

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS**



**ASOCIACION ENTRE LA PRODUCCION DE PGE₂, CITOQUINAS
PROINFLAMATORIAS E IL-10 EN FIBROBLASTOS PULPARES
HUMANOS ESTIMULADOS CON CAPSAICINA, CON EL RECEPTOR DE
POTENCIAL TRANSITORIO VANILLOIDE SUBTIPO 1 (TRPV1)**

MARIA ALEXANDRA BEDOYA MEJIA

**TRABAJO DE GRADO PARA OPTAR EL TITULO DE MAGISTER EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS**

GLORIA CRISTINA MORENO ABELLO OD MSc.

Tutor

PROGRAMA DE POSGRADO

BOGOTA DC 2011

NOTA DE ADVERTENCIA

"La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará por que no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia".

Artículo 23 de la Resolución No13 de julio de 1946.

TABLA DE CONTENIDO

1. Introducción	6
1. Planteamiento del Problema	8
2. Objetivos	11
2.1. Objetivo General	11
2.2. Objetivos Específicos	11
3. Marco Teórico	12
4. Metodología	24
4.1. Tipo de diseño	24
4.2. Población y muestra	24
4.3. Diseño de la prueba	24
4.3.1 Obtención del tejido pulpar.	24
4.3.2 Cultivo de los FPH	25
4.3.3 Estimulación de los cultivos de FPH con Capsaicina	25
4.3.4 Producción de PGE2 FPH por Capsaicina.	26
4.4. Análisis estadístico	27
5. Resultados	27
6. Discusión	45
7. Conclusiones	53
8. Proyecciones	54

INDICE DE GRAFICAS

Fig.1. Características morfológicas de fibroblastos pulpaes humanos.
Pag.30

Fig.2. Producción de PGE₂ en sobrenadantes FPH, estimulados con Capsaicina. Pag.32

Fig.3. Producción de citoquinas proinflamatorias e IL-10 en sobrenadantes de FPH, estimulados con Capsaicina. Pag.35-36.

RESUMEN

La Capsaicina ha sido utilizada en el control de los procesos inflamatorios ejerciendo su efecto a través del receptor de potencial transitorio vanilloide subtipo 1 (TRPV1). Los fibroblastos pulpaes humanos (FPH) expresan el TRPV1 y aumentan su proliferación en presencia de Capsaicina.. **Objetivo:** Determinar si la Capsaicina afecta la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70 e IL-10, producida por FPH, vía receptor TRPV1. **Materiales y métodos:** En sobrenadantes de FPH en quinto pase sin estímulo o estimulados con Capsaicina 5*10⁻⁵M y 2,5*10⁻⁵M, etanol 0,05%, metanol 0,23% o preincubados con Capsazepina 10μM fueron analizadas las concentraciones de PGE₂ (ELISA), IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70 e IL-10 (CBA) a las 6 y 8 horas **Resultados:** La PGE₂ disminuyó significativamente a las 6 y 8 horas con las dos concentraciones de Capsaicina, pero el efecto está asociado al etanol 0,05%. La Capsaicina 2,5*10⁻⁵M disminuyó la producción de IL-8 (6 y 8 horas) asociada al etanol 0,05%. Se produjo un aumento significativo de IL-12p70 con Capsaicina 5*10⁻⁵M a las 6 y 8 horas y con Capsaicina 2,5*10⁻⁵M a las 8 horas. Se encontró una tendencia a que la Capsaicina 2,5*10⁻⁵M disminuya la IL6 y la IL1β (6 horas). El efecto de la Capsaicina está parcialmente asociado al receptor (TRPV1). La Capsazepina parece tener efecto directo sobre el TRPV1 al analizar la IL-6 y IL-1β, **Conclusión:** El efecto de la Capsaicina está asociado al alcohol y depende tanto de la concentración como del mediador analizado.

1. INTRODUCCION

La exposición de la pulpa dental a trauma por procedimientos de restauración odontológica, resulta en una respuesta inflamatoria caracterizada por una activación vascular que permite la llegada a la zona de leucocitos, los cuales liberan mediadores proinflamatorios que favorecen la reparación del tejido. Sin embargo la característica particular del tejido pulpar de estar confinado en una cámara rígida de dentina, y su particular irrigación sanguínea y linfática, hacen al proceso inflamatorio pulpar difícil de controlar y eliminar generándose procesos inflamatorios irreversible que conlleva a la necrosis del tejido pulpar.¹

Algunos estudios han reportado la presencia de mediadores inflamatorios,^{2, 3,4,5} dentro de los cuales la PGE₂, las citoquinas proinflamatorias IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α e IL-12p70 y la IL-10, son de gran importancia en el control de la inflamación pulpar. Una aproximación farmacológica que permitiera disminuir la concentración de citoquinas proinflamatorias o aumentar la concentración de citoquina antiinflamatorias, permitiría que los procesos inflamatorios iniciales se controlen y así mantener la vitalidad del tejido pulpar.

