contenido de hidroxilisina. 8

Sustancia fundamental:

Denominada actualmente matriz extracelular, constituye la mayor parte del tejido pulpar y ocupa el espacio entre los elementos formados. Está básicamente constituida por proteínas, carbohidratos, y agua, combinaciones de glucosaminoglucanos tales como ácido hialurónico, condroitín sulfato y otras glucoproteínas. 39, 123

La matriz extracelular de la pulpa dental está compuesta primariamente por colágeno tipo I y III. 125

Esta sustancia es hidrófila, o sea que puede alojar una gran cantidad de agua. El agua no es libre como en otros tejidos, sino que está combinada formando un estado coloidal o de gel que favorece el paso de metabolitos y residuos hidrosolubles a través del medio. La sustancia fundamental puede liberar agua

libre rápidamente en caso de lesión e inflamación. 130

Las propiedades de la matriz extracelular son las que le confieren a cada tipo de tejido conectivo sus características funcionales. Por su resistencia a la tracción y elasticidad, las fibras elásticas son la base de la función mecánica de sostén. Debido a su consistencia y contenido hídrico, la matriz amorfa es el medio de transporte de sustancias entre la sangre y las células de los tejidos, a la vez que amortigua y se opone a las fuerzas de presión. 130

Las glucoproteínas adhesivas presentes en la sustancia fundamental, tales como fibronectina y laminina, fijan las células a la matriz extracelular, actúan sobre la morfología de las células al influir sobre la organización del citoesqueleto y contribuyen a orientar a la célula migrante, tanto durante el desarrollo embrionario como, por ejemplo, en los procesos de cicatrización. 48

La sustancia fundamental rodea y da sustento a las estructuras y es el medio por el cual los metabolitos y productos de desecho son transportados desde las células hacia los vasos. Los principales proteoglicanos en la sustancia fundamental de la pulpa son: ácido hialurónico, dermatán sulfato y condroitín sulfato. 85

El hialuronato, es la sal sódica del ácido hialurónico, y así se denomina a los polisacáridos. El ácido hialurónico formado por unidades de ácido D glucurónico y N acetilglucosamina, es el glicosaminoglicano más abundante del tejido conectivo, y es de gran importancia para la formación de agregados de proteoglicanos. 38 Es producido por la Hialuronato sintetasa (HAS) que está localizada en la cara interna de la membrana plasmática, mientras que otros glicosaminoglicanos son sintetizados en el citoplasma celular, más concretamente en enzimas del aparato de Golgi de la célula. 49

El ácido hialurónico es una molécula de alto peso molecular (cerca de 2.000 kiloDalton). 78

Durante la dentinogénesis, el condroitín sulfato es el principal proteoglicano, sobre todo en la capa de odontoblastos y predentina, ya que participa de la mineralización; al erupcionar el diente, aumenta el ácido hialurónico y el dermatan sulfato y disminuye el condroitín sulfato. 4

El hialuronato tiene una fuerte afinidad por el agua y controla el estado de hidratación. Es un componente importante de la sustancia fundamental en los tejidos con un contenido elevado de fluido, como la gelatina de Wharton del cordón umbilical. Es el mayor componente de las matrices extracelulares, interviene en la regeneración post inflamatoria con actividad específica en la migración de los fibroblastos y la fibrogénesis y el receptor celular mejor conocido para el hialuronato es el CD44. También se sabe que los fibroblastos son los que sintetizan principalmente hialuronato en respuesta a la estimulación con citoquinas tales como Interleuquina 1- β (IL - 1β) y Factor de Necrosis Tumoral α (TNF - α). 4

El contenido hídrico de la pulpa dental es muy elevado, aproximadamente del 90%; así pues, la sustancia fundamental forma un almohadillado que puede proteger a los componentes celulares y vasculares de la pieza dentaria vital. La degradación de la sustancia fundamental se puede producir en ciertas lesiones inflamatorias, caracterizadas por una concentración aumentada de enzimas lisosómicas. Las enzimas proteolíticas, las hialuronidasas y las condroitín sulfatasas de origen lisosomal y bacteriano, son ejemplo de enzimas hidrolíticas capaces de atacar a los componentes de la matriz extracelular. Las vías de la inflamación y la infección están fuertemente influidas por el estado de polimerización de los componentes de la sustancia fundamental. 29

Cuando la pulpa envejece, esta sustancia fundamental se modifica. Estudios morfológicos e histológicos han mostrado que el volumen pulpar se reduce con la edad y que este proceso está acompañado por fibrosis, calcificación, atrofia reticular, pérdida de celularidad y degeneración odontoblástica. 113, 136

Elementos de soporte del tejido pulpar

El riego sanguíneo de la pulpa ha sido descrito por varios investigadores. Como la pulpa es un tejido pequeño, sus vasos no alcanzan un gran tamaño y por el foramen apical ingresan una o más arteriolas que se ramifica en arteriolas más pequeñas o metaarteriolas, surgen anastomosis arteriovenosas y lechos microcirculatorios. 13, 31, 70

Hay una densidad capilar mayor en la zona subodontoblástica. 47 Los capilares desembocan en pequeñas vénulas, que luego salen por el ápice y se comunican con vasos del ligamento periodontal o el hueso alveolar adyacente. 32

El sistema vascular en la pulpa dental juega un rol importante en el aporte nutritivo; de oxígeno y remueve los productos de desecho metabólico. Los elementos celulares de los vasos sanguíneos tales como las células endoteliales, pericitos y células asociadas contribuyen a la homeostasis junto con los nervios.

121

La presencia de linfáticos es discutida, pero algunos autores afirman que se hallan presentes en el tejido pulpar. 65

Los nervios también ingresan por el foramen apical, algunos mielinizados y otros desmielinizados, que son la mayoría y se ha demostrado que éstos reducen el flujo sanguíneo pulpar cuando son estimulados. 68, 38, 122

Los nervios pulpares juegan un rol crítico en la regulación del flujo sanguíneo, en el fluido del flujo dentinario y la presión. 93, 127

También hay evidencia de regulación neuronal de fibroblastos pulpares, inflamación e inmunidad. 14, 69, 79

Además, la inervación pulpar participa de la homeostasis de la misma. La invasión de células inmunes e inflamatorias en el sitio de injuria de la pulpa está estimulada por nervios sensitivos. 45

Las fibras nerviosas pulpares contribuyen en la angiogénesis, extravasación de

células inmunes y regulan la inflamación para minimizar el daño inicial, manteniendo al tejido pulpar y consolidan los mecanismos de defensa pulpar. 79

- **Proceso inflamatorio**

La inflamación es un proceso tisular formado por una serie de eventos moleculares, celulares y vasculares, con el objeto de defender al organismo frente a agresiones químicas, físicas o biológicas a los cuales estamos expuestos permanentemente. Los aspectos básicos que se destacan en el proceso inflamatorio son en primer lugar, la focalización de la respuesta, que tiende a circunscribir la zona de lucha contra el agente agresor. En segundo lugar, la respuesta inflamatoria es inmediata, y por lo tanto, preponderantemente inespecífica, aunque puede favorecer el desarrollo posterior de una respuesta específica. En tercer lugar, el foco inflamatorio atrae a las células inmunes de los tejidos cercanos. Las alteraciones vasculares van a permitir, además, la llegada desde la sangre de moléculas inmunes. 84, 102

En el sitio de la injuria se produce calor y rubor como consecuencia de las alteraciones vasculares que determinan una acumulación sanguínea en el foco. También se produce tumor por el edema y el acumulo de células inmunes, y el dolor es producido por la actuación de determinados mediadores sobre las terminaciones nerviosas del dolor. Clásicamente se denominó a estos cuatro signos de la inflamación como Signos de Celso. 84, 102

Fases de la inflamación: 84, 102

De forma teórica se puede dividir a la inflamación en cinco etapas:

1-Liberación de mediadores, que son moléculas, en su mayor parte son liberadas o sintetizadas por el mastocito bajo la actuación de determinados estímulos.

2-Efecto de los mediadores. Una vez liberadas, estas moléculas producen alteraciones vasculares y efectos quimiotácticos que favorecen la llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio.

3-Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio. Proceden en su mayor parte de la sangre, pero también de las zonas circundantes al foco.

4-Regulación del proceso inflamatorio. Como la mayor parte de las respuestas inmunes, el fenómeno inflamatorio también integra una serie de mecanismos inhibidores tendientes a finalizar o equilibrar el proceso.

5-Reparación. Fase constituida por fenómenos que van a determinar la reparación total o parcial de los tejidos dañados por el agente agresor o por la propia respuesta inflamatoria.

Liberación de mediadores de la inflamación:

La fuente principal de liberación de mediadores de la inflamación es el mastocito. Esta es una célula inmune inespecífica que procede de la médula ósea. El mastocito contiene en el citoplasma gránulos con mediadores de la inflamación preformados. La liberación de mediadores ocurre por distintas causas, pero quizás la más frecuente sea la lesión directa de la célula por el agente agresivo. Cuando la inflamación progresa, se acumulan en el foco suficientes factores activados del complemento, tales como los factores C3a y el C5a que actuando sobre receptores de membrana, inducen la activación del mastocito y la consiguiente liberación de mediadores. Otro mecanismo de activación se desarrolla mediante la Inmunoglobulina E que es captada en la membrana del mastocito, ya que éste presenta receptores para la porción Fc de esta inmunoglobulina (FceR). El antígeno activa al mastocito cuando conecta específicamente con dos Inmunoglobulinas E contiguas sobre la membrana. 64, 72

Los mecanismos bioquímicos que subyacen a este proceso no son aún bien conocidos. Parece que el proceso se inicia en la membrana con activación de adenilciclase y de fosfolipasa A2. La adenilciclase determina un incremento inicial de la concentración intracitoplasmática de adenosinmonofosfato cíclico (cAMP), mientras que la fosfolipasa A2 ataca a los lípidos de membrana produciendo ácido araquidónico. 96

También aumenta la permeabilidad de membrana al Calcio, con lo que se incrementa la concentración de este ión en el citoplasma y la liberación de mediadores al espacio extracelular. Estos mediadores, que se encontraban preformados en los gránulos, son principalmente histamina, enzimas proteolíticas, el factor quimiotáctico del eosinófilo, factor quimiotáctico del neutrófilo y heparina.

64

El ácido araquidónico formado puede seguir dos vías metabólicas, la de la enzima ciclo-oxigenasa que determina la producción de prostaglandinas (PG) y tromboxanos y la de la lipo-oxigenasa que conduce a la formación de leucotrienos (LT). Todas estas sustancias de carácter lipídico, sintetizadas de novo por el mastocito, son un segundo grupo importante de mediadores de la inflamación. 102

El basófilo es una célula preponderantemente sanguínea, que acude a los tejidos durante el proceso inflamatorio y supone un refuerzo en la liberación de mediadores ya que se activa por los mismos mecanismos que el mastocito y libera mediadores equivalentes a los de esta célula. 102

Efecto de los mediadores:

Mediadores preformados

La Histamina es un mediador ampliamente distribuido por el organismo aunque se detecta principalmente en el mastocito y basófilo. Actúa sobre los receptores H1 (histamina 1) de los vasos produce vasodilatación e incremento de la permeabilidad. Cuando la histamina actúa sobre receptores H2 (histamina 2) produce efectos inhibidores o reguladores de la inflamación. 46

De las distintas enzimas proteolíticas liberadas por el mastocito, la más interesante es la kininogenasa que actúa sobre las proteínas procedentes de la sangre y denominadas kininógenos, produciendo su ruptura en péptidos más pequeños denominados kininas. Las kininas inducen vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y estimulan las terminaciones nerviosas del dolor. 47

Los factores quimiotácticos como el ECF-A atraen eosinófilos al foco inflamatorio, induciendo simultáneamente la activación de estas células. El NCF es una proteína con capacidad de atraer y activar al neutrófilo. 111

La heparina al inhibir la coagulación, favorece la llegada al foco inflamatorio desde la sangre de moléculas y células. Es, además, un factor regulador. 111

Mediadores sintetizados de novo

La prostaglandina PGE2 es la más importante en el proceso inflamatorio. Produce vasodilatación y dolor. En coordinación con el factor C5a del complemento y LTB4 aumenta la permeabilidad vascular. 76

LTB4. Es un factor quimiotáctico para eosinófilos, neutrófilos, mastocitos y macrófagos. 76

Factor activador de plaquetas (PAF: Platelets Activating Factor). Este factor tiene varias propiedades. Activa las plaquetas determinando su agregación, con la liberación de mediadores por parte de estos cuerpos e inicio de los procesos de coagulación. Produce además, vasodilatación y aumento de la permeabilidad vascular. Por otra parte, es un potente factor quimiotáctico y activador de neutrófilos. 76

Llegada de moléculas y células inmunes al foco inflamatorio:

Los mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos. En una primera fase inicial, alteraciones vasculares que facilitan el traspaso de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase, más tardía, las propias alteraciones vasculares, así también como la liberación en el foco de factores quimiotácticos, determinan la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes. 102

- **Fase inicial del proceso inflamatorio en general. Llegada de moléculas**

1. Inmunoglobulinas. Los anticuerpos se unen y bloquean a la bacteria y sus toxinas. La Inmunoglobulina M e Inmunoglobulina G activan el complemento por la vía clásica. La Inmunoglobulina G, a su vez, se une a los receptores por la porción Fc (FcR) que presentan los fagocitos en su membrana, potenciando la fagocitosis. 84

2. Factores del complemento. Además de la activación de la vía clásica indicada anteriormente, el complemento se puede activar por la vía alternativa, por productos liberados directamente por la bacteria o elemento agresor. Cuando el complemento, siguiendo una u otra vía, alcanza la vía común produce la lisis del germen o la célula extraña inductora de la inflamación. Los factores C3a y C5a, actuando sobre receptores de membrana, activan al mastocito y basófilo induciendo la liberación de mediadores y amplificando, de esta forma, el fenómeno inflamatorio. El C5a es un potente factor quimiotáctico, mientras que el C3b, uniéndose a receptores de membrana de los fagocitos, potencia la fagocitosis. 46

3. Kininógenos. Sobre estas moléculas actúan las kininogenasas liberadas por el mastocito y basófilo dando lugar a las quininas. 46

4. Proteínas de la fase aguda. Se destacan entre ellas, a la proteína C Reactiva (PCR) que tiene la capacidad de fijar determinados gérmenes y de activar el complemento por la vía clásica. 46

5. Factores de la coagulación. 46

- **Fase tardía. Llegada de células**

El Basófilo contribuye, junto con el mastocito, a la liberación de mediadores. 111

El Neutrófilo es una de las primeras células en llegar al foco inflamatorio. Elimina la bacteria mediante fagocitosis o liberando factores tóxicos que contiene en sus gránulos citoplasmáticos y produciéndole, así, una muerte extracelular. 111

El Monocito/Macrófago procedente de la sangre y de los tejidos cercanos, llegan al foco más tardíamente. El monocito, en los tejidos, se diferencia en macrófago. Esta célula presenta idénticas funciones a las señaladas para el neutrófilo. Actúa además, como célula presentadora del antígeno a las células específicas linfocitos T y B, iniciando, de esta forma, la respuesta específica. 111

El macrófago sintetiza un péptido inespecífico, la Interleuquina 1 (IL - 1), que es una auténtica hormona del Sistema Inmune, ya que pasando a la sangre produce efectos sobre distintas partes del organismo. Determina la aparición de fiebre, probablemente induciendo la síntesis de Prostaglandina E en las células endoteliales que revisten los vasos sanguíneos del hipotálamo; a su vez la Prostaglandina E actúa sobre el centro termorregulador. Sobre la médula ósea favorece la producción y liberación de neutrófilos, con la consiguiente neutrofilia.

111

A nivel local, la Interleuquina 1(IL - 1) activa la proliferación y diferenciación de las células T y B contribuyendo, así a la respuesta específica. También activa la proliferación de fibroblastos y producción de colágeno, fenómenos incluidos en la fase de reparación de la inflamación. 102

Los Linfocitos T y B potenciados por el macrófago inician la respuesta específica. Las células B procedentes de los tejidos linfoides asociados a tejidos o mucosas sintetizan Inmunoglobulina E, que unidas al mastocito o basófilo pueden potenciar la inflamación. Por otra parte, las células T comienzan a producir linfoquinas que prolongan la inflamación en una respuesta inmune más elaborada. El Eosinófilo, es abundante en las infecciones parasitarias, parece además tener una función reguladora en la inflamación. 102

- **Reparación**

Cuando las causas de la agresión han desaparecido o han sido eliminadas por la propia respuesta inflamatoria, se inician los procesos de reparación. Estos procesos integran la llegada a la zona de fibroblastos que van a proliferar y sintetizar colágeno, proliferación de células epiteliales y proliferación de vasos dentro de la herida. 46

- **La reacción de la pulpa frente los irritantes**

El proceso inflamatorio que ocurre en el tejido pulpar es extremadamente complejo. Los cambios inflamatorios en la pulpa dental están acompañados por una amplia variedad de mediadores químicos, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y extravasación leucocitaria que son mediadas por muchos mediadores endógenos (quininas, prostaglandinas y neuropéptidos). 27

En la matriz dentinaria se han detectado varios factores de crecimiento tales como VEGF (Factor Vascular Endotelial de Crecimiento), PDGF (Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas), EGF (Factor de Crecimiento Epidérmico), y FGF-2 (Factor de Crecimiento de Fibroblasto). Estos mediadores se hallan presentes en la dentina luego de una injuria como estímulos mecánicos, químicos o por caries y es probable que desempeñen un papel importante en las respuestas inflamatorias y cicatrización del tejido pulpar dañado. 27

El Factor Vascular Endotelial de Crecimiento (VEGF) es conocido como un factor promotor de la angiogénesis, al igual que FGF-2. Un estudio reciente demostró que IL - 1 α y TNF α aumentan la expresión del gen de VEGF en células de la pulpa dental y fue sugerido que la citoquina pro inflamatoria inducida VEGF contribuye parcialmente a la destrucción de tejido pulpar y periapical. 27

FGF-2 y VEGF se pueden asociar por separado a la reparación tisular y a la progresión de la inflamación a pesar del hecho de que ambas citoquinas

promueven la angiogénesis con la proliferación y migración de células endoteliales. 92

Durante el proceso inflamatorio en la pulpa se produce degeneración de las proteínas de la matriz, y ésta requiere de la actividad de distintas endopeptidasas, enzimas proteolíticas que son indispensables para la degradación de la matriz extracelular, cuyo principal componente es el hialuronato. 92

Autores como O'Boskey y Panagakos propusieron que las citoquinas estimulan la producción de niveles elevados de metalproteinasas de la matriz MMP- 2 y metalproteinasas de la matriz MMP-9 por células de la pulpa humana en cultivos celulares y que esas metalproteinasas de la matriz (MMPs) juegan un rol importante en la inflamación pulpar. 92

Otros autores como Tjaderhane y colaboradores sugirieron que muchas metalproteinasas de la matriz (MMPs) son activadas por ácidos bacterianos y que tienen un rol clave en la destrucción de dentina por caries. 120

A nivel celular, las células linfocitos T son la población celular predominante en pulpa dental inflamada. 57, 66

Generalmente, en lesiones inflamatorias las células T expresan marcador activado de memoria (CD45 RO+ /CD29+) en contraste con su marcador normal CD45RA+ / CD29- . 97

El movimiento de células T activadas desde los nódulos linfáticos al sitio efector está regulado por quimioquinas y moléculas de adhesión. 18

Los linfocitos T se pueden desarrollar a células maduras que expresan marcadores de superficie por cluster de diferenciación (CD) que tienen diferentes funciones. El rol de estas moléculas marcadoras de superficie es importante en el reconocimiento de antígenos y citoquinas. Las células T Helper o ayudadoras son clasificadas en Th1 y Th2 según la producción de citoquinas. Las células T Helper Th1 produce Interferón IFN- γ cuya función es activar a los macrófagos y

Las células T Helper Th2 produce la citoquina IL-4 que es inductor de producción de Inmunoglobulina E por parte de las células B. 2

La presencia de macrófagos, células dendríticas y Linfocitos T indican que la pulpa dental está lista para reaccionar a la invasión bacteriana y otros irritantes.

57

Las células dendríticas son células inmunocompetentes que funcionan morfológica y fenotípicamente procesando los antígenos o presentándolos a las células T, de tal modo que estimulan la inmunidad celular. 57

Algunos estudios sugieren que las células T son las responsables de la regulación de los cambios inmunológicos pulpares bajo la lesión de caries. 57

La inflamación y la reparación son fenómenos interdependientes. No deben considerarse como procesos separados, sino como las fases exudativa (aguda) y proliferativa (crónica) de un mismo proceso: la inflamación. Entre la dinámica de la inflamación pulpar y la periapical existe una variación de entorno. 131

Las células que predominan en la fase aguda son los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), mientras que en la crónica se caracteriza por la presencia de macrófagos, linfocitos, células plasmáticas, fibroblastos, angioblastos y fibras. 131

1.4. Interleucina-1beta (IL-1 β)

La IL-1 se describió originalmente en los años cercanos a 1940 como una proteína termolábil presente en el fluido de exudados granulocíticos de animales o humanos con fiebre. En esa época se le conoció como pirógeno endógeno. Los niveles circulantes de IL-1 se elevan en una variedad de situaciones clínicas y junto con los niveles elevados de TNF e IL-6 correlacionan con la severidad de algunas patologías, debido a su gran actividad proinflamatoria, sugiriendo que estas citocinas participan en la respuesta del huésped para el desarrollo de la enfermedad. La producción de IL-1 en los tejidos contribuye a efectos locales como la fibrosis, rompimiento de tejidos de matriz o al influjo de células inflamatorias. 22

La interleucina-1 es el prototipo de citocina proinflamatoria que induce la expresión de una variedad de genes y la síntesis de varias proteínas que inducen cambios en la inflamación aguda y crónica. Esta interleucina es el mediador de las respuestas de defensa del organismo, sin embargo, cualquiera que sea la situación, la sobreproducción sostenida de esta molécula lleva a la debilidad de las funciones normales del huésped y por lo tanto la reducción en su síntesis o de sus funciones efectoras es el blanco terapéutico de muchas enfermedades.

Inicialmente la IL-1 era un producto derivado de células fagocíticas activadas, sin embargo, varias células nucleadas han demostrado su capacidad de síntesis de esta molécula, entre ellas se encuentran los monocitos sanguíneos, macrófagos tisulares, microglía del sistema nervioso central, astrocitos, células endoteliales, células de músculo liso, fibroblastos, células basales sinoviales, células dendríticas de la piel, queratinocitos, células intestinales y gingivales. También los linfocitos T de la sangre, linfocitos B normales o transformados, células del nódulo linfático, células NK, células placentarias, células sanguíneas de recién nacido y células dendríticas han demostrado la capacidad biosintética de esta molécula.

Existen dos formas bioquímicamente distintas pero relacionadas estructuralmente con la IL-1: la IL- β y la IL-1 α . Entre ellas se tienen únicamente el 26% de homología y son codificadas por genes separados, localizados en el cromosoma 2 y cada gen contiene 7 exones. 22

Las dos formas de la IL-1 se sintetizan inicialmente como precursores de 31 kDa (pro-IL-1). Ninguna de las dos moléculas contiene una secuencia señal que generalmente indica un sitio de rompimiento para enzimas proteolíticas N-terminal. Este hecho hace a la IL-1 como una citocina única, ya que la pro IL-1 es fragmentada por proteasas carboxi-terminal, generando un péptido maduro de 17 kDa. Este péptido de IL-1 α e IL-1 β es la forma activa de estas moléculas. La elastasa, plasmina, catepsina G, colagenasa y serina proteasa son enzimas implicadas en la fragmentación de pro IL-1 β para la génesis del fragmento maduro. 22

Cuando la IL-1 llega a la circulación actúa como una hormona induciendo un amplio espectro de cambios sistémicos en sistemas neurológicos, metabólicos, hematológicos y endocrinos. Esta molécula tiene funciones regulatorias en el proceso inflamatorio. 22

Es un coestimulante de la proliferación de Linfocitos B y progenitores hematopoyéticos. También se ha demostrado que induce la síntesis de mediadores secundarios de activación, llevando a la célula a eventos de proliferación y diferenciación. De esta manera, la IL-1 induce en fibroblastos el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF), en células epiteliales, induce el factor estimulador de colonias monocito-granulocito (GM-CSF), la IL-2 en linfocitos T, la IL-6, IL-8, y TNF α en monocitos/macrófagos. La IL-1 regula la expresión de receptores y otras moléculas de superficie como molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) y molécula de adhesión celular vascular (VCAM) en células endoteliales, IL-2R α en Linfocitos T y en dosis alta induce reabsorción

de hueso y cartílago contrario a dosis baja que promueve proliferación de osteoblastos y síntesis de colágeno. La IL-1 induce síntesis de PGE2 en células sinoviales, en hematopoyesis actúa como un activador temprano de progenitores y en unión con IL-3 e IL-6 estimula la diferenciación de varios linajes. Finalmente, presenta sinergismo con la IL-6 para la síntesis de IL-2 al favorecer la activación de LT, con la IL-4 para activación de LB, y con IL-2 y TNF al aumentar la actividad celular de NK. 90

Diferentes estudios han identificado la presencia de IL-1b en tejido pulpar inflamado. 9, 36

Utilizando técnicas de análisis de ELISA se identificó altas concentraciones de IL-1 β en pulpas inflamadas y en fibroblastos estimulados con LPS de *Escherichia Coli*, contrario a pulpas sanas. 62

La presencia de IL-1 β e IL-6 fue evaluada en FPH estimulados con LPS de *Porphyromonas endodontalis* por ELISA y RT-PCR, encontrándose que la producción de IL-6 era mayor pero independiente a la de IL-1 β . 62 El TNF α y la IL-1 β comparten muchas actividades biológicas. Así como la IL-1 β , el TNF α estimula el crecimiento de fibroblastos y la producción de colagenasa, PGE2 e interferón- β por fibroblastos. El TNF α , también promueve la adhesión de neutrófilos a la superficie del endotelio vascular y favorece la fagocitosis y degranulación. 1

Estudios de inmunohistoquímica indican la producción de TNF α , IL-1e IL-6 a nivel de fibroblastos pulpares humanos (FPH) estimulados con lipopolisacáridos de bacterias gram (-) negativas y mercaptano. 30

Los monocitos y los macrófagos son los productores importantes. La producción de IL-1 puede ser inducida por una variedad de agentes como son los microorganismos, productos microbianos, agentes inflamatorios, lectinas de plantas y antígenos. La IL-1 tiene efectos locales y sistémicos sobre las células inmunocompetentes y otras que participan en las reacciones inflamatorias. Algunos de estos efectos incluyen la activación de linfocitos T, proliferación de linfocitos B y la estimulación de éstos para la síntesis de anticuerpos. También

afecta la quimiotaxis de neutrófilos y células mononucleares y participa en la modulación de la función de las células endoteliales como lo es en la liberación de factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), prostaglandina I₂ (PGI₂), prostaglandina E₂ (PGE₂) y en la síntesis de factor activador de plaquetas (PAF, por sus siglas en inglés). Por acción de la IL-1 se aumenta la actividad del PAF y del factor tisular procoagulante (PCA), también aumenta la adhesión de leucocitos polimorfonucleares (PMN), monocitos y líneas celulares de leucocitos. En respuesta a la estimulación con IL-1, los fibroblastos gingivales y periodontales proliferan y liberan más PGE₂, además la síntesis de colágena y la actividad de la hialuronidato sintetasa aumentan y se estimula la resorción de hueso. 22

La IL-1 y el TNF son inductores potentes de las metaloproteinasas de matriz (MMPs), eicosanoides, oxidasa del óxido nítrico (iNOS), ligando del activador del receptor (RANKL), productos involucrados en la destrucción de la matriz extracelular, cartílago y resorción de hueso. La IL-1 es importante a nivel local y es más potente que el TNF en la estimulación de MMPs e impide específicamente la reparación del cartílago. 22

- **RECEPTORES IL-1**

Los receptores para la IL-1 reconocen igualmente a las formas α y β ψ ya que IL-1 α e IL-1 β disparan a los mismos receptores, algunas regiones contienen los mínimos requerimientos estructurales para su activación. 22

Se han descrito dos tipos de receptores para la IL-1. La proteína p80 llamada IL-1RI (receptor tipo I) y la proteína p68 llamada IL-1RII (receptor tipo II) ambos se encuentran presentes en la superficie de las células. Sus diferencias no solamente residen en que son productos de genes diferentes, sino que tienen diferencias de afinidad en la unión con la IL-1, en la regulación de su expresión, el tipo de señal transducida y su capacidad de ser internalizados, ya que el tipo I

es rápidamente internalizado y permanece en el interior de la célula por 12 horas, en cambio el tipo II permanece en superficie por 60 minutos y es muy pobremente internalizado. 22

El receptor tipo I pertenece a la súper familia de inmunoglobulinas (Igs). Tiene un segmento extracelular que contiene los tres dominios homólogos a la Ig. El segmento extracelular tiene varios sitios para la glicosilación, tiene una sola porción transmembranal de aproximadamente 21 aminoácidos y una región citosólica. Esta última región no tiene homología con las protein-cinasas pero sus residuos serina/treonina son fosforilados tan pronto como la IL-1 se une a los dominios extracelulares. 22

El receptor del tipo II también pertenece a la súper familia de las Ig con tres dominios en su segmento extracelular y con un 28% de homología entre las porciones extracelulares de los receptores tipo I y II. La mayor diferencia entre estos receptores se encuentra en su porción citoplásmica, ya que en el caso del receptor tipo II esta sección es más corta, lo que explica su menor peso molecular y explica las diferencias en la transducción de señales reportadas para este tipo de receptor. 22

La unión de IL-1 al receptor tipo I causa la formación de un heterodímero con una proteína accesoria del receptor (IL-1AcP) y una vez formado este complejo se activa una cinasa, activada por el receptor (IRAK) y la señal se transduce al núcleo de la célula a través de otras cinasas (TRAF 6, P1,3 cinasa, IκB, MEKK y p38 MAPK). 22

- **Interleucina 1 Receptor antagonista (IL-1 Ra)**

En 1983 antes de la clonación de IL-1 se sospechaba de la existencia de un inhibidor potencial de la IL-1, ya que en pacientes con altas temperaturas y con enfermedades debilitantes o crónicas como artritis reumatoide o artritis juvenil no presentaban evidencia de actividad biológica de IL-1 en orina o suero. Este hecho

llevó a la hipótesis de que la IL-1 debe estar enmascarada por moléculas inhibitorias. Posteriormente, en 1987, de la orina de pacientes con leucemia monocítica se aisló una molécula que bloqueaba específicamente las acciones de la IL-1 sin afectar la función del TNF. A esta molécula se le identificó como el receptor antagonista de IL-1 o IL-1Ra. 22

La IL-1 receptor antagonista (IL-1Ra) es una glucoproteína de 22 KDa que inhibe la unión de la IL-1 a su receptor sobre células T, leucocitos polimorfonucleares y linfocitos B. Esta molécula tiene 19% de similitud en su composición de aminoácidos con la IL-1 α y un 26% de similitud con la IL-1 β . A pesar de esta semejanza estructural no tiene actividad de antagonista. La unión de IL-1Ra inhibe competitivamente al receptor, previniendo la formación del heterodímero (con IL-1AcP) y consecuentemente la transducción de la señal al núcleo. Sin embargo, es importante notar que la afinidad de la unión de IL-1Ra al receptor de tipo I de IL-1 es mucho más fuerte que la misma IL-1. 22

Existe otro tipo de modulación de la IL-1 que depende de los receptores tipo II, recordando que éstos tienen un segmento citoplásmico corto que funcionan como “señuelo” ocasionando una disminución de la cantidad de IL-1 disponible para unirse a su receptor tipo I. Los receptores tipo II son fragmentados de la superficie celular en forma soluble y se unen a la IL-1 en solución, previniendo que esta citocina alcance a su célula blanco. 22

Por lo tanto, la actividad de la IL-1 está conferida con dos proteínas relacionadas IL-1 α e IL-1 β ambas se unen a receptores llamados tipo I y tipo II. El receptor tipo I (IL-1RI) es responsable de la señalización específica, mientras que el receptor tipo II funciona como un receptor señuelo que no causa estimulación celular. 22

En 1991 se describió que en el fluido gingival crevicular de pacientes con enfermedad periodontal marginal inhibidores de la IL-1 β (que no es IL-1Ra) con pesos moleculares de 10-14 kDa y otro con un peso molecular de 10 kDa sugiriendo que existen otros mecanismos de modulación de esta citocina que

2. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

A. Antecedentes Internacionales

Barkhordar, RA; Ghani, QP; Russell, TR; Hussain, MZ: "LA INTERLEUCINA-1 BETA Y LA ACTIVIDAD DE SÍNTESIS DE COLÁGENO EN FIBROBLASTOS DE LA PULPA DENTAL HUMANOS", USA. 2002. 9

La interleucina-1 beta (IL-1beta) se reconoce como un factor clave en la mediación de la respuesta inmune celular. En este estudio, se midió el contenido de IL-1 beta y su efecto sobre la síntesis de colágeno en cultivos de fibroblastos derivados de pulpas dentales sanas y enfermas. Se encontró que los fibroblastos de la pulpa enferma contienen 2,5 veces mayores cantidades de IL-1beta y sintetizan 80% mayores cantidades de colágeno en comparación con fibroblastos de pulpa sanos. Sin embargo, IL-1 beta exógena no pudo estimular la síntesis de colágeno por los fibroblastos enfermos, mientras que la síntesis de colágeno por los fibroblastos de pulpa sanos fue estimulada por más de 2 veces. Estas observaciones implican que la enfermedad pulpar induce anormalidades asociadas con la respuesta de fibroblastos hacia IL-1 beta.

Silva, AC; Faria, MR; Fontes, A; Campos, MS; Cavalcanti, BN: "LA INTERLEUCINA-1 BETA E INTERLEUCINA-8 EN LA PULPA DENTAL SANA E INFLAMADA", SAO PAULO. BRAZIL. 2009. 108

Se trabajó con Veinte pulpas dentales, estas fueron obtenidas a partir de los terceros molares sanos (n = 10) y desde pulpectomías (n = 10), también se utilizó inmunohistoquímica, un medio para la extracción de proteínas y ensayos de ELISA. Se obtuvieron fibroblastos a partir de pulpas dentales saludables, estimulados o no por Escherichia coli lipopolisacárido (LPS), con el fin de simular la agresión en los

cultivos celulares, también se obtuvieron y analizaron fibroblastos por el método de ELISA para obtener información de la IL-1 beta y IL-8. Se concluyó que las pulpas inflamadas presentan valores elevados de IL-1 beta y IL-8 y que los fibroblastos de células pulpares estimuladas por lipopolisacáridos (LPS) bacterianos producen niveles más altos de IL-1 beta y IL-8 que el grupo de control.