La Capsaicina (8 metil-N-vanillil-6-nonamida) el principal ingrediente picante del ají o de la pimienta es considerado un agente farmacológico contra el dolor y la inflamación en enfermedades como la artritis reumatoidea y

¹ COHEN S, BURNS C. Pathway of the pulp. Sexta edición. Mosby;2008

² COHEN JS, READER A, FERTEL R, BECK M. MEYERS WJ. A radioimmunoassay determination of the concentration de prostaglandins E₂ and F₂α in painful and asymptomatic human dental pulps. J. Endod. 1983 Aug;11(8):330-5.

³ HUANG GT, POTENTE AP. KIM JW, CHUGAL N. ZHANG X. Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod 1999 Aug;88(2):214-20.

⁴ BARKHORDAR RA, HAYASHI C, HUSSAIN MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. Endod dental traumatol1999 Feb;15(1):26-27.

⁵ HOSOYA S, MATSUSHIMA K. Stimulation of interleukin-1B, production of humna dental pulp cells by porphyromonas endodontalis lipopolysaccharides.J.Endod 1997 Jan; 23(1):39-42.

osteoartritis con éxito clínico.⁶ La acción de la Capsaicina sobre el tejido pulpar, ha sido evidenciada sobre fibroblastos en donde ha favorecido la proliferación y número celular en fase de síntesis⁷, también se ha identificado el receptor para la Capsaicina (TRPV1) y la expresión de IL-6 asociada al receptor.⁸ Buscando controlar la inflamación pulpar en estados iniciales, se propone el uso de fármacos como la Capsaicina, que puedan modular la producción de mediadores de la inflamación como la PGE₂, citoquinas proinflamatorias e IL-10 buscando mantener la vitalidad del tejido pulpar.

El objetivo de esta investigación fue determinar si la Capsaicina afecta la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70 E IL-10 producida por FPH, vía receptor TRPV1.

⁶ HAUTKAPPE M, ROIZEN MF, TOLEDANO A, ROTH S, JEFFRIES JA, OSTERMEIER AM. Review of the effectiveness capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. Clin J Pain. 1998 Jun;14(2):97-106.

⁷ MORENO G, CAVIEDES J, GONZALES J. Efecto de la capsaicina sobre la proliferación y ciclo celular de fibroblastos pulpares humanos. Federación Odontológica Colombiana. 2002:89-99.

⁸ MIYAMOTO R, TOKUDA M, SAKUTA T, NAGAOKA S, TORII M, MĀSAYUKI T, TETSUYA S, SHIGETAKA N, MITSUO T. Expression and characterization of vanilloid receptor subtype 1 in human dental pulp cell cultures. J. Endod. 2005 Sep;31(9):652-658.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pulpa dental, como cualquier otro tejido conectivo, responde a la agresión con procesos inflamatorios, buscando eliminar el patógeno y permitir reparación. Sin embargo, debido a sus características particulares como el estar confinada en una cámara rígida de dentina y su particular irrigación sanguínea y linfática hacen al proceso inflamatorio pulpar difícil de controlar y eliminar.⁹ Así, el entender la inflamación pulpar es esencial para proveer estrategias y un mejor manejo del tejido lesionado, evitando que se inicien procesos de necrosis pulpar que se manejan con procedimientos de endodoncia convencional dejando el diente sin vitalidad.

Generalmente, durante los primeros momentos del proceso inflamatorio se observa vasodilatación y aumento en la permeabilidad vascular, seguido de migración leucocitaria y de proteínas del plasma, permitiéndose la liberación de mediadores inflamatorios a la zona afectada.¹⁰ La mayoría de las veces, estas sustancias son citoquinas, producidas y liberadas por un gran número de células presentes en la pulpa dental y juegan un rol importante en la activación y control del proceso inflamatorio. Algunos estudios han reportado la presencia de estas sustancias en el tejido o células de pulpa dental^{11,12,13} y la PGE₂, IL-8, IL-6 y IL-1 β entre otras, son de gran importancia en el estudio de los tejidos inflamados.