Hosoya, S; Matsushima, K; Ohbayashi, E; Yamazaki, M; Shibata, Y; Abiko Y: “LA ESTIMULACIÓN DE INTERLEUCINA-6 INDEPENDIENTE A LA PRODUCCIÓN DE INTERLEUCINA-1 BETA EN LA PULPA DENTAL HUMANA”, JAPAN. 1996. 62

La producción de interleucina (IL) -1beta e IL-6 en las células humanas de pulpa dental (HDP) en respuesta al lipopolisacárido (LPS) no ha sido bien caracterizado. En este estudio se examinó la IL-1 beta e IL-6 de las células humanas de la pulpa dental que fueron estimuladas con lipopolisacáridos (LPS) de endodontalis *Porphyromonas*, que es una bacteria Gram-negativa que se encuentra en los conductos radiculares. Los resultados muestran que cuando las células humanas de la pulpa dental fueron estimuladas con lipopolisacáridos (como sucede en la infección de la pulpa dental), hay producción de IL-6 e IL-1 beta; sin embargo, la producción de IL-6 siempre precedió a la de IL-1 beta. Se concluyó que la IL-6 fue independiente de la molécula de IL-1 beta en las células estimuladas con (LPS).

Chang, MC; Hung, HP; Lin, LD; Shyu, YC; Wang, TM; Lin, HJ; Chan, CP; Huang, CC; Jeng, JH : “EFECTO DE LA INTERLEUCINA-1B EN LA EXPRESIÓN DE ICAM-1 DE LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL: PAPEL DE LA VÍA PI3K/AKT, MEK/ERK, Y LA CICLOOXIGENASA”, TAIWAN. 2014. 24

En este estudio las células de la pulpa dental humana fueron tratadas con IL-1 β y co-incubadas con LY294002 (un inhibidor de PI3K/Akt), U0126 (inhibidor de MEK / ERK), la aspirina (un inhibidor de la COX), o el eugenol (un inhibidor de la COX) para diferentes períodos de tiempo. La expresión de ICAM-1, IL-1RI, y el ARN mensajero

de IL-1RII (ARNm) se evaluó mediante la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR). Los resultados ponen en manifiesto que la IL-1 β puede estar implicada en los procesos inflamatorios pulpaes mediante la estimulación de la ICAM-1. Estos eventos están asociados con la activación de la expresión de IL-1RI y de PI3K / Akt y MEK / ERK y COX.

Cardoso, María L; Alvares, Mirta A; Aguirre, María V; Brandan, Nora; Lucas, Gabriela V: "EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACCIÓN DEL FORMOCRESOL SOBRE LA ACTIVIDAD FAGOCITARIA, NECROSIS Y APOPTOSIS EN MACRÓFAGOS MURINOS", ARGENTINA. 2005. 21

Este trabajo estudió el perfil de respuesta, in vitro de macrófagos murinos a diferentes dosis del formocresol (1:10; 1:50; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:5000), analizando la viabilidad, el índice de adherencia, la morfología y la cuantificación de necrosis y apoptosis. Se demostró que: La viabilidad de los macrófagos en cultivo, se mantienen hasta las 2 horas, a partir del cual descienden alcanzando los valores mínimos a las 24 horas. Cuando se incubaron los macrófagos a concentraciones de formocresol (1:10; 1:50; 1:100; 1:500; 1:1000; 1:5000) la viabilidad se vio afectada con la mayor concentración de la droga. El índice de adherencia que marca la bioactividad de los macrófagos fue mayor entre 15 y 30 segundos entre las diferentes diluciones testadas, siendo más sensible en 15 segundos. A mayor concentración de formocresol (1:10) se produjeron los mayores porcentajes de necrosis, disminuyendo en función de la dosis, pero siendo significativa hasta la última dilución. Cuando se identificó apoptosis, esta alcanzo su máximo porcentaje entre diluciones de 1: 50 – 1:100, disminuyendo progresivamente con concentraciones más diluidas. El efecto del formocresol en la bioactividad del macrófago es concentración y tiempo - dependiente.

Tinoco Cabriales, Vc; Quesada Castillo, Ja; Maldonado Ramírez, Ma; Oliver

Parra,R;Luna Gojon, Ba : “MUERTE LEUCOCITARIA POR TOXICIDAD DEL PROPÓLEO”, MÉXICO. 2013. 119

Evaluaron el propóleo en dilución 1:4 aplicado a leucocitos polimorfonucleares durante 1-2 horas, observándose muerte celular en un 70%; dando significancia estadística. Finalmente, se debe recordar que los experimentos realizados son in vitro y que al interactuar in vivo los elementos implicados en el experimento podría ocurrir un efecto Buffer del organismo, ya que al diluirse el propóleo en el sistema humano puede minimizar el efecto tóxico hacia los linfocitos polimorfo nucleares más no así su efecto bactericida y antiinflamatorio.

González Rodríguez, Walkyria Del Carmen; Corona Carpio, Marcia Hortensia; Martínez Ramos, Mayra Raquel;García Milanés, Marylena ; Núñez Antúnez, Leonardo : “PULPOTOMÍAS DE MOLARES TEMPORALES EN PULPAS MUERTAS CON TINTURA DE PROPÓLEOS AL 10%”, LA HABANA. 2007. 53

Se realizó un ensayo clínico en niños de 4 a 10 años que presentaron molares temporales con muerte pulpar, los cuales acudieron a la Clínica Estomatológica Provincial de Santiago de Cuba entre septiembre del 2005 y septiembre del 2006, con el objetivo de demostrar la eficacia de la tintura de propóleo al 10% en pulpotomías (necropulpotomías). Se conformaron 2 grupos de tratamientos de 26 pacientes cada uno: en el grupo A se empleó tintura de propóleo al 10% y en el B el formocresol. Los pacientes se evaluaron a los 7, 15 y 30 días, sin observarse diferencias ni reacciones adversas. Se concluyó, que la tintura de propóleo al 10% en las pulpotomías, resultó ser tan eficaz como el formocresol, por lo que se recomienda incluir en tratamientos endodónticos esta nueva terapéutica.

Cardoso, Maria L; Alvarez, Mirta A; Aguirre, Maria V; Lucas, Gabriela V; Brandan, Nora C: “EFECTO, IN VITRO, DEL FORMOCRESOL Y EL SULFATO FÉRRICO SOBRE MACRÓFAGOS PERITONEALES MURINOS”, ARGENTINA. 2006. 20

Se utilizaron ratones isogénicos Swis CF1 (26-28g.), mismos que fueron mantenidos con dieta estándar y agua. Las concentraciones finales de formocresol fueron 1:10, 1:100 y 1:1000, en tanto que la dosis del sulfato férrico fue de 1:100, 1:1000 y 1:10000. En el estudio, el formocresol no produjo la necrosis total de las células, sus valores de viabilidad en la mayor concentración (1:10), dieron como resultado un 65% de células viables. Con el sulfato férrico se registró, en la concentración 1:100 un 11% de células apoptóticas. Los resultados que se obtuvieron en este estudio demuestran que ambas drogas producen alteraciones en la bioactividad macrofágica. Sin embargo, el formocresol causó una mayor respuesta inflamatoria, una menor viabilidad celular y una mayor necrosis celular en comparación con el sulfato férrico.

B. Antecedentes Nacionales

Mayta-Tovalino, F; Sacsquispe-Contreras, S; Ceccarelli-Calle, J; Alania-Mallqui, J: "PROPÓLEO PERUANO: UNA NUEVA ALTERNATIVA TERAPÉUTICA ANTIMICROBIANA EN ESTOMATOLOGÍA", LIMA. 2012. 89

En el artículo se hace una revisión bibliográfica de las propiedades del propoleo y se concluye, que al evaluar in vitro la acción antibacteriana del extracto etanólico del propóleo, éste presenta cierto efecto antibacteriano atribuido a los flavonoides, flavonas y demás compuestos que están presentes en su composición. La composición del propóleo varía según el lugar de origen, influenciada por la dieta de las abejas lo que a su vez influye en el efecto antibacteriano.

Solórzano Vigilio, Deyssi Guissela: "ESTUDIO COMPARATIVO IN VITRO SOBRE EL EFECTO ANTIBACTERIANO DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO, PARAMONOCLOROFENOL ALCANFORADO E HIDRÓXIDO DE CALCIO EN NECROSIS PULPAR", HUÁNUCO. 2011. 112

El presente estudio fue realizado en el Centro de Salud Potracancho - Clas Pillco Marca de Cayhuayna de la ciudad de Huánuco entre los meses de enero a marzo del

2011, para el cual se tomó 32 muestras de pulpas dentales con diagnóstico de necrosis pulpar, en las que se encontraron *Streptococos mutans*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococos* y *Fusobacterium* luego se sometió a cada muestra a la actividad del extracto acuoso de propóleo, al hidróxido de calcio y al paramonoclorofenol alcanforado. Para las muestras sometidas al extracto de Propóleo, se observó a los 7 días un leve incremento en el nivel de sensibilidad 65.6% y el 34.4% se mostraron resistentes. Para el caso del Paramonoclorofenol Alcanforado, a los 7 días existe un incremento leve en el nivel de sensibilidad 34.3%, y el 65.6% fueron resistentes. Frente a la exposición con Hidróxido de Calcio, se evidencia a los 7 días un incremento considerable de sensibilidad 71.9% y el 28.1% fueron resistentes. Se concluyó, que a los 7 días todos los medicamentos incrementaron su nivel de sensibilidad, en el siguiente orden, es decir, el Hidróxido de Calcio en primer lugar, el Extracto Acuoso de Propóleo y finalmente, el Paramonoclorofenol Alcanforado.

Rodriguez Chávez, Miguel Ángel: "ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE CUATRO SOLUCIONES DEL EXTRACTO DE PROPÓLEO EN BACTERIAS ANAEROBIAS FRECUENTES EN NECROSIS PULPAR CON REACCIÓN PERIAPICAL", LIMA. 2007. 101

En la presente investigación se utilizó la solución de extracto de propóleo de 50ug, 100ug, 200ug y 500ug sobre bacterias anaerobias como *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella melanogenica*, *Peptostreptococcus anaerobius* y *Actinomyces odontolyticus*, obteniendo formación de halos inhibitorios. Al aplicar la soluciones del extracto de propóleo de 50ug/10uL sobre *Porphyromona gingivalis*, *Prevotella melanogenica*, *Peptostreptococcus anarobius* y *Actinomyces odontolyticus* se formaron halos inhibitorios mínimos (6-8mm) teniendo en cuenta el tamaño del disco (6mm), y comparándola con las otras soluciones cuyos diámetros fueron mayores. Con esto determinamos, que la solución de extracto de propóleo a 50ug posee actividad inhibitoria mínima.

C. Antecedentes Locales

Mauricio Caro, Mónica del Rosario: "EFECTO IN VITRO DEL PROPÓLEO Y DEL FORMOCRESOL EN LAS CÉLULAS DE LA PULPA DENTAL EN PACIENTES DE 3 A 5 AÑOS, CIRCA-MAS", AREQUIPA. 2009. 88

En el estudio se trabajó con piezas dentarias con diagnóstico de pulpitis irreversible, la pulpa dental se extrajo con tiranervios.

Se determinó que la dosis fisiológica del propóleo para células pulpares es de 10ul al 20%. Se conformaron tres grupos: propóleo al 20%, formocresol, y el grupo control; y se hizo el postest a las 0, 24 y 48 horas para determinar la viabilidad celular. Se determinó que el propóleo generó la máxima viabilidad celular a las 48 horas que fue de 98.12% y de 94.29% a las 24 horas, mientras que la mayor viabilidad celular del formocresol fue de 88.33% a las 0 horas, observándose una disminución significativa de la viabilidad a las 24 y 48 horas de 38.75% y 14.23% respectivamente.

3. HIPÓTESIS

Dado que el propóleo posee efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos, de regeneración tisular, antioxidantes y anticariogénicas. Por otro lado, al formocresol se le atribuye un efecto bactericida, de deshidratación en los tejidos pulpares con disolución de las membranas celulares. Además, siendo la Interleucina 1 beta (IL -1 β) un mediador importante de la respuesta inflamatoria.

Es probable que en el tejido pulpar el Formocresol presente una mayor expresión de IL-1 β en comparación con el Propóleo al 20%.

CAPÍTULO III: METODOLOGÍA

1. ÁMBITO DE ESTUDIO

La investigación se llevó a cabo en el Instituto de Biotecnología del ADN, Uchumayo.

2. TIPO Y DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

A. Tipo de Estudio:

Experimental, puesto que se aplicó propóleo y formocresol sobre la pulpa dental, para determinar los niveles de expresión de la IL-1 β .

B. Diseño de Investigación:

De acuerdo a la temporalidad: Es Longitudinal, porque se obtuvo información en tres tiempos, 12, 24 y 48 horas de aplicados los estímulos.

De acuerdo al lugar donde se obtendrán los datos: Laboratorial, puesto que la muestra obtenida fue llevada al laboratorio, en el cual se le aplicaron dos estímulos para determinar el nivel de expresión de la IL-1 β de la pulpa dental.

De acuerdo al momento de recolección de datos: Prospectiva, porque la información se recolectó después de la planeación.

De acuerdo a la finalidad investigativa: Comparativa, dado que se pretendió precisar diferencias y/o semejanzas entre el Propóleo y el Formocresol frente a la expresión de la IL-1 β de la pulpa dental.

3. UNIDAD DE ESTUDIO

Pulpa dental de piezas dentarias sanas.

4. POBLACIÓN Y MUESTRA

A. Población de estudio: La población estuvo constituida por el total de piezas dentarias de pacientes con dentición permanente completa que acudieron a la Clínica particular "ZONERISAS"

B. Muestra: Se trabajó con una muestra, cuyo tamaño se determinó mediante la siguiente formula:

$$n = \frac{Z_{\alpha} \sqrt{2 \times P(1-P)} + Z_{\beta} \sqrt{P_1(1-P_1) + P_2(1-P_2)}}{(P_1 - P_2)^2}$$

Donde:

Z_{α} : 1.96 ($\alpha = 0.05$)

Z_{β} : 0.842 ($\beta = 0.20$)

P_1 : Tamaño del efecto esperado para el Propóleo

P_1 : 94.29% de viabilidad celular = 0.9429 (antecedentes investigativos)

P_2 : Tamaño del efecto esperado para el Formocresol

P_2 : 38.75% de viabilidad celular = 0.3875 (antecedentes investigativos)

$P_1 - P_2 = 0.5$

$P = \frac{P_1 + P_2}{2} = 0.5554$

Reemplazando:

$$n = \frac{1.96 \times \sqrt{2 \times 0.6652(0.3348)} + 0.842 \times \sqrt{0.9429(0.0571) + 0.3875(0.6125)}}{0.30846916}$$

$$n = \frac{1.96 \times \sqrt{0.44541792} + 0.842 \times \sqrt{0.29118334}}{0.30846916}$$

$$n = \frac{1.3080967 + 0.4543549}{0.30846916}$$

n= 6

Indica que el tamaño de la muestra fue de 6 pacientes para obtener 6 muestras de tejido pulpar, sin embargo por razones de factibilidad se añadió una muestra más para el estudio; es decir, se trabajó con 3 muestras pulpares tanto para el grupo del propóleo (12, 24 y 48 horas) como del formocresol (12, 24 y 48 horas), y 1 muestra para el grupo control.

La selección de la muestra fue probabilística (aleatoria simple).

a. Criterios de Inclusión:

Piezas dentales de pacientes en edades comprendidas entre 12 a 16 años.

Piezas dentales sanas número 1.4; 1.5; 2.4; 2.5; 3.4; 3.5; 4.4; 4.5 de pacientes con necesidad de exodoncias por tratamiento ortodóntico.

Pieza dental de pacientes de ambos sexos.

Piezas dentales con estadio de Nolla 10.

Piezas dentales completamente erupcionadas.

Piezas dentales sin alteraciones de la estructura dentaria.

Piezas dentales sin fluorosis.

Piezas dentales sin alteración del tamaño y forma.

b. Criterios de Exclusión:

Piezas dentales de pacientes con lesiones cariosas.

Piezas dentales de pacientes con diagnóstico de pulpitis.

Piezas dentales de pacientes con requerimiento de tratamiento endodóntico.

Piezas dentales con problemas periodontales.

Piezas dentales de pacientes poco colaboradores.

Piezas dentales de pacientes que presenten enfermedades sistémicas.

Piezas dentales con antecedentes de traumatismo dental.

Piezas dentales erupcionadas con ápice abierto.

Piezas dentales con alteraciones de forma y estructura.

5. TÉCNICAS Y PROCEDIMIENTOS

a. Definición operacional de variables

<i>Variable</i>	<i>Indicadores</i>	<i>Naturaleza</i>	<i>Escala</i>	<i>Tipo de variable</i>
Propóleo	Extracto de propóleo (50ul) al 20%	-	-	Estímulo
Formocresol	1:50 (50ul)	-	-	Estímulo

Expresión de la IL-1 β	Pares de Bases (pb)	Cuantitativa	Razón	Respuesta
------------------------------	---------------------	--------------	-------	-----------

b. Técnicas e instrumentos de recolección

Variable	Técnica	Instrumento
Propóleo	Observación experimental (transiluminador)	Ficha de recolección de datos: ficha de observación experimental
Formocresol		
Expresión de la IL-1b		

6. PRODUCCIÓN Y REGISTRO DE DATOS

6.1. Procedimientos para la recolección de datos

A. Obtención del Extracto del Propóleo.

Extracto de Propóleo al 20%:

Preparación de Propóleo al 10%, se tomó 10gr de la materia vegetal pulverizada (Propóleo) y se llevó a un equipo de extracción a reflujo, donde se agregó 100ml de etanol a 70°GL durante 4 horas a 60°C, sin que incidiera la luz en el extracto.

Posteriormente se enfrió y se filtró el extracto. Luego fue llevado a un matraz, donde se añadió 100ml de alcohol de 70°GL

Preparación al 20%: Se colocó en un tubo eppendorf 1ml del extracto al 10% y se puso en la máquina Temp-block module Heater para poder concentrar la dosis, mediante evaporación del contenido de etanol, hasta llegar a la mitad del volumen colocado o sea 0.5ml.

B. Medios de cultivo y soluciones.

DMEM “Medio de Eagle modificado por Dulbecco”: El medio DMEM es una modificación de medio Basal Medium Eagle (BME), contiene 4 veces la concentración de aminoácidos y vitaminas. Su modificación permite la aplicación en gran variedad de células. Entre sus componentes se encuentra la glucosa, piruvato de sodio, bicarbonato de sodio, L-Glutamina.

Suero bovino al 10%: Es un medio universal aplicable para el cultivo y proliferación in vitro y en la producción biológica de células animales. Entre sus principales componentes se encuentran proteínas, enzimas, factores específicos de desarrollo celular, lípidos, minerales, inactivantes de materiales tóxicos.

Gibco® Antibiotic-Antimycotic: Se utiliza para prevenir la contaminación bacteriana y fúngica. Esta solución contiene 10.000 unidades / ml de penicilina, 10.000 g / ml de estreptomicina, y 25 g / ml de Anfotericina B.

ARN later: Cumple la función de estabilizar y proteger el ARN con inmediata inactivación de las ARNasas.

Buffer fosfato salino (PBS): Solución acuosa y salina que contiene cloruro sódico, fosfato sódico, cloruro de potasio y fosfato de potasio, es uno de los buffers más utilizados porque es isotónico es decir, la concentración de soluto es igual dentro y fuera de la célula, además no es tóxico para las células. Se utiliza para diluir sustancias utilizadas para el cultivo y para lavar los recipientes que contienen células.

Buffer lysis: Permite romper células, romper las estructuras de la membrana celular y liberar los ácidos nucleótidos, contiene tiocianato de guanidina, una sal caotrópica capaz de proteger el ARN de ARNasas endógenos.

Beta mercaptoetanol: Se emplea en el aislamiento de ARN para eliminar proteínas conocidas como ribonucleasas (desnaturalizar ribonucleasas) liberadas durante la lisis celular. La acción del betamer-captoetanol es desnaturalizar irreversiblemente estas moléculas, lo cual previene la digestión del RNA durante el procedimiento.

Buffer TE: Es un tampón (Tris) de pH común 7.5 y EDTA, mantiene el pH de la solución estable, permite solubilizar el ADN o ARN mientras que lo protege de la degradación.

Proteinasa K: Enzima usada para digerir las proteínas y eliminar la suciedad de las preparaciones de ácido nucleico. La adición de proteinasa K a preparaciones de ácido nucleico inactiva rápidamente las nucleasas que de otro modo podrían degradar el ADN o ARN durante la purificación. Es muy adecuado para esta aplicación ya que la enzima es activa en presencia de productos químicos que desnaturalizan las proteínas, tales como agentes quelantes como EDTA, así como la tripsina.

Etanol al 99.9%: Precipita los ácidos nucleicos.

Wash Buffer 1: Elimina las impurezas

Wash buffer 2: Permite la eliminación de las impurezas de la membrana de manera efectiva mediante lavado de las columnas de purificación.

Agua libre de nucleasas: Evita la contaminación por endonucleasas propias de agua, exonucleasas de reactivos y así mismo evita la actividad de RNAsas

Oligo (dt): Permite reconocer mRNA, adecuado para su uso en la síntesis de cADN. Se utiliza como Primer universal para la transcripción reversa.

Reacción Buffer: Permite mantener un pH estable, puesto que el ADNc durante su síntesis es sensible al pH de cualquier tipo de fuente.

10mM dNTP Mix: Esta mezcla de dNTP consta de cuatro nucleótidos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (2 'desoxinucleósido 5'-trifosfatos), cada uno a una concentración de 10 mM, en una solución de 0,6 mM Tris-HCl (pH 7,5). Esta mezcla es adecuada para uso en PCR, síntesis de ADNc.

Reverse Transcriptase: Enzima que presenta alta estabilidad térmica, permite dirigir la síntesis de la primera hebra de ADNc a partir de un molde de ARN.

Ribolock Inhibidor: El inhibidor de "RNasa RiboLock" protege eficazmente plantillas de ARN de la degradación por RNAsas a temperaturas de hasta 55 ° C.

Componentes de la PCR:

Cebadores ("Primer") u oligonucleotidos: También llamados iniciadores tienen una secuencia corta, de entre 20 a 24 nucleótidos. Para realizar una PCR se necesita dos Primers que son, cada uno, complementarios a una de las dos hebras del ADN. Delimitan la zona de ADN a amplificar, es decir, corresponden a los nucleótidos que definen los extremos de la secuencia que se desea replicar.

Cloruro de magnesio (MgCl₂): El cloruro de magnesio es un cofactor esencial de la DNA polimerasa usada en PCR y su concentración debe ser optimizada. La presencia de agentes quelantes en la reacción afectan la concentración de iones Mg²⁺. Es por eso que la concentración total de magnesio debe exceder la de los dNTPs en la reacción.

Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs): Los cuatro dNTPs (dUTP, dGTP, dATP,

dCTP), son los que forman las nuevas cadenas de DNA, y deben encontrarse en la misma concentración.

Enzima: La enzima que cataliza la reacción de PCR es una ADN polimerasa dependiente de ADN. La más comúnmente usada es la polimerasa del *Thermus aquaticus* (Taq polimerasa).

Tampón Taq polimerasa: Mantiene el pH adecuado 8.4 para el funcionamiento de la Taq polimerasa.

C. Toma de Muestra:

Obtención de la muestra: El órgano dental extraído se colocó en una bolsa con suero fisiológico, se cubrió con un campo estéril de tela y se provocó una fractura en la pieza dental con la ayuda de un martillo; se extrajo el tejido pulpar completo con una pinza Adson sin uña, esteril.

Inmediatamente, cada muestra de tejido de pulpa dental fue colocada en tubos eppendorf con suero fisiológico y trasladadas al laboratorio con cubos de hielo, para su cultivo con diferentes estímulos.

D. Incubación del tejido de la pulpa dental:

Se trabajó en una cámara especial de flujo laminar.

Se retiró el suero fisiológico de cada tubo eppendorf dejando solo las muestras de tejido pulpar.

Se procedió a aplicar el MEDIO INCOMPLETO (DMEM), para enjuagar las muestras.

Una vez enjuagadas las muestras fueron sembradas en la placa de cultivo celular con la ayuda de una micropipeta.

Luego, se vertió en cada pozo 2ml del MEDIO COMPLETO (DMEM + suero bovino al 10% + 1ml de (Gibco® Antibiotic-Antimycotic (100X).

Finalmente, se rotuló y se llevó a la cámara de CO₂ (37°C y 5% de CO₂) para su incubación por 24 horas.

E. Aplicación de Estímulos: Propóleo al 20%(50ul) y Formocresol 1:50 (50ul)

Se hicieron ensayos y pruebas piloto para determinar la dosis del Propóleo y Formocresol con mayor viabilidad, es por ello que se trabajó con 50ul de Propóleo al 20% y 50ul de Formocresol 1:50.

La placa de cultivo celular, contiene en cada pozo la muestra de pulpa dental, 2ml de MEDIO COMPLETO, y se le añadió el estímulo en la siguiente concentración:

En el pozo N°1: GRUPO CONTROL, muestra de tejido pulpar, 2ml de MEDIO COMPLETO. No se aplicó ningún estímulo.

En el pozo N°2: muestra de tejido pulpar, 2ml de MEDIO COMPLETO, y se añadió el estímulo: 50ul de extracto de Propóleo al 20% por 12 horas.

En el pozo N°3: muestra de tejido pulpar, 2ml de MEDIO COMPLETO, y se añadió el estímulo: 50ul de extracto de Propóleo al 20% por 24 horas.

En el pozo N°4: muestra de tejido pulpar, 2ml de MEDIO COMPLETO, y se añadió el estímulo: 50ul de extracto de Propóleo al 20% por 48 horas.

En el pozo N°5: muestra de tejido pulpar, 2ml de MEDIO COMPLETO, y se añadió el estímulo: 50ul de Formocresol 1:50 por 12 horas.

En el pozo N°6: muestra de tejido pulpar, 2ml de MEDIO COMPLETO, y se añadió el estímulo: 50ul de Formocresol 1:50 por 24 horas.

En el pozo N°7: muestra de tejido pulpar, 2ml de MEDIO COMPLETO, y se añadió el estímulo: 50ul de Formocresol 1:50 por 48 horas.

Luego, se volvió a incubar en la placa de cultivo celular con los diferentes estímulos a 37°C y 5% de CO₂.

Concluido el tiempo de aplicación del estímulo a la muestra, se procedió a lavar la muestra con buffer fosfato salino (PBS), y se le preservó en un tubo eppendorf con “ARN later” congelado a -20°C, hasta su utilización para la extracción del ARN.

F. Obtención del ARN:

La medición de niveles de expresión de IL-1 β , se obtuvo a partir del ARN de las células tratadas con Propóleo al 20% y Formocresol 1:50.

Para la extracción de ARN las muestras fueron procesadas con: Thermo scientific, GeneJET RNA Purification Kit de tejidos, para la obtención y purificación de los ARN totales, siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se procedió a enjuagar cada muestra pulpar con Buffer fosfato salino (PBS) para retirar el RNA later, se colocó cada muestra pulpar en otro tubo eppendorf al que se le aplicó (PBS) para luego ser suavemente agitado, se realizó el enjuague dos veces. Se retiró el (PBS) quedando solo la muestra.

Se aplicó 300ul de Buffer lysis y 6ul de Beta mercaptoetanol, se agitó para homogenizar, continuamente se agregó una solución de 600ul (590ul de buffer TE y 10 ul de proteinasa K), se incubó 10 minutos a temperatura ambiente; luego, se centrifugó a 12000 RPM durante 5 minutos.

En otros tubos eppendorf estériles se añadió la solución centrifugada, y además se adicionó 450ul de etanol al 99.9% agitando suavemente.

A continuación, se usaron columnas de purificación de ARN, y se aplicó en cada columna 700ul de la solución preparada en el paso anterior, se procedió a centrifugar a 12000 RPM durante 1 minuto.

El ARN quedó atrapado en la columna de purificación, se colocó nuevos tubos estériles para cada columna, se procedió a aplicar 700ul de “Wash Buffer 1” y se centrifugó a 12000 RPM durante 1 minuto.

Se eliminó la solución excedente, se añadió en cada columna 600ul de “wash buffer

2", se centrifugó a 12000 RPM durante 1 minuto y se volvió a retirar la solución de cada tubo.

Luego, se aplicó 250ul de "wash buffer 2" y se centrifugó a 12000 RPM durante 2 minutos, a continuación se retiró la solución excedente de cada tubo y se volvió a centrifugar a 12000 RPM durante 1 minuto.

Posteriormente en tubos eppendorf estériles se colocó solamente la columna de purificación centrifugada en el paso anterior, se le aplicó 100ul de "Agua libre de nucleasas" y se centrifugó a 12000 RPM durante 1 minuto.

Por último se separó las columnas de purificación de los tubos eppendorf, en los tubos eppendorf se encuentra el ARN obtenido en 100ul de Agua libre de nucleasas. Se almacenó congelado a -20°C hasta su procesamiento para la síntesis de ADNc.

G. Síntesis de ADNc: Reacción de transcripción reversa de ARN a ADNc

Para la síntesis de ADNc se utilizó el kit: Thermo scientific "cDNA Synthesis Kit", de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Se preparó una solución Master mix, conteniendo todos los componentes del Kit que intervienen en la reacción y ARN, como sigue:

ARN total	2µl
Oligo (dt)	1µl
Agua libre de nucleasas	9µl

Se colocó 10µl del master mix en tubos para termociclador (PCR) y se adicionó 2µl de muestra (ARN total), para obtener un volumen de reacción de 12µl por tubo. Las muestras fueron llevadas al termociclador PTC 100, y se incubaron a 65°C por 5 minutos.

A continuación, a cada muestra se le adicionó:

Reacción Buffer	4ul
10mM dNTP Mix	2ul
Reverse transcriptase	1ul
Riblock inhibidor	1ul

Es así que, se añadió 8ul de solución a cada muestra, luego se volvió a llevar al termociclador (PCR) donde se incubó a 42°C por 60 min y a 70°C por 5 min para terminar la reacción. La temperatura de incubación no puede ser mayor a los 80°C, ya que a esta temperatura se comienza a degradar el ADN.

El producto obtenido (ADNc) fue congelado a -20°C hasta su uso en el PCR.

H. PCR del Gen Beta actina humana. (Control)

La reacción en cadena de la polimerasa es un método enzimático in vitro de amplificación cíclica de secuencias específicas de ADN. Este método se caracteriza por su especificidad y sensibilidad; sin embargo, debido a que la enzima utilizada Taq DNA polimerasa no amplifica ARN, es necesario realizar como primer paso una transcripción inversa para formar ADN complementario (ADNc). Utilizando primers específicos de secuencia, es posible determinar el número de copias o la cantidad relativa de una determinada secuencia de ADN.

Se procedió a descongelar el ADNc a temperatura ambiente.

Antes de usar los Primers del gen “IL-1beta”, se usó los Primers del gen “beta actina humana” como CONTROL, para verificar que en el paso anterior se haya logrado sintetizar ADNc.

Los PRIMERS “beta actina humana de avance (Forward)” y “beta actina humana de regreso (Reverse)” vienen liofilizados (es decir deshidratado por frio), es por ello, que se aplicó buffer Tris para su reconstitución.

Así mismo los PRIMERS vienen 20 veces concentrados por lo que se diluyó para lograr una concentración de 1:

En un tubo para PCR se colocó 100ul de agua esteril +5ul del PRIMER beta actina humana R (Reverse).

En otro tubo para PCR se colocó 100ul de agua esteril + 5ul del PRIMER beta actina humana F (Forward).

Los Primers disueltos fueron mezclados, vertiendo en un tubo para PCR 1.5ul de beta actina R + 1.5ul de beta actina F.

Así mismo también se empleó un Master mix, que viene preparado con los siguientes componentes: Agua molecular autoclavable, Tampón Taq polimerasa, Cloruro de magnesio 50mM, Solución de dNTPs (dTTP, dGTP, DCTP, dATP) 50uM de cada dNTP, Taq polimerasa 5ul/ul.

Proceso:

En viales para PCR vertimos: 1.5ul de ADNc + 1.5ul de beta actina humana + 2.5ul de Master Mix.

Luego se llevó al Termociclador para la PCR empleándose protocolos de acuerdo a la temperatura de disociación de cada juego de oligonucleótidos (Primers). (Tabla 1)

Tabla N° 1: Oligonucleótidos y temperatura de hibridación para PCR para detección de Beta actina humana.

Citoquina	Tamaño (pb)*	Oligonucleótidos	Ta** (°C)
Beta Actina F	864 pb	AGCGGGAAATCGTGCGTGACA	59°C
Beta Actina R		GTGGACTTGGGAGAGGACTGG	

*pb: Tamaño del producto en pares base.

**Ta: Temperatura de annealing o hibridación.

El protocolo es:

95°C por 4 min (precalentamiento).

95°C por 1 min (desnaturalización de proteínas).

59°C por 1 min (alineamiento).

72°C por 1 min (extensión).

Y se adiciona

72°C por 5 min

4°C

Se realizó 4 ciclos de 35 repeticiones cada uno.

Concluida la PCR en el Termociclador se vieron los resultados mediante una corrida Electroforética.

I. Electroforesis de los productos de la PCR

Para el análisis de los productos del RT-PCR de Beta actina humana, se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa. 0.75g de “Agarosa” al 1.5% + 50ml de “Buffer TAE contiene (Tris Base, ácido bórico, EDTA) pH 8”

Preparación:

Se vertió en un matraz 50ml de Buffer TAE y 0.75g de agarosa, se fundió la solución de agarosa en un microondas.

Se dejó enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50°C aproximadamente.

Una vez que la solución de agarosa alcanzó los 50°C, se le añadió 6 µL de “SAFE (ADN gel)” compuesto fluorescente que permite teñir el ADN y hacer posible la visualización de éste cuando el gel es iluminado con luz ultravioleta.

Se selló con cinta adhesiva el “porta gel o soporte” donde se va a verter el gel de agarosa y se colocó el peine que servirá para formar los pocillos del gel.

Se vertió la solución de agarosa con SAFE (ADN gel) en el soporte, previamente sellado evitando que se formen burbujas. Se dejó polimerizar (gelificar) durante 20 minutos.

Una vez gelificado, se retiró el peine con cuidado, y se colocó el gel dentro de la cubeta de electroforesis. Los pocillos o carriles fueron colocados cerca del cátodo (polo negativo, alambre color negro).

La cubeta o cámara de electroforesis que contiene ahora el gel se rellenó con Buffer TAE(pH 8) de modo que las moléculas de ADN sometidas a electroforesis se desplazan del polo negativo(alambre negro) al POLO POSITIVO(alambre rojo), ya que a pH superiores a 5 el ADN tiene carga Negativa.

A continuación, se aplicó las muestras de ADNc que fueron sometidas a PCR:

Se colocó 6ul de cada tubo de la preparación de ADNc en cada pocillo o carril del gel

con una micropipeta, además se aplicó en un carril 6ul de MARCADOR que permitió medir la cantidad de pares de bases del gen beta actina humana.

Se tapó la cubeta de electroforesis, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se programó la fuente a 100 V. por 20 min.

Concluida la electroforesis se visualizó los fragmentos de ADNc en un transiluminador con luz UV y se capturó la imagen.

Se capturó la imagen del gen de Beta actina humana, este resultado sirvió como CONTROL para determinar que si se logró sintetizar ADNc.

A continuación se realizó el mismo procedimiento pero con PRIMERS de IL-1beta para medir la expresión de este gen.

J. PCR del Gen IL-1beta

Se procedió a descongelar el ADNc a temperatura ambiente.