⁹ COHEN S, BURNS C. op.cit:2008

¹⁰ ABBAS A. Inmunología celular y molecular. 2008.Pag 277.

¹¹ HOSOYA S, MATSUSHIMA K. op.cit. pag:39-42.

¹² HUANG GT, POTENTE AP, KIM JW, CHUGAL N, ZHANG X.op.cit. pag;214-20.

¹³ BARKHORDAN RA, HAYASHI C, HUSSAIN MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. Endodontic and dental traumatology1999;15:26-27.

Las prostaglandinas (PG), especialmente la PGE₂, se han encontrado niveles altos en pulpas inflamadas y con sintomatología dolorosa, en contraste con lo encontrado en pulpas asintomáticas.¹⁴

Para la IL-6, se ha identificado su aumento en tejido pulpar humano inflamado, lesiones periapicales¹⁵, y en cultivo *in vitro* de células de pulpa dental estimuladas con lipopolisacáridos de *prevotella intermedia*.¹⁶ Por otro lado se ha detectado la expresión de IL-8 e IL-1β, en cultivos de fibroblastos de tejido pulpar humano, estimulados por lipopolisacáridos de *prevotella intermedia* y *porfiromona endodontalis* respectivamente, demostrando que las células de la pulpa dental generan una respuesta inmune que se manifiesta en los procesos inflamatorios pulpares.¹⁷

Buscando controlar la inflamación pulpar en estados iniciales, se propone el uso de fármacos como la Capsaicina, que puedan modular la producción de mediadores de la inflamación como la PGE₂, citoquinas inflamatorias como IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α e IL-12p70 y antiinflamatorias como la IL-10, buscando que se mantenga la vitalidad del tejido pulpar. Estudios previos, muestran el efecto antiinflamatorio¹⁸ ejercido por la Capsaicina y a nivel de la pulpa dental efectos de proliferación de fibroblastos pulpares humanos¹⁹. Contando con este antecedente, el propósito de este estudio, fue analizar el efecto de la Capsaicina sobre fibroblastos pulpares humanos (mayor población celular de la pulpa dental), en la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-

¹⁴COHEN J, READER A, FERTEL R, BECK M. A radioimmunoassay determination of the concentration of prostaglandins E2 AND F2α in painful and asymptomatic human dental pulps. J Endodon 1983;11:330-5.

¹⁵BARKHORDAR RA, HAYASHI C, HUSSAIN MZ. Op.cit.pag:26-27.

¹⁶TOKUDA M, SAKUTA T, FUSHUKU A, TORII M, NAGAOKA S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with *prevotella intermedia* lipopolysaccharide. J.Endod.2001 Apr;27(4):273-277.

¹⁷NAGAOKA S, TOKUDA M, SAKUTA T, TAKETOSHI Y, TAMURA M, TAKADA H, TAWAGOE M. interleukin- 8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with *prevotella intermedia* lipopolysaccharide. J.Endod. 1996 Jan;22(1):9-12.

¹⁸MATUCCI C, McCARTHY G. Neurogenic influences in arthritis: potencial modifications by capsaicin. J Rheumathol. 1995;22:147-49.

¹⁹MORENO G, CAVIEDES J,GONZALES J. op.cit. pag:89-99.

1 β , TNF- α e IL-12p70 y antiinflamatorias como la IL-10 y si dicha producción se encuentra relacionada con la unión al receptor TRPV1.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Determinar si la Capsaicina afecta la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70 E IL-10 producida por FPH, vía receptor TRPV1.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1. Establecer la concentración de Capsaicina que produce el mejor efecto sobre la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70 e IL-10 producida por FPH.

3.2.2. Identificar el tiempo en el cual se observa el mejor efecto de la Capsaicina sobre la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70 e IL-10 en FPH.

3.2.3. Determinar si el efecto de la Capsaicina sobre la PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1β, TNF-α, IL-12p70 e IL-10 en FPH, está asociada a la activación del receptor TRPV1.