Los PRIMERS “IL-1beta (Forward)” y “IL-1beta (Reverse)” vienen liofilizados (es decir deshidratado por frio), es por ello, que se aplicó buffer Tris para su reconstitución.

Así mismo los PRIMERS vienen 20 veces concentrados por lo que se diluyó para lograr una concentración de 1:

En un tubo para PCR se colocó 100ul de agua esteril +5ul del PRIMER IL-1beta R (Reverse).

En otro tubo para PCR se colocó 100ul de agua esteril + 5ul del PRIMER IL-1beta F (Forward).

Los Primers disueltos fueron mezclados, vertiendo en un tubo para PCR 1.5ul de IL-1beta R + 1.5ul de IL-1beta F.

Así mismo también se empleó un Master mix, que viene preparado con los siguientes componentes: Agua molecular autoclavable, Tampón Taq polimeraza, Cloruro de magnesio 50mM, Solución de dNTPs (dTTP, dGTP, DCTP, dATP) 50uM de cada

dNTP, Taq polimeraza 5ul/ul.

Proceso:

En viales para PCR se vertió: 1.5ul de ADNc + 1.5ul de IL-1beta + 2.5ul de Master Mix.

Luego se llevó al Termociclador para la PCR empleándose protocolos de acuerdo a la temperatura de disociación de cada juego de oligonucleótidos (Primers). (Tabla 1)

Tabla N° 1: Oligonucleótidos y temperatura de hibridación para PCR para detección de Beta actina humana.

Citoquina	Tamaño (pb)*	Oligonucleótidos	Ta** (°C)
IL-1 beta F(5)	502pb	CACGATGCACCTGTACGATCAC	52°C
IL-1beta R(3)		CATTCAGCACAGGACTCTCTGG	

*pb: Tamaño del producto en pares base.

**Ta: Temperatura de annealing o hibridación.

El protocolo es:

95°C por 4 min (precalentamiento).

95°C por 1 min (desnaturalización de proteínas).

52°C por 1 min (alineamiento).

72°C por 1 min (extensión).

Y se adiciona

72°C por 5 min

4°C

Se realizó 4 ciclos de 35 repeticiones cada uno.

Concluida la PCR en el Termociclador se vieron los resultados mediante una corrida Electroforética.

K. Electroforesis de los productos de la PCR

Para el análisis de los productos del RT-PCR de IL-1beta, se empleó la técnica de electroforesis en gel de agarosa. 0.75g de “Agarosa” al 1.5% + 50ml de “Buffer TAE contiene (Tris Base, ácido bórico, EDTA) pH 8”

Preparación:

Se vertió en un matraz 50ml de Buffer TAE y 0.75g de agarosa, se fundió la solución de agarosa en un microondas.

Se dejó enfriar la suspensión hasta que alcanzó unos 50°C aproximadamente.

Una vez que la solución de agarosa alcanzó los 50°C, se le añadió 6 µL de “SAFE (ADN gel)” compuesto fluorescente que permite teñir el ADN y hacer posible la visualización de éste cuando el gel es iluminado con luz ultravioleta.

Se selló con cinta adhesiva el “porta gel o soporte” donde se va a verter el gel de agarosa y se colocó el peine que servirá para formar los pocillos del gel.

Se vertió la solución de agarosa con SAFE (ADN gel) en el soporte, previamente sellado evitando que se formen burbujas. Se dejó polimerizar (gelificar) durante 20 minutos.

Una vez gelificado, se retiró el peine con cuidado, y se colocó el gel dentro de la cubeta de electroforesis. Los pocillos o carriles fueron colocados cerca del cátodo (polo negativo, alambre color negro).

La cubeta o cámara de electroforesis que contiene ahora el gel se rellenó con Buffer TAE(pH 8) de modo que las moléculas de ADN sometidas a electroforesis se desplazaron del polo negativo(alambre negro) al POLO POSITIVO(alambre rojo).

A continuación se aplicó las muestras de ADNc que fueron sometidas a PCR:

Se colocó 6ul de cada tubo de la preparación de ADNc en cada pocillo o carril del gel con una micropipeta, además se aplicó en un carril 6ul de MARCADOR “100 bp ladder” que permitió medir la cantidad de pares de bases del gen IL-1beta. Este marcador consta de 15 fragmentos de entre 100 y 1500 pb, la banda que marca los 600 pb es aproximadamente de 2 a 3 veces más brillante que las otras bandas de escalera para proporcionar orientación.

Se tapó la cubeta de electroforesis, se conectaron los electrodos a la fuente de alimentación y se programó la fuente a 100 V. por 20 min.

Concluida la electroforesis se visualizó los fragmentos de ADNc en un transiluminador con luz UV.

Se concluyó al capturar la imagen de la expresión del gen IL-1 beta, a diferentes horas y estímulos.

6.2. Plan de Tabulación, procesamiento y presentación de los datos.

Una vez recolectados los datos, estos fueron tabulados en una matriz de sistematización en una hoja de cálculo Excel versión 2013; a partir de esta se procesó los datos para luego presentarlos en el capítulo de resultados utilizando para tal fin tablas de simple y doble entrada.

7. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE DATOS

El análisis de datos, dada la naturaleza cuantitativa de la variable de estudio (expresión de la IL-1beta), se llevó a cabo hallando medidas de tendencia central (media aritmética y mediana) y de dispersión (desviación estándar, valores mínimos y máximos).

Partiendo de la primigenia que, la IL-1beta es un mediador proinflamatorio que se induce y reacciona de igual manera en cualquier unidad de estudio, además, teniéndose en cuenta que las unidades de estudio de la investigación han sido

controladas (con criterios de inclusión y exclusión) y no presentan ninguna enfermedad local o sistémica que las puedan alterar, se concluye que el comportamiento de una unidad de estudio es indicativo del resto. Por lo expuesto se demuestra que el grupo de estudio de la investigación es homogéneo, debido a ello se trabajó con una unidad de estudio para cada estímulo (propóleo y formocresol) y para cada medición (12, 24 y 48 horas); entonces no son necesarias las pruebas estadísticas.

8. RECURSOS

A. Humanos

-Investigador: Rayniero Manrique Rodríguez

-Asesores:

- **Director Técnico:** Mg. Marita Gómez Muñoz
- **Metodológico:** Dr. Xavier Sacca Urday
- **Redacción:** Dra. María Luz Nieto Muriel

B. Financieros

-El presente estudio fue financiado en su totalidad por el investigador.

C. Materiales

-Unidad dental

-Esterilizadora

-Guantes

-Barbijo

-Gorra de quirófano

- Espejo bucal
- Pinza de algodón
- Explorador
- Cureta de dentina
- Tijera
- Anestesia
- Gasas
- Jeringa para Carpule
- Agujas
- Sindesmótomo
- Forceps para premolares superiores
- Forceps pico de milano
- Sutura
- Cámara de Flujo laminar
- Centrifugadora
- Incubadora de Co2
- Pipetas
- Autoclave
- Refrigeradora
- Congeladora
- Tubos eppendeford 1.5ml

- Frascos estériles
- Tubos Falcon
- Placas de cultivo celular
- Suero bovino
- Medio DMEM
- Gibco (Antibiótico - Antimicótico)
- Agua Estéril
- Cloruro de sodio
- Alcohol comercial
- Micropipetas o tips
- Kit para la extracción de ARN
- Kit para la síntesis de ADNc
- Cebadores de Beta actina humana
- Cebadores de IL – 1beta
- Reactivo precipitador de proteínas
- Etanol
- Buffer de carga
- Marcador de peso molecular
- Propóleo
- Equipo de extracción a reflujo
- Maquina Tempo-block module Heater

- Formocresol.
- Máquina para PCR
- Gel de agarosa
- Cámara electroforética
- Transiluminador
- Cámara fotográfica.
- Computadora
- Calculadora
- Utilería de escritorio

D. Institucionales

- Universidad Alas Peruanas.
- Instituto de Biotecnología del ADN. Uchumayo.
- Clínica particular “ZONERISAS”

CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Cuadro N° 1

Comportamiento de la expresión de la Interleucina-1beta por efecto del propóleo 20% en tejido pulpar sano

IL – 1 beta	Medición		
	12 horas	24 horas	48 horas
Media Aritmética (Promedio)	0	0	0
Desviación Estándar	-----	-----	-----
Valor Mínimo	0	0	0
Valor Máximo	0	0	0
Total de muestra	1	1	1

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

Se observa, que tanto a las 12, 24 como 48 horas existe inhibición total de la citoquina (IL-1beta). Así mismo, la inhibición de la IL-1beta en los tres momentos nos indica la relación independiente de la sustancia con el tiempo. Por otro lado, la desviación estándar demuestra que no hay dispersión o variabilidad indicando que el efecto del propóleo en la inhibición de la IL-1beta es homogéneo.

Cuadro N° 2

Comportamiento de la expresión de la Interleucina-1beta por efecto del formocresol 1:50 en tejido pulpar sano

IL – 1 beta	Medición		
	12 horas	24 horas	48 horas
Media Aritmética (Promedio)	0	0	0
Desviación Estándar	-----	-----	-----
Valor Mínimo	0	0	0
Valor Máximo	0	0	0
Total de muestra	1	1	1

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

Se observa, que tanto a las 12, 24 como 48 horas existe saturación total de los ARNm de (IL-1beta) hasta la extinción del gen. Así mismo, la saturación de receptores de la IL-1beta en los tres momentos indica la citotóxicidad del estímulo y su relación independiente con el tiempo. Además, la desviación estándar demuestra que no hay dispersión o variabilidad indicando que el efecto del formocresol frente a IL-1beta es homogéneo.

Cuadro N° 3

Comparación de la expresión de la Interleucina-1beta por efecto de propóleo 20% y formocresol 1:50 en tejido pulpar sano a las 12 horas

IL – 1 beta	Medición a las 12 horas	
	Propóleo 20%	Formocresol 1:50
Media Aritmética (Promedio)	0	0
Desviación Estándar	-----	-----
Valor Mínimo	0	0
Valor Máximo	0	0
Total de muestra	1	1

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

Se evidencia, que a las 12 horas hay inhibición de la IL-1 beta por el propóleo y saturación total de los ARNm de la IL-1beta en el caso del formocresol.

Cuadro N° 4

**Comparación de la expresión de la Interleucina-1beta
por efecto de propóleo 20% y formocresol 1:50 en
tejido pulpar sano a las 24 horas**

IL – 1 beta	Medición a las 24 horas	
	Propóleo 20%	Formocresol 1:50
Media Aritmética (Promedio)	0	0
Desviación Estándar	-----	-----
Valor Mínimo	0	0
Valor Máximo	0	0
Total de muestra	1	1

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En la tabla se muestra que a las 24 horas de aplicados los dos estímulos, el gen de IL-1 beta se inhibió por el extracto de propóleo y en el caso del formocresol, se extinguió por saturación total de los ARNm de la IL-1beta.

Cuadro N° 5

Comparación de la expresión de la Interleucina-1beta por efecto de propóleo 20% y formocresol 1:50 en tejido pulpar sano a las 48 horas

IL – 1 beta	Medición a las 48 horas		
	Propóleo 20%	Formocresol 1:50	Control (sin estímulo)
Media Aritmética (Promedio)	0	0	0
Desviación Estándar	-----	-----	-----
Valor Mínimo	0	0	0
Valor Máximo	0	0	0
Total de muestra	1	1	1

Fuente: Matriz de datos

Interpretación:

En el cuadro N° 5 se percibe que a las 48 horas de aplicados los estímulos, hay ausencia de la IL-1 beta para ambos casos, por genotoxicidad de la IL-1beta en el caso del formocresol y por un efecto inhibitorio en el caso del propóleo. Así mismo, se observa la ausencia de esta citoquina en el grupo control, puesto que en tejido pulpar sano ésta no se induce.

2. DISCUSIÓN

La agresión a la pulpa dental puede acontecer al uso de drogas en tratamientos pulpares, traumatismos, o incluso infecciones bacterianas provenientes de lesiones cariosas o enfermedad periodontal; es así que, cual fuese el estímulo va a desencadenar una respuesta inflamatoria compleja, en donde los macrófagos liberarán grandes cantidades de oxígeno reactivo (ROS), especies de nitrógeno (RNS), óxido nítrico (NO), y numerosas citocinas. La sobreexpresión de estos mediadores provoca respuestas patológicas, agudas o crónicas, en el tejido. 116

Frente a esto, en la actualidad se siguen realizando estudios para encontrar la droga ideal en la terapéutica pulpar, aquella que posea mayor biocompatibilidad, así mismo que demuestre éxito clínico, radiográfico e histológico. Es así que en las últimas décadas, se plantea el estudio de la pulpa desde una visión molecular y de su biología celular, cuyo objetivo es obtener nuevas modalidades restaurativas en la odontología clínica, con mínima o nula agresión hacia el tejido pulpar. Además, se vienen realizando numerosas investigaciones tanto con materiales que se encuentran en el comercio así como con nuevas sustancias naturales tal es el caso del propóleo o la tara; con el fin de encontrar el fármaco ideal.

Por lo expuesto, es que en la presente investigación se estudió la expresión de la Interleucina- 1 beta en el tejido pulpar, aplicando como estímulos propóleo y formocresol, el propósito fue determinar el nivel de inocuidad o agresión de estas dos sustancias hacia el tejido pulpar; demostrándose que la adición de propóleo al 20% no libera ni induce IL- 1beta, suceso antagónico a la aplicación de formocresol 1:50, en donde la citotoxicidad de la droga agota los ARNm de la IL-1b hasta extinguirse.

Estudios previos realizados sobre las propiedades antiinflamatorias del propóleo y su potencial para estimular la inmunidad celular confirman y respaldan los resultados de esta investigación. Según Ewelina Szliszka y cols, en su estudio “Composición química

y efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de propóleo Brasileiro en macrófagos activados J774A.1”, sostiene que el propóleo no disminuye la viabilidad celular ni produce citotoxicidad; además al estimular a macrófagos con lipopolisacáridos (endotoxinas) de bacterias gram (-), se induce una fuerte liberación de IL-1, IL-6, IL-12, y TNF- α (citoquinas proinflamatorias) por los macrófagos, sin embargo, la liberación positiva de estas citoquinas es bloqueada por el extracto de propóleo. Por otro lado, también estudia la presencia de IL-3, IL-5, IL-9, IL-10, IL-17, IFN- γ (citoquinas antiinflamatorias), evidenciándose que no son afectadas por el propóleo. 116

Así mismo, Shi y Wang, notaron que los extractos de propóleo chinos suprimen ARNm y la expresión de proteínas de IL-1 β e IL-6 inducida por lipopolisacáridos (LPS) en las células RAW264.7. 107, 128 De igual manera, Blonska y col. informaron de la inhibición del ARNm de IL-1 β y expresión de proteínas en los macrófagos estimulados con LPS J774A.1 por el extracto de propóleos, atribuyéndole esta acción a y sus flavonas. 11

En un estudio donde se evaluó la cantidad de actividad biológica del propóleo; se concluye, que entre los componentes del propóleo, el ácido cafeico fenetil éster (CAPE) es un potente modulador, produciendo efectos inhibidores sobre la producción de citocinas pro-inflamatorias (interleucina-1 β (IL-1 β)), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1). 109

Otra investigación, “Propóleo verde de Brasil: propiedad antiinflamatoria por una actividad inmunomoduladora”, refiere que la propiedad antiinflamatoria del propóleo se debe la inhibición de citocinas pro-inflamatorias y aumento de citoquinas antiinflamatorias que sugieren una actividad inmunomoduladora. Además, su efecto inmunomodulador se debe a la regulación del reclutamiento de células en la zona inflamada, disminuyendo la acción de los neutrófilos que podría ser perjudicial para los tejidos inflamados. Estos datos comprueban los del presente estudio, donde se observó inhibición de la IL-1beta en los tres tiempos de estudio confirmandose el poder antiinflamatorio del propóleo y su actividad inmunomoduladora. 83

Por otro lado, la buena tolerancia del propóleo a los tejidos pulpaes también se ha demostrado en el estudio “Efecto in vitro del propóleo y del formocresol en las células de la pulpa dental en pacientes de 3 a 5 años, CIRCA – MAS, 2009”, se concluye que el extracto etanólico de propóleo al 20% en células pulpaes genera su máximo promedio de viabilidad celular (98.12%) a las 48 horas, además de no producir apoptosis ni hidrolisis del ADN a las 24 ni 48 horas, en comparación con el formocresol puro, que produjo una disminución significativa de la viabilidad celular a las 48 horas, no produciendo apoptosis pero generando hidrólisis del ADN al 100% a las 24 y 48 horas. 88 Estos datos concuerdan con el presente estudio, en donde se realizaron pruebas piloto para determinar la dosis de propóleo y formocresol con mayor viabilidad del tejido pulpar y por consiguiente integridad del ADN, necesaria para poder evaluar a la IL – 1 beta, es así que se decide trabajar con 50ul de extracto de propóleo al 20% y 50ul de formocresol en concentración 1:50, puesto que presentaron el mayor porcentaje de viabilidad celular a las 48 horas y por lo tanto de totalidad del ADN, esto es demostrado al hacer una prueba control con el gen Beta Actina Humana, comprobando la integridad del ARNm interpretado como ADNc.

Referente al Formocresol, sustancia ampliamente utilizada en el tratamiento pulpar de dientes temporarios, hay estudios que refieren un alto poder citotóxico. Cardoso, Maria L. y cols. sostienen, que hay estudios suficientes que demuestran el poder citotóxico del formocresol, encontrándose concentraciones significativas de éste en el ligamento periodontal, hueso, pulpa y dentina posterior a un tratamiento pulpar; además, se ha demostrado que la pulpa y los tejidos periapicales inflamados contiene una gran variedad de células inmunocompetentes, con predominancia de macrófagos, que frente a un estímulo liberan citoquinas proinflamatorias como son IL-1beta, IL-6, TNF-alfa, la liberación de estas citoquinas a partir de macrófagos tiene un importante efecto en el reclutamiento, proliferación y diferenciación de osteoblastos, favoreciendo la reabsorción ósea, este es el mecanismo a través del cual se inducen todos los estadios de lesiones periapicales. 21

Gómez Muñoz Marita, comprueba en el estudio “Efecto del formocresol en la producción de radicales libres e inducción de apoptosis de macrófagos murinos”, el poder genotóxico del formocresol al evaluar su efecto en macrófagos murinos en función de la concentración [1:10, 1:50, 1:300], a partir de las 3 horas se evidencia fragmentación del ADN, siendo mayor en las dosis más altas. 52

Luis Tambillo G., Alberto Manchego S. y cols. evalúan en su estudio la expresión de citoquinas proinflamatorias de leucocitos de alpaca al enfrentarlos a extracto total de *Clostridium* como estímulo. Midiendo los niveles de (TNF α , IL-1 α , IL-1 β e IL-6) a 1, 12 y 24 horas de exposición. Además, mencionan que las citoquinas siempre siguen un orden cronológico de expresión, donde el TNF α se produce al principio de la inflamación continuando con oleadas de IL-1 y posteriormente por IL-6. Se demuestra, que hay una producción elevada de TNF α a la hora de incubación, sin embargo, decae a las 12 horas y a las 24 horas se observa un ligero aumento de la expresión; para IL-1 α se observa un patrón similar. Caso contrario con la IL-1beta, donde evidencia bajos niveles de expresión a la hora de incubación, esto es debido a que las plaquetas que si bien es cierto son anucleadas, contienen y almacenan en su citoplasma ARNm de citoquinas como IL-1beta secretándola inmediatamente después del estímulo, siendo este mecanismo el fundamento por el cual se logra registrar una escasa cantidad de IL-1beta. No obstante, a las 12 horas ocurre una alta expresión de esta citoquina, debido a que la expresión de ARNm del gen de la IL-1 β ocurre 15 minutos después de la unión con el ligando, alcanzando un pico máximo a las 3 o 4 horas, manteniéndose los niveles por más de 20 horas. Sin embargo, la producción de la IL-1beta cayó a las 24 horas, probablemente a la reducida duración del ARNm, o debido a un agotamiento antigénico y de ARNm. 118 Estos resultados son acordes con los de nuestra investigación, donde se tomaron tiempos de (12, 24 y 48 horas) para la medición de la IL-1beta, garantizando una correcta medición por la integridad de ADN que fue controlada.

Además, se infiere que la inexistencia de IL-1beta a las 12, 24 y 48 horas en las muestras estimuladas con formocresol es debido a que esta molécula no se almacena intracelularmente, sino que es producida luego de una señalización celular, señalización

que va agotándose por toxicidad del estímulo que ocasiona saturación de receptores, por consiguiente, la ausencia de IL-1 en pulpas estimuladas con formocresol a partir de las 12 horas demuestra que la citotoxicidad del estímulo agota los ARNm del gen y satura los receptores ocasionando un descenso hasta la extinción del gen, como se evidenció en los 3 tiempos estudiados; pese a que esta citoquina debería expresarse hasta más allá de 24 horas, se alude que el estímulo agresivo la agotó tempranamente.

61

Con los resultados obtenidos en la presente investigación se concluye, que el efecto del formocresol sobre el tejido pulpar produce una respuesta inflamatoria y toxicidad a nivel genético, en este caso en la IL-1beta. Caso contrario con el propóleo, pues se comprueba su alto poder antiinflamatorio y modulador de la inmunidad al inhibir la liberación de la IL-1beta; por lo tanto, el propóleo al 20% sería una droga prometedora para su uso en la terapéutica pulpar.

CONCLUSIONES

Primera:

El extracto de propóleo al 20% inhibió la síntesis de la IL-1beta en el tejido pulpar a las 12, 24 y 48 horas, confirmando su alto poder antiinflamatorio y sin injuria de los tejidos.

Segunda:

El formocresol en concentración 1:50, evidenció su gran poder citotóxico y genotóxico al agotar el ARNm de la IL-1beta hasta su extinción, en los tres tiempos de estudio.

Tercera:

El propóleo demostró ser un material biocompatible a nivel genético al inhibir la expresión de IL-1beta debido a su potencial antiinflamatorio y regulador de la inmunidad. Por lo tanto se acepta la hipótesis planteada.

RECOMENDACIONES

Primera:

Habiéndose comprobado las bondades del propóleo in vitro, se sugiere realizarse ensayos in vivo, para estandarizar la dosis y analizar su eficacia clínicamente.

Segunda:

Realizar nuevas investigaciones comparando los materiales que se aplican actualmente en odontología con alternativas naturales.

Tercera:

Se recomienda también continuar con estudios genéticos del propóleo para poder confirmar sus demás propiedades en el tejido pulpar.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ABBAS, A: "Inmunología celular y molecular". Edición Elsevier.2004. p. 277.
2. ABBS, AK; MURPHY, KM; SHER, A: "Functional diversity of helper T lymphocytes". Nature. 1996.
3. ANGUS, CAMERON: "Manual Odontología Pediátrica". Editorial Brace. Madrid 1998. p.85.
4. ARUFFO, A; STAMENKOVIC, I; MELNICK, M; UNDERHILL, C; SEED, B: "CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate".1990.
5. Avery, JK: "Structural elements of the young and normal human pulp". Oral Surg 1971;32:113.
6. BANKOVA, V: "CHEMICAL Diversity of Propolis and the Problem of Standardization". J ETHNOPHARMACOL. 2005.
7. BANKOVA, V: "Determining Quality in Propolis Samples". J AM APITHER. 2000.
8. BARBANELL, RL; LIAN, JB; KEITH, DA: "Structural proteins of the connective tissues".Textbook of oral biology. Philadelphia. 1978. p.419.
9. BARKHORDAR, RA; GHANI, QP; RUSSELL, TR; HUSSAIN, MZ: "La Interleucina-1 beta y la actividad de síntesis de colágeno en fibroblastos de la pulpa dental humanos". Journal Endod. Department of Preventive & Restorative Dental Sciences, School of Dentistry, University of California, San Francisco. USA. 2002.
10. BIONDI, A; CORTESE, S: "Pulpotomias en molares primarios. Evaluación clínico radiográfica de formocresol o trióxido mineral agregado". Revista de la Facultad de Odontología (UBA). 2008.
11. BLONSKA, M; BRONIKOWSKA, J; PIETSZ, G; CZUBA, ZP; SCHELLER, S; KRÓL, W: "Efectos del extracto etanólico de propóleo (EEP) y sus flavonas sobre la expresión génica inducible en macrófagos J774A.1". Diario de Etnofarmacología. Poland. 2004

12. BOJ, JR; CATALÁ, M; GARCIA BALLESTA, C; MENDOZA, A; PLANELLS, P:
“Odontopediatría. La evolución del niño al adulto joven”. 1ra ed. Editorial Ripano S.A. Madrid. 2001.
13. BOLING, LR: “Blood vessels of the dental pulp”. Anat Rec. 1942.
14. BONGENHIELM, U; HAEGERSTRAND, A; THEODORSSON, E; FRIED, K:
“Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts”. Suecia. 1995.
15. BONHEVI, JS; COLL, F; JORDA, R: “The Composition, Active components and Bacteriostatic Activity of Propolis in Dietetics”. Journal of the American Oil Chemists Society. USA. 1994.
16. BRACHO, J: “Calidad de propóleos de origen argentino y propiedades organolépticas”. Argentina. 2003.
17. BRUSHI, ML; FRANCO, SL; GREMIAO, MP: “Application of an Hplc Method for Analysis of Propolis Extract”. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies. Brasil. 2003.
18. BUTCHER, EC; PICKER, LJ: “Lymphocyte homing and homeostasis”. Science. USA. 1996.
19. CAPPUCINO, C; SHEENAN, R: “The biology of dental pulp”. Textbook of oral biology. Philadelphia: WB Saunders. 1978.
20. CARDOSO, MARIA L; ALVAREZ, MIRTA A; AGUIRRE, MARIA V; LUCAS, GABRIELA V; BRANDAN, NORA C: “Efecto in vitro del Formocresol y el Sulfato Férrico sobre Macrófagos Peritoneales Murinos”. Rev. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad del Nordeste. Argentina, 2006.
21. CARDOSO, MARÍA L; ALVARES, MIRTA A; AGUIRRE, MARÍA V; BRANDAN, NORA; LUCAS, GABRIELA V: “Evaluación in vitro de la acción del Formocresol sobre la actividad Fagocitaria, Necrosis Y Apoptosis en Macrófagos Murinos”. Rev. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Universidad Del Nordeste. Argentina. 2005.

22. CASTRILLÓN RIVERA, LAURA ESTELA; SUSANA AURORA, MACÍN CABRERA; ALEJANDRO, PALMA RAMOS: "Participación de la interleucina 1 β (IL-1 β) en periodontitis". Revista Odontológica Mexicana. Diciembre 2007.
23. CHAILLOU, LL: "Estudio del propóleo de Santiago del estero". Cienc tecnol Aliment Campinas. Argentina. 2004.
24. CHANG, MC; HUNG, HP; LIN, LD; SHYU, YC; WANG, TM; LIN, HJ; CHAN, CP; HUANG, CC; JENG, JH : "Efecto de la interleucina-1 β en la expresión de ICAM-1 de las células de la pulpa dental: papel de la vía PI3K/AKT, MEK/ERK, y la ciclooxygenasa". Clin Oral Investig. Chang Gung University of Science and Technology, Taoyuan. Taiwan. 2014.
25. CHIA DELGADO, ERNESTO; RAÚL, CASTRO YANAHIDA: "Cambios histológicos en dientes pulpotomizados tratados con formocresol y agregado de trióxido mineral en canis familiaris". Kiru. 2011.
26. CHOI, Y; NOH, D; CHO, S; SUH, H; KIM, K; KIM, J: "Antioxidant And Antimicrobial Activities Of Propolis From Several Regions Of Korea". Korea. 2006.
27. CHU, SC; TSAI, CH; YANG, SF: "Induction of vascular endothelial growth factor gene expression by proinflammatory cytokines in human pulp and gingival fibroblasts". Journal Endod. Taiwan. 2004.
28. CLAUS, R; KINSCHERF, R; GEHRKE, C; BONATERRA, G; BASNET, P; METZ, J: "Antiapoptotic Effects Of Propolis Extract And Propel On Human Macrophages Exposed To Minimally Modified Low Density Lipoprotein". Alemania. 2000.
29. COHEN, S; BURNS, R: "En Vías de la pulpa". Ed. Mosby. 2002. Cap 11. p. 422-423.
30. COIL, J; TAME; WATERFIELD, JD: "Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharide and methyl mercaptan". Canada. 2004
31. CUTRIGHT, DE; BHASKAR, SN: "Pulpal vasculature as demonstrated by a new method". Oral Surg. USA. 1969.
32. DAHL, E; MJOR, IA: "The fine structure of the vessels in the human dental pulp". Acta Odontol Scand. Suecia. 1973.

33. DAIMY DÍAZ, MENA; JOEL, D; GIL, RODRÍGUEZ; GISELA, VALDÉS GONZÁLEZ: "Determinación de la CMI de Propóleos cubanos a partir de dos técnicas diferentes". Estación Experimental Apícola (EEA). Cuba. 2000.
34. DIRECCIÓN NACIONAL DE INNOVACIÓN ACADÉMICA, Odontopediatría, Terapia Pulpar. Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogota. Disponible desde:
<http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/odontologia/2005197/capitulos/cap5/574.html#formocresol>.
35. DOODSTAR, H; BURKE, MD; MAYER, RT: "Bioflavonoids: Selective substrates and inhibitors for cytochromes P450 CYP1 and CYPB1". Toxicology. USA. 2000.
36. D'SOUZA, R; BROWN, JR: "Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps". Arch Oral Biol. USA. 1989.
37. E, BEATRIZ; PACHANO, U; MARÍA, E; SALAS, C: "Comportamiento clínico y radiográfico del formocresol y la pasta iodoformada en el tratamiento de pulpotomías en molares primarios". Fundación Acta Odontológica Venezolana. 2009.
38. EDWALL, L; KINDLOVA, M: "The effect of sympathetic nerve stimulation on the rate of disappearance of tracers from various oral tissues". Acta Odont Scand. Suecia. 1971.
39. EMBERY, G: "Glycosaminoglycans of human dental pulp". J Biol Buccale . 1976.
40. FAJURI, M; HUERTA, J; SILVA, N: "Eficacia del propóleo chileno como antimicrobiano contra microorganismos de interés en Odontología". Trabajo de Investigación para optar al título de cirujano dentista. Facultad de Odontología, Universidad de Chile. 2004.
41. FARNOUSH, A: "Mast cells in human dental pulp". Journal of Endodontics. USA. 1984.
42. FERNANDEZ, SG; ALEMAN, E; FIQUEROA, B; FAGOAGA, E; RIVERA, J; PURROY, A: "Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers". Contact DERMATITIS. España. 2004.

43. FERNANDEZ, SG; ALEMAN, E; FIQUEROA, B; FAGOAGA, E; RIVERA, J; PURROY, A: "Direct and airborne contact dermatitis from propolis in beekeepers". Contact Dermatitis. España. 2004.
44. FIGUEIRAS, MER; CARDIEL, NM; JACINTO, ALF; BALLESTEROS, VA; CHÁVEZ, BE; GARCÍA, ALR; HERNÁNDEZ, GJC: "Inmunoexpresión de células dendríticas en pulpas clínicamente sanas e inflamadas en grado irreversible". Revista Odontológica Mexicana. Junio. 2010.
45. FRISTAD, I: "Dental innervation: functions and plasticity after peripheral injury". Acta Odontol Scand. Noruega. 1997.
46. GALLIN, JI. INFLAMMATION. EN: PAUL, WE. (ED.): "Fundamental Immunology". Raven Press. New York. 1989.
47. GALLIN, JI; GOLDSTEIN, IM; Snyderman, R: "Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates". Raven Press. New York. 1988.
48. GENESER, F: "En Histología sobre bases moleculares". 3ª ed. Edicion Panamericana. 2000. Cap 8, p. 198.
49. GENESER, F: "En Histología sobre bases moleculares". 3ª ed. Edicion Panamericana. 2000. Cap 8. p. 204.
50. GHISALBERTI, EL: "Propolis a review". Editorial International Bee Research Association. 1979.
51. GÓMEZ-CARAVACA, A; GÓMEZ-ROMERO, M; ARRÁEZ-ROMAN, D; SEGURA-CARRETERO, A; FERNÁNDEZ-GUTIERREZ, A: "Advances in the Analysis of Phenolic Compounds in Products Derived from Bees". J Pharm Biomed. España. 2006.
52. GOMEZ MUÑOZ, MARITA: "Efecto del formocresol en la producción de radicales libres e inducción de apoptosis de macrófagos murinos" Arequipa. 2006.
53. GONZÁLEZ RODRÍGUEZ, WALKYRIA DEL CARMEN; CORONA CARPIO, MARCIA HORTENSIA; MARTÍNEZ RAMOS, MAYRA RAQUEL; GARCÍA MILANÉS, MARYLENA; NÚÑEZ ANTÚNEZ, LEONARDO: "Pulpotomías de molares temporales en pulpas muertas con tintura de propóleos al 10%". Rev Cubana Estomatológica v.44 n.3 Ciudad de La Habana jul.-sep. 2007.

54. GOYAL, S; ABUWALA, T; JOSHI, K; MEHTA, J; INDUSHEKAR, KR; HALLIKERIMATH, S: "The Clinical, Radiographic and Histological evaluation of three different concentrations of Formocresol as a pulpotomy agent". J Int Oral Health. India. 2014.
55. GRANGE, J.M.; DAVEY, R.W: "Antibacterial properties of propolis". J. of the Royal Society of Medicine. Londres. 1990.
56. GRIFFIN CJ, HARRIS R: "Ultrastructure of collagen fibrils and fibroblasts of the developing human dental pulp". Arch Oral Biol. Australia. 1966.
57. HAHN, CL; FALKLER, WA; SIEGEL, MA: "A study of T and B cells in pulpal pathosis". J Endodon. USA. 1989.
58. HAN, SS: "The fine structure of cells and intercellular substance in the dental pulp". Biology of the dental pulp organ. University of Alabama Press. USA. 1968.
59. HAVSTEEN, B: "The biochemistry and medical significance of the flavonoids". Pharmacology & therapeutics. Alemania. 2002.
60. HERNÁN VILLENA, MARTÍNEZ: "Endodoncia Pediátrica". 1ª ed. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima – Perú. p.215- 216.
61. HINOSTROZA SOLANO, ROCÍO LUZ: "Expresión de citoquinas pro inflamatorias de leucocitos de alpaca (*Vicugna pacos*) inducidos por el extracto de macroquistes de *Sarcocystisaucheniae*". Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima. 2012.
62. HOSOYA, S; MATSUSHIMA, K; OHBAYASHI, E; YAMAZAKI, M; SHIBATA, Y; ABIKO Y: "La estimulación de Interleucina-6 independiente a la producción de Interleucina-1 beta en la pulpa dental humana". Biochem Mol Med. Department of Endodontics, Nihon University School of Dentistry at Matsudo. Japan. 1996.
63. INGLE; BAKLAND: "Endodoncia". 5ª ed. Editorial Mc Graw Hill. 2002. Cap 2. p 35-37.
64. ISHIZAKA, K: "Most cell activation an mediator release". Progress in Allergy. USA. 1984.
65. ISOKAVA, S: "Uber das lymph System des Zahnes". Z Zellforsch. Japon. 1960.