4. MARCO TEORICO

La inflamación en el tejido pulpar incluye un acumulo de mediadores como las prostaglandinas (PGs) que ocasionan vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular en los sitios de inflamación, potencialización en forma acentuada de la formación de edema, fiebre e infiltración leucocitaria al promover el flujo sanguíneo a la región inflamada. Además potencializan la actividad analgésica de la bradiquinina y otras sustancias relacionadas con el dolor.²⁰. Las PGs son un conjunto de sustancias que pertenecen a los ácidos grasos de 20 carbonos (eicosanoides), que contienen un anillo ciclo pentano y constituyen una familia de mediadores celulares, de procesos fisiológicos y patológicos. Se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción de diferentes enzimas como cicloxigenasas, lipoxigenasas, el citocromo P-450 y peroxidases. Las cicloxigenasas (COX-1) y (COX-2) dan lugar a prostaglandinas PG, tromboxano A-II y prostaciclina (PGI₂); la lipoxigenasa da lugar a los ácidos HPETEs, HETE y leucotrienos. La vía por la cual el ácido araquidónico se metaboliza a eicosanoides depende del tejido, del estímulo, de la presencia de inductores o inhibidores endógenos y farmacológicos.²¹. La PGE₂ es producida por todas las células, exceptuando los glóbulos rojos. Se ha demostrado que las PGs están involucradas en la patogenicidad de enfermedades pulpares, encontrándose niveles altos de PGE₂ y PGF₂ α en pulpas inflamadas y con sintomatología dolorosa, contrario a lo encontrado en pulpas asintomáticas.²²

²⁰ MALE D, BROSTOFF J, ROTH D, ROITT I. Immunology. Seventh edition, Mosby Elsevier. 2006;140-141.

²¹ COOPER G, ASUMAN R. La célula. Marban. 2006. 548-549.

²² COHEN JS, READER A, FERTEL R, BECK M. MEYERS WJ. Op.cit.pag:330-5.

Además de la PGE₂, a nivel del tejido pulpar, se han identificado otros mediadores inflamatorios como la interleuquina 1β (IL-1)²³, interleuquina 6 (IL-6)²⁴, interleuquina 8 (IL-8)²⁵, interleuquina 10(IL-10)²⁶, el factor de necrosis tumoral (TNF)²⁷ y interleuquina 12 (IL-12p70)²⁸, que son el prototipo de citoquinas asociadas a respuestas inflamatorias, las cuales inducen vasodilatación, permeabilidad vascular y aumento en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa.²⁹

La IL-8 es una citoquina sintetizada por una variedad de tipos celulares que incluye monocitos, eosinófilos, granulocitos, células tumorales, fibroblastos, queratinocitos, macrófagos, linfocitos T y células endoteliales. Muchos agentes aumentan su regulación incluyendo endotoxinas, agentes infecciosos, IL-1 y TNFα. La IL-8 es un quimioattractante de LT CD4+ y CD8+ y neutrófilos induciendo a estos a expresar β integrinas y a extravasarse a través del endotelio vascular, estimulando su activación y degranulación. A nivel de los basófilos actúa activando e induciendo su migración vaso endotelial.³⁰ Originalmente fue identificada como una citoquina quimioattractante de neutrófilos, actualmente se considera una quimoquina del grupo α, siendo agrupadas por la similitud en su actividad quimioatrayente, utilización de receptor, localización genómica y la presencia

²³ HOSOYA S, MATSUSHIMA K. op.cit. pag:39-42.

²⁴ BARKHORDAR RA, HAYASHI C, HUSSAIN MZ. Op.cit. pag:26-27.

²⁵ HUANG GT, POTENTE AP, KIM JW, CHUGAL N, ZHANG X. op.cit. pag:214-20.

²⁶ TOKUDA M, NAGAOKA S, TORII M. Interleukin-10 inhibits expression of interleukine-6,IL-8 mRNA in human dental pulp cell cultures via nuclear factor-kappaB deactivation. J Endod.2002 Mar;28(3):177-80

²⁷ COIL J. TAM E, WATERFIELD JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides and methyl mercapta. J Endod;2004 Feb:30(2);88-91.

²⁸ HAHN CL, BEST AM, TEW JG. Citokine induction by streptococcus mutans and pulpal pathogenesis. Infect Immun. 2000 Dec.68(12);6785-6789.

²⁹ PAUL W. fundamental immunology.2008,106.