66. IZUMI, T; KOBAYASHI, I; OKAMURA, K; SAKAI, H: "Immunohistochemical study on the immunocompetent cells of the pulp in human non-carious and carious teeth". Arch Oral Biol. Japon. 1995.
67. JIN, UH; CHUNG, TW; KANG, SK; SUH, SJ; KIM, JK; CHUNG, KH; GU, YH; SUZUKI, I; KIM, CH: "Caffeic acid phenyl ester in propolis is a strong inhibitor of matrix metalloproteinase-9 and invasion inhibitor: isolation and identification". Clin Chim Acta. Korea. 2005.
68. JOHNSON, D; JOHNS, D: "Quantitation of nerve fibers in the primary and permanent canine and incisor teeth in man". Arch Oral Biol. USA. 1978.
69. KERZOUDIS, NP; OLGART, L; EDWALL, L: "Involvement of substance P but not nitric oxide or calcitonin gene-related peptide in neurogenic plasma extravasation in rat incisor pulp and lip". Arch Oral Biol. Suecia. 1994.
70. KIM, S; ET AL: "Arteriovenous distribution of hemodynamic parameters in the rat dental pulp". Microvasc Res. USA. 1984.
71. KOGUSHI, M; NAKAMURA, S; KISHI Y COL: "A study of leukocyte extravasation in early inflammatory changes in the pulp". Journal of Endodontics. Japon. 1988.
72. KOO, CH; SHERMAN, JW; BAND, L; GOETZL, E: "Molecular diversity of human leukocyte receptors. Adv. Prostaglandin Thromboxane Leucotriene". USA. 1989.
73. KOSALEC, I; PEPELJNJAK, S; BAKMAZ, M: "Flavonoid Analysis and Antimicrobial Activity of Commercially Available Propolis Products". Croacia. 2005.
74. KRELL, R: "VALUE-Added Products from Beekeeping". FAO Agricultural Services Bulletin N°. 124. Rome. 1996.
75. LAZEBNIK, L; DUBTSOVA, E; KAS'IANENKO, V; KOMISSARENKO, I: "Composition and Some Biological Effects of Propolis". Eksp klin Gastroenterol. Russia. 2006.
76. LARSEN, GL; HERISON, PM: "Mediators of inflammation". Ann. Rev. Immunol. Universidad del Colorado. USA. 1983.

77. LEA ASSED, BEZERRA DA SILVA "Tratado de Odontopediatría". Editorial Amolca. Colombia. 2008. p. 574.
78. LEE, J;Y Y SPICER, A: "Hyaluronan: a multifunctional, megadalton, stealth molecule". USA. 2000.
79. LEIN, P; GUO, X; HEDGES, AM; RUEGER, D; JOHNSON, M; HIGGINS, D: "The effects of extracellular matrix and osteogenic protein-1 on the morphological differentiation of rat sympathetic neurons". USA. 1996.
80. LIGRESTI ROSSI, A; LONGO, R; RUSSO, A; BORELLI, F; SAUTEBIN, L: "The Inhibitory Effect of Propolis and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) On Cyclooxygenase Activity In J774 Macrophages". Phytomed. Italia. 2002.
81. LOPEZ DEL VILLAR, JESSICA A; UBILLUS CELI, MAURY M: "Estandarización Del Propóleo De La Provincia De Oxapampa, Como Materia Prima Para Su Utilización A Nivel Industrial". Universidad Nacional Mayor De San Marcos. Lima. 2004.
82. LOPEZ JORDY, MARIA DEL CARMEN: "Manual de Odontopediatría". Editorial Mc Graw- Hill. Santa Fe de Bogota. 1997. p.86
83. MACHADO, JOLEEN LOPES; ASSUNCAO, ANNE: "Propóleo verde de Brasil: Propiedad antiinflamatoria por una actividad inmunomoduladora". Brasil. 2012.
84. MALE, DK; CHAMPION, B; COOKE, A; OWEN, M: "Cell traffic and inflammation". En: Advance Immunology. 2ª ed. Editorial Gower London-New York. 1991.
85. MANGKORNKARN, C; STEINER, JC: "In vivo and in vitro glycosaminoglycans from human dental pulp". J Endod. USA. 1992.
86. MARCUCCI, MC: "PROPOLIS: Chemical Composition, Biological Properties and Therapeutic Activity". Brasil. 1995.
87. MATSUSHIGE, K; BASNET, P; HASE, K; KADOTA, S; TANAKA, K; NAMBA, T: "Propolis Protects Pancreatic Beta-Cells Against The Toxicity Of Streptozotocin (STZ)". Phytomedicine. Japon. 1996.

88. MAURICIO CARO, MONICA DEL ROSARIO: "Efecto in vitro del propóleo y del formocresol en las células de la pulpa dental en pacientes de 3 a 5 años, CIRCA-MAS". Arequipa. 2009.
89. MAYTA-TOVALINO, F; SACSAQUISPE-CONTRERAS, S; CECCARELLI-CALLE, J; ALANIA-MALLQUI, J: "Propóleo Peruano: Una nueva alternativa terapéutica antimicrobiana en Estomatología". Revista Estomatológica Herediana. Lima. 2012.
90. MEYERS, R: "IMMUNOLOGY". From cell biology to disease. 2007. p. 188
91. M, JONTELL; T, OKIJI; U, DAHLGREN; G, BERGENHOLTZ: "Immune defense mechanisms of the dental pulp". Critical Rev in Oral Biol & Medicine. Suecia. 1998.
92. O'BOSKEY FJ, JR; PANAGAKOS, FS: "Cytokines stimulate matrix metalloproteinase production by human pulp cells during long-term culture". Journal Endo. New Jersey. 1998.
93. OLGART, LM: "The role of local factors in dentin and pulp in intradental pain mechanisms". Journal Dent Res. 1985.
94. OZORIO, JOSE ESTEBAN: "Análisis histológico de la evolución de la reacción de tejido de la pulpa a la acción de pastas de hidróxido de calcio, extracto estandarizado de propóleos y su asociación usando cerdos como modelo experimental". Tesis, Universidad de Ribeirão Preto. Programa de PostGrado en Odontología, Brasil. 2007.
95. PARK, YK: "Antimicrobial Activity of Propolis on Oral Microorganisms". Brasil. 1998.
96. P, DAVID; BAILEY, PJ; GLODENBERG, MM; FORD-HUTCHINSON, AW. "The role of the arachidonic acid products in pain and inflammation". Ann. Rev. Immunol. New Jersey. 1984.
97. PITZALIS, C; KINGSLEY, G; HASKARD, D; PANASHI, G: "The preferential accumulation of helper inducer T lymphocytes in inflammatory lesions: evidence for regulation by selective endothelial and homotypic adhesion". London. 1988.

98. POPOVA, M; SILICI, S; KAFTANOGLU, O; BANKOVA, V: "Antibacterial activity of turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition". Phytomedicine. Turkey. 2005.
99. PREMOLI, GLORIA; LAGUADO, PAOLA; DÍAZ, NATHALIE; ROMERO, CAROLINA; VILLARREAL, JUANA; GONZÁLEZ, ANAJULIA: "Uso del propóleo en odontología". Acta Odontológica Venezolana. Venezuela. 2009.
100. RAMÓN CASTILLO, M; GUIDO PERONA, CARMEN KANASHIRO; MIGUEL PEREA; FERNANDO SILVA Y COL: "Estomatología Pediátrica Ripano", Editorial S. A. 2011.
101. RODRIGUEZ CHAVEZ, MIGUEL ANGEL: "Actividad antibacteriana de cuatro soluciones del extracto de Propóleo en bacterias anaerobias frecuentes en necrosis pulpar con reacción periapical" Tesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Odontología. Lima. 2007.
102. ROIT, IM; BROSTOFF, J; MALE, DK: "Inmunología". 2ª ed. Barcelona. 1992.
103. ROSALEN, PL; KOO, H; CURY, JA; PARK, YK: "Efeito da Propólis em rato de Ssalivado Dessalivado". 15a reunião anual. Brasil. 1998.
104. ROZA HAGHGOO; FARID ABBASI." A Histopathological Comparison of Pulpotomy with Sodium Hypochlorite and formocresol". Endodontic Journal. Iran. 2012.
105. SERRA BONVEHI, J; VENTURA COLL, F: "Study on Propolis Quality from China and Uruguay". Barcelona. España. 2000.
106. SHANG JIA-JIAN, YANG QIU-BO, ZHAO HUAN-YING, CAI SHUANG, ZHOU YAN AND SUN ZHENG: "Preliminary molecular analysis of bacterial composition in periapical lesions with primary endodontic infections of deciduous teeth". Journal Chin Med. China. 2013.
107. SHI, H; H, YANG; ZHANG, X; YU, L: "Identificación y cuantificación de composición fitoquímica y propiedades de eliminación antiinflamatorias y radicales del extracto metanólico de propóleo chino". Diario de Química Agrícola y Alimentaria. China. 2012.

108. SILVA, AC; FARIA, MR; FONTES, A; CAMPOS, MS; CAVALCANTI, BN: "La Interleucina-1 beta e Interleucina-8 en la pulpa dental sana e inflamada". J Appl Oral Sci. Ibirapuera University, Sao Paolo. Brasil. 2009.
109. SILVA CARVALHO, RICARDO; BALTAZAR, FATIMA; AGUIAR, CRISTINA: "El propóleo: Un producto natural, complejo con una gran cantidad de actividades biológicas que se pueden explorar para el Desarrollo de Medicamentos". Brasil. 2015.
110. SIMANCAS P, MIGUEL ANGEL; DÍAZ C, ANTONIO JOSE: "Mineral trioxide aggregate in primary teeth pulpotomy. A systematic literature review". Med Oral Patol Oral Cir Bucal. Colombia. 2010.
111. SNYDERMAN, R; PIKE, MC: "Chemoattractant receptors on phagocytic cells". Ann. Rev. Immunol. USA. 1984.
112. SOLÓRZANO VIGILIO, DEYSSI GUISSOLA: "Estudio comparativo in vitro sobre el efecto antibacteriano del extracto de propóleo, paramonoclorofenol alcanforado e hidróxido de calcio en necrosis pulpar". Tesis, Universidad de Huánuco, Escuela Académico Profesional de Odontología, Huánuco. 2011.
113. STANLEY, HR; RANNEY, RR: "Age changes in the human dental pulp". Oral Surg Oral Med Oral Pathol. USA. 1962.
114. STEPHEN, COHEN: "Vías de la Pulpa". 7ª ed. Editorial Harcourt. Madrid. 1999. p. 707.
115. SYDNEY B, FINN: "Odontología Pediátrica". Editorial Iberoamericana. México. 1994. p.189.
116. SZLISKA, EWELINA; KUCHARSKA, ALICJA Z: "Composición química y efecto antiinflamatorio del extracto etanólico de propóleo verde brasilero en macrófagos activados J774A.1". Brasil. 2013.
117. TAKAISIKIKUNI, N; SCHILCHER, H: "Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provenance". Planta Med 60. Université de Kinshasa. République démocratique du Congo. 1994.

118. TAMBILLO G, LUIS; MANCHEGO S, ALBERTO: "Evaluación in vitro de la respuesta leucocitaria de alpacas (*Vicugna pacos*) en presencia de antígenos clostridiales". Lima. 2013.
119. TINOCO CABRIALES, VC; QUESADA CASTILLO, JA; MALDONADO RAMÍREZ, MA; OLIVER PARRA, R; LUNA GOJON, BA: "Muerte leucocitaria por toxicidad del propóleo". Revista Odontológica Mexicana, México. 2013.
120. TJADERHANE, L; LARJAVA, H; SORSA, T; UITTO, VJ; LARMAS, M; SALO, T : "The activation and function of host matrix metalloproteinases in dentin matrix breakdown in caries lesions". Journal Dent Res. Canada. 1998.
121. TJÄDERHANE, L: "The mechanism of pulpal wound healing". Canada. 2002.
122. TÖNDER, KH; NAESS, G: "Nervous control of blood flow in the dental pulp in dogs". Acta Physiol Scandinavia. 1978.
123. TORNEO, CD; EN TEN CATE, AR: "Dentin-pulp complex". Oral histology. Canada. 1980
124. TORNEO, CD: "Intracellular destruction of collagen in the human dental pulp". Arch Oral Biol. Canada. 1978.
125. VAN AMERONGEN, JP; LEMMENS, IG; TONINO, GJ: "The concentration, extractability and characterization of collagen in human dental pulp". Arch Oral Biol. Paises Bajos. 1983.
126. VILLENA MARTINES, H: "Endodoncia Odontología Pediátrica", 1ra ed. Universidad Peruana Cayetano Heredia. Lima. 2005.
127. VONGSAVAN, N; MATTHEWS, B: "Changes in pulpal blood flow and in fluid flow through dentine produced by autonomic and sensory nerve stimulation in the cat". Proc Finnish Dent Soc. Inglaterra. 1992.
128. WANG, K; PING, S; HUANG, S: "Mecanismos moleculares subyacentes a los efectos antiinflamatorios in vitro de extracto etanólico de propóleo chino rico en flavonoides". Evidencias basadas en Medicina Complementaria y Alternativa. China. 2013.
129. WATTS, A; PATERSON, RC: "Migration of materials and microorganisms in the dental pulp of dogs and rats". Journal of Endodontics. Escocia 1982.

130. WEINE, F: "Terapéutica en Endodoncia". 5° ed. Harcourt Brace. 1997. Cap 3. p. 96.
131. WEINE, F: "Terapéutica en Endodoncia". 5° ed. Harcourt Brace. 1997. Cap 3. p. 131.
132. WEINSTOCK, M; LEBLOND, CP: "Synthesis, migration and release of precursor collagen odontoblasts as visualized by radioautography after H-proline administration". J Cell Biol. Canada. 1974.
133. ZACCHRISSEON, BU: "Mast cells in human dental pulp". Arch Oral Biol. Noruega .1971.
134. ZACH, I; TOPAL, R; COHEN, G: "Pulpal repair following operative procedure: radioautographic demonstration with tritiated thymidine". Oral surg. USA. 1969.
135. ZARZARA, PA; ROSENBLATTA, A; TAKAHASHI, CS: "Formocresol mutagenicity following primary tooth pulp therapy: an in vivo study". Journal of Dentistry. Brasil. 2003.
136. ZERLOTTI, E: "Histochemical study of the connective tissue of the dental pulp". Arch Oral Biol. BRasil. 1964.
137. Z PADILLA OROZCO, RAMON: "Comparación de la reacción inflamatoria del tejido pulpar en incisivos inferiores de ratas Sprague – Dawley pulpotomizados, unos tratados con Sulfato Ferrico y otros con Formocresol". Tesis, Universidad Autonoma de Nuevo Leon, Monterrey. 2001.

ANEXOS

ANEXO N° 1

INSTRUMENTO DE RECOLECCION DE DATOS

1. Ficha del comportamiento de la expresión de la IL-1beta en tejido pulpar.

Grupo control				
Expresión de IL-1 beta Tamaño de amplificación (502pb)	T I E M P O	Control	Fecha	Hora
Corrida electroforética para medir IL-1 beta en pares de bases (pb)	48 horas	Muestra N° 1		

2. Ficha del comportamiento de la expresión de la IL-1beta por efecto del propóleo en el tejido pulpar.

Propóleo 20%				
Expresión de IL-1 beta	T I E M P O	Propóleo 20% (50ul)	Fecha	Hora
Tamaño de amplificación (502pb)				
Corrida electroforética para medir IL-1 beta en pares de bases (pb)	12 horas	Muestra N° 2		
	24 horas	Muestra N° 3		
	48 horas	Muestra N° 4		

3. Ficha del comportamiento de la expresión de la IL-1beta por el efecto del formocresol en el tejido pulpar.

Formocresol 1:50				
Expresión de IL-1 beta	T I E M P O	Formocresol 1:50 (50ul)	Fecha	Hora
Corrida electroforética para medir IL-1 beta en pares de bases (pb)	12 horas	Muestra N° 5		
	24 horas	Muestra N° 6		
	48 horas	Muestra N° 7		

ANEXO N° 2

SECUENCIA FOTOGRÁFICA

I. Preparación de Propóleo al 20%

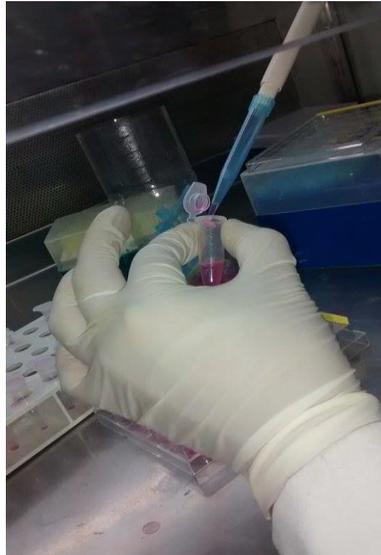
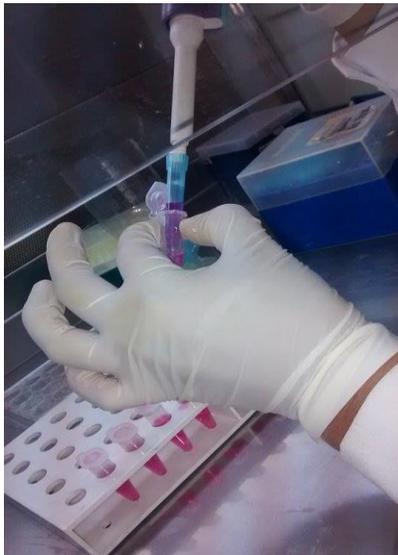


II. Toma de Muestra



III. Incubación del tejido pulpar dental







IV. Aplicación de Estímulos: Propóleo al 20% y Formocresol 1:50

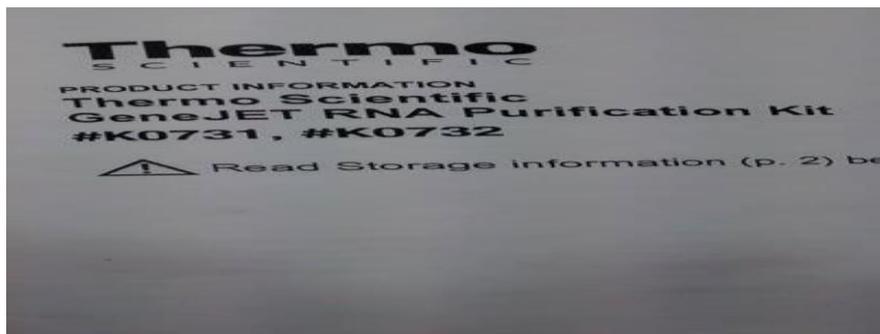




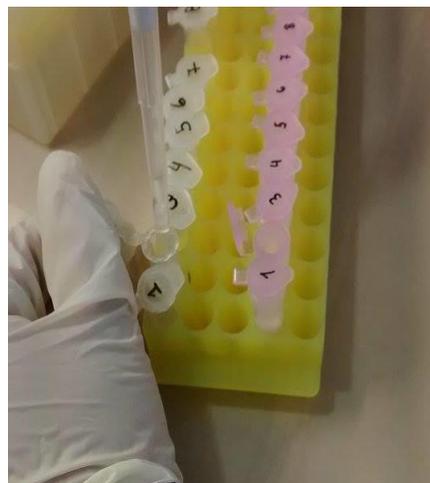
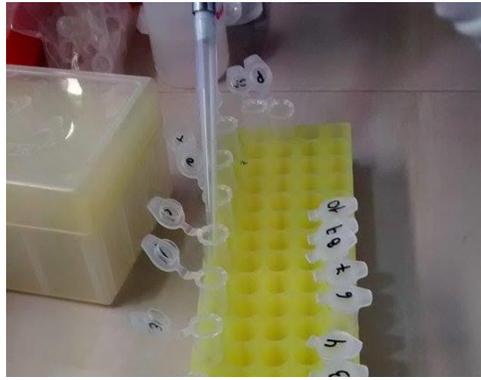
Preservación de las muestras en “ARN later”

V. Obtención de ARN

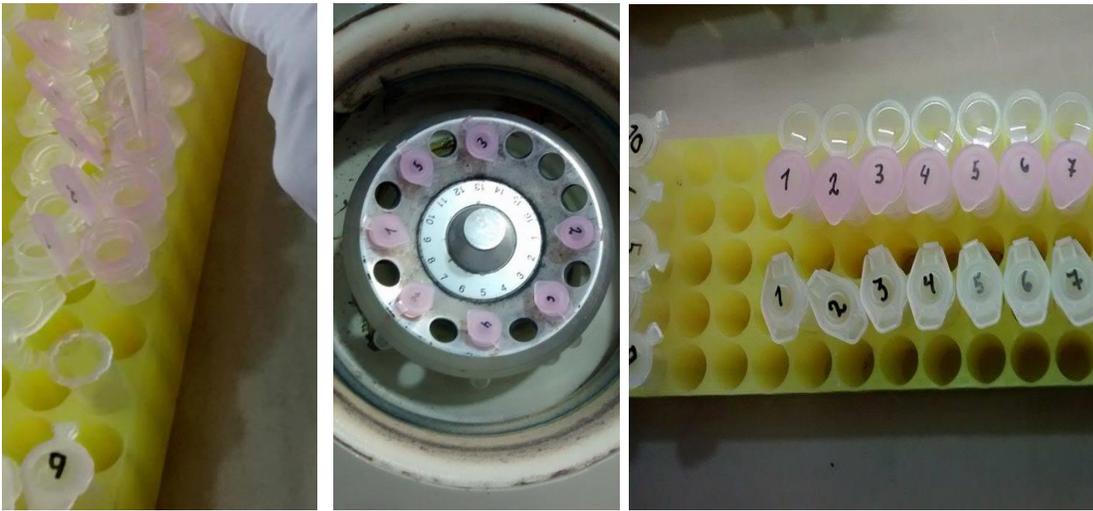
Kit







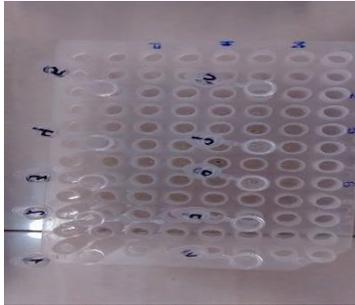




VI. Síntesis de ADNc

Kit



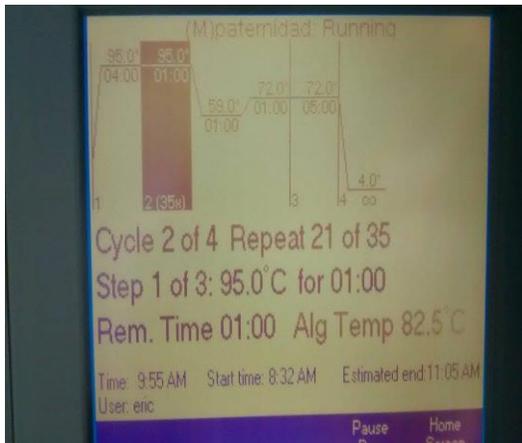




VII. PCR del Gen Beta Actina humana. (control)

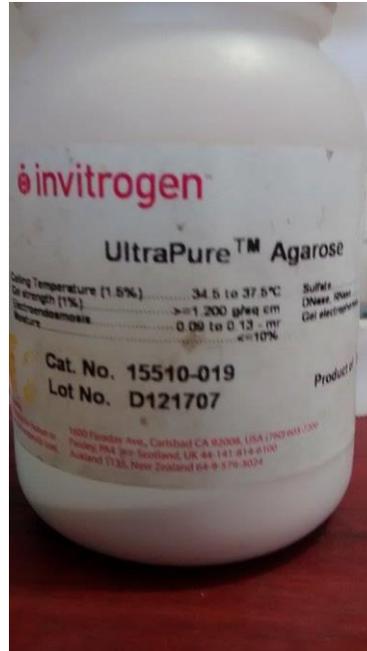
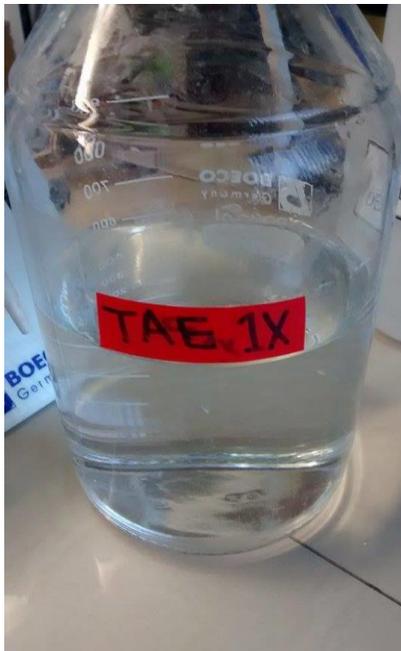


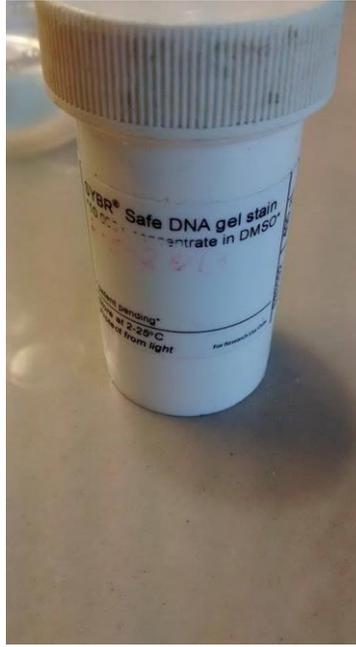
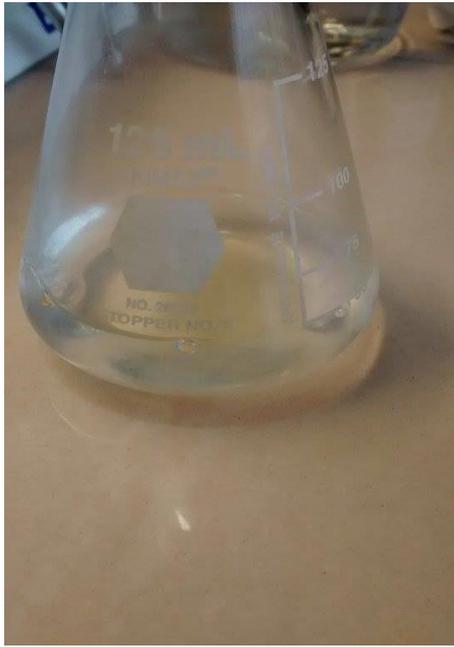




VIII. Electroforesis de los productos de la PCR

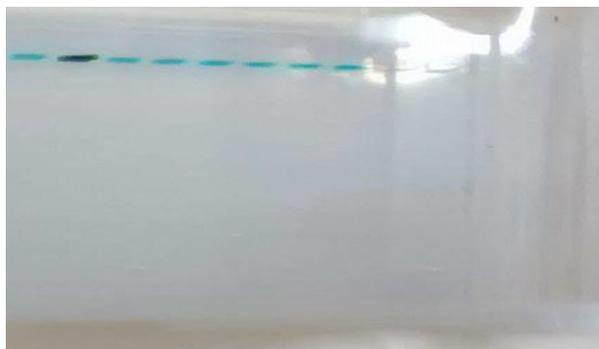
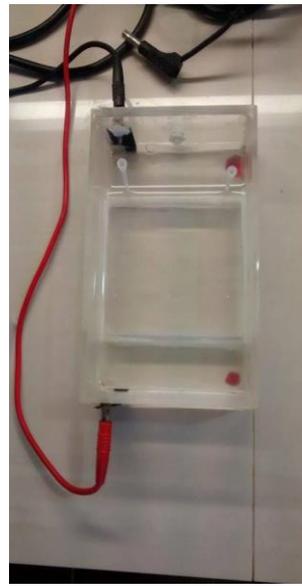
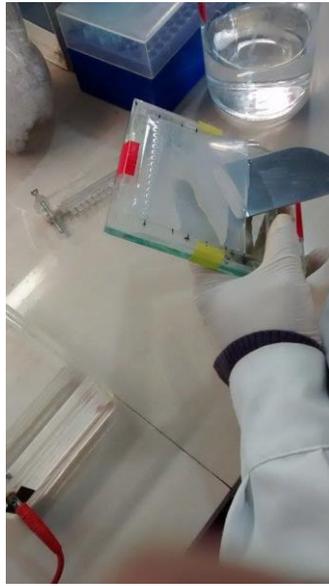
Preparación del Gel de Agarosa

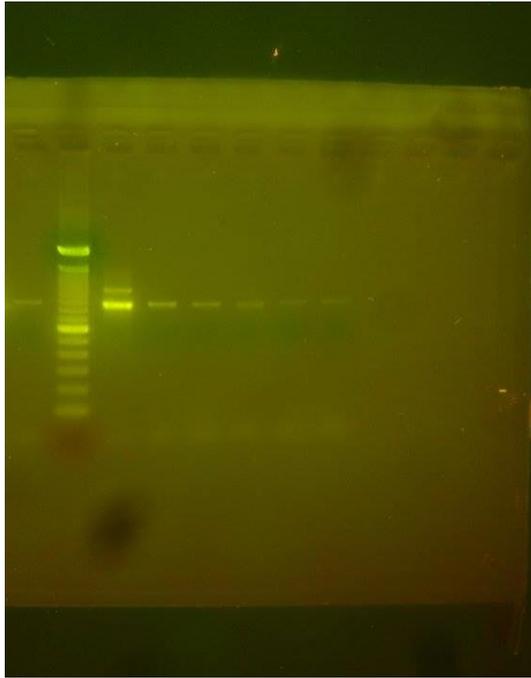
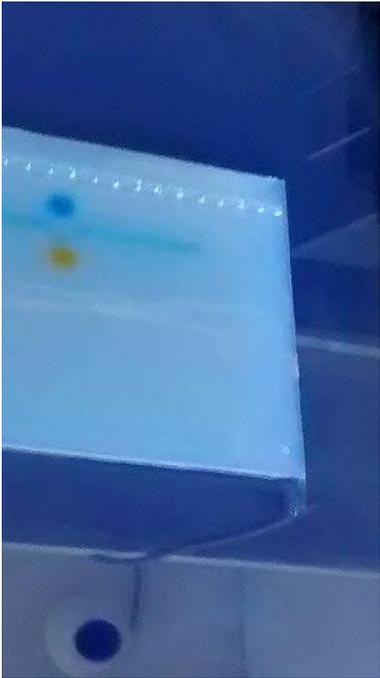
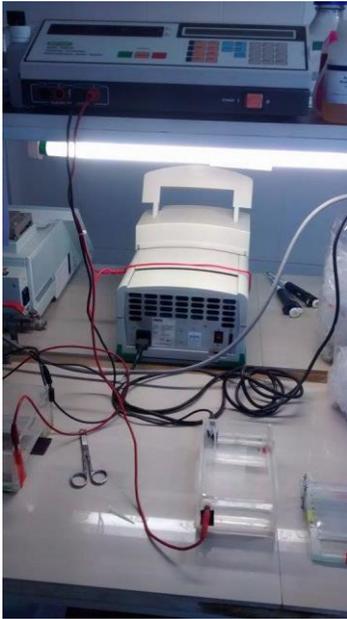




Uso del porta geles y cámara electroforética





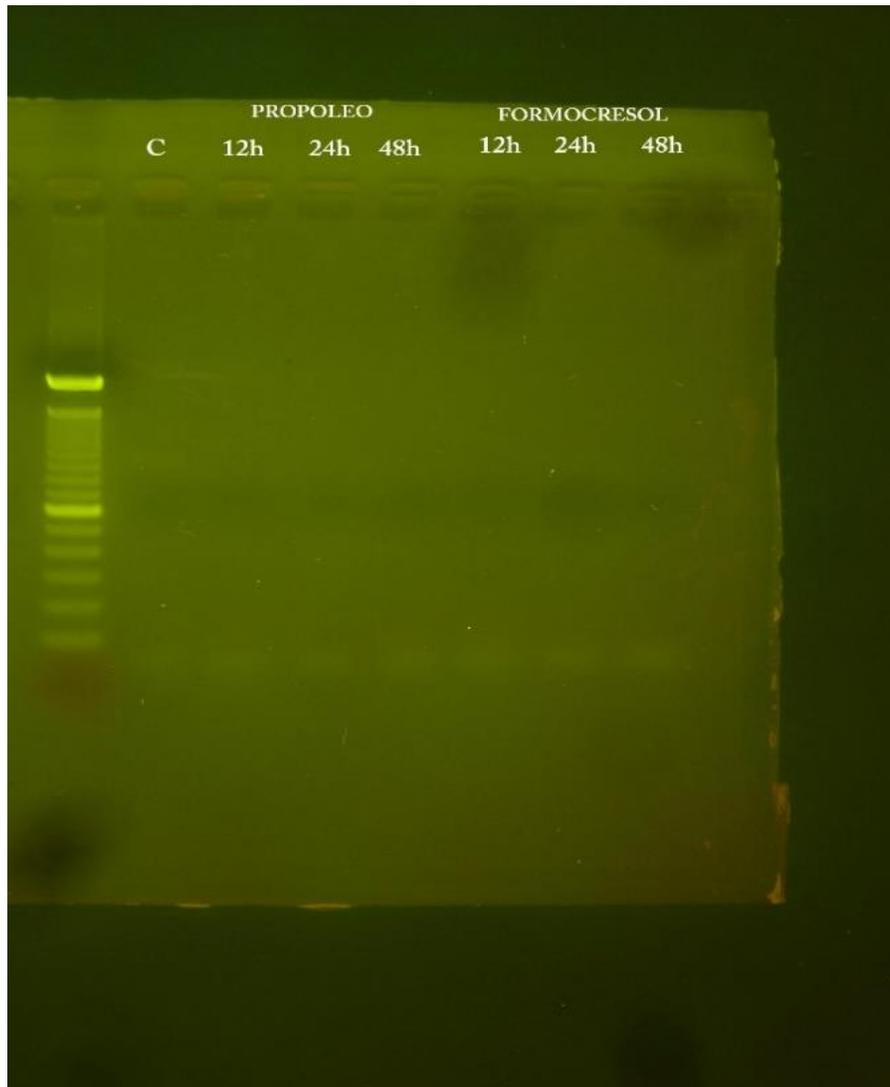


IX. PCR del Gen IL-1beta









ANEXO N° 3



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DEL ADN UCHUMAYO E.I.R.L.

CONSTANCIA

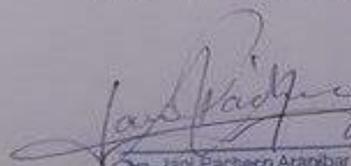
La que suscribe, Gerente del Instituto de Biotecnología del ADN Uchumayo hace constatar que el Sr:

Bachiller Rayniero Alonzo Manrique Rodríguez

Ha realizado la parte experimental de su trabajo de investigación titulado: "Efecto del Propóleo y Formocresol en la expresión de la Interleucina - 1beta (IL -18) de la pulpa dental en pacientes de 12 a 16 años, Arequipa. 2015", en las instalaciones de este laboratorio Molecular, desde el 10 Junio hasta el 9 de Setiembre del 2015.

Se expide la presente constancia a solicitud del interesado, para los fines que cree conveniente.

Arequipa, 9 de Setiembre del 2015


Dra. Jani Pacheco Arambur
GERENTE