³⁰ MAK T, SIMARD J Handbook of immune response. 1998. Pag. 255

de cuatro residuos de cisteína separados por un aminoácido (Cys-X-Cys-X o C-X-C), siendo secretada como dímero o trímero.³¹

Esta citoquina IL-8, es producida y liberada por un gran número de células a nivel del tejido pulpar, jugando un papel importante en la activación del proceso inflamatorio. Varios estudios han demostrado la expresión de la IL-8 a nivel del tejido pulpar en concentraciones altas en pulpas dentales diagnosticadas como pulpitis irreversible y muy pocas cantidades en pulpas normales, siendo analizadas por análisis inmunohistoquímico.³² A nivel de fibroblastos de pulpa dental se ha identificado la expresión y la secreción de esta citoquina después de ser estimulados con LPS de *Prevotella intermedia* y citoquinas proinflamatorias, por medio de Northern blot y ELISA respectivamente.³³

Otra citoquina que debemos estudiar en los tejidos inflamados es la IL-6 conocida como factor estimulador de las células B (BSF-2), reflejando su habilidad de inducir diferenciación de células B a células secretoras de anticuerpos. La IL-6 es producida por la mayoría de los tipos celulares, incluyendo Linfocitos T, Linfocitos B, macrófagos, monocitos, neutrófilos, mastocitos, osteoblastos, condrocitos, células dendríticas, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos y células de microglia.³⁴ La función más importante de la IL-6, es la inducción de la síntesis y secreción de proteínas de la fase aguda, generando inducción elevada de los niveles de fibrinógeno en suero, proteína C reactiva y disminución de los niveles de albumina, fibronectina y transferrina. La IL-6 también ha sido importante en la regulación de la actividad de los neutrófilos, además de proveer una señal coestimuladora para la activación de los linfocitos T y células NK. Su

³¹ MAK T, SIMARD J. op.cit. Pag. 255

^{32,32} HUANG GT, POTENTE AP. Op.cit. pag:214-20.

³³ NAGAOKA S, TOKUDA M, SAKUTA T, TAKETOSHI Y, TAMURA M, TAKADA H, TAWAGOE M. op.cit. pag :9-12.

³⁴ MAK T, SIMARD J Handbook of immune response. 1998. Pag. 236

deficiencia genera una disminución en el número de células progenitoras de linaje monocito-granulocito, megacariocito y eritrocito.³⁵

A nivel del tejido pulpar, se ha identificado la presencia de IL-6 tanto en tejido de pulpa inflamada como en lesiones periapicales de origen pulpar utilizando ELISA,³⁶ además de identificarse su expresión en cultivos de fibroblastos pulpares humanos estimulados con LPS de *Prevotella intermedia*, por medio de análisis de Northern blot e inmuno ensayos.³⁷ La expresión de IL-6 fue identificada en cultivos de FPH estimulados con Capsaicina 10^{-4} M y Capsazepina 30uM (antagonista del receptor TRPV1) utilizando ELISA, indicando que su expresión estuvo aumentada y está relacionada con la activación del receptor TRPV1.³⁸

La IL-1 α y la IL-1 β son otras citoquinas identificadas en procesos inflamatorios, las cuales son sintetizadas por la mayoría de tipos celulares incluyendo monocitos/macrófagos, células endoteliales y fibroblastos. Sus características cualitativas son similares, comportándose como activadores celulares, así la IL-1, se considera como una citoquina que aumenta la activación de linfocitos T a producir IL-2 y IL-2R. Es un coestimulante de la proliferación de LB 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 ICAM-1 y VCAM en células endoteliales, IL-2R α en Linfocitos T y en dosis alta induce reabsorción de

³⁵ MAK T, SIMARD J. op.cit. Pag. 236

³⁶ BARKHORDAR RA, HAYASHI C, HUSSAIN MZ. Op.cit.pag:26-27.

³⁷ TOKUDA M, SAKUTA T, FUSHUKU A, TORII M, NAGAOKA S. op.cit. pag :273-277.

³⁸ MIYAMOTO R, TOKUDA M, SAKUTA T, NAGAOKA S, TORII M. Op.cit. pag.:652-658.

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.³⁹

Diferentes estudios han identificado la presencia de IL-1 β en tejido pulpar inflamado.^{40 41} 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. 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 .⁴²

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.⁴³ Estudios de inmunohistoquímica indican la producción de TNF α , IL-1e IL-6 a nivel de FPH estimulados con LPS de bacterias gran-negativas y mercaptano.⁴⁴

³⁹ MEYERS R. IMMUNOLOGY. From cell biology to disease. 2007. Pag 188.

⁴⁰ BARKHORDAR RA GHANI QP, RUSSELL TR, HUSSAIN MZ. Interleukin-1 β activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. J Endod. 2002 Mar;28(3):157-9.

⁴¹ D'SOUZA R, BROWN JR. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. Arch Oral Biol. 1989;34(5):307-13.

⁴² HOSOYA S, MATSUSHIMA K, OHBAYASHI E, YAMAZAKI M, SHIBATA Y, ABIKO Y. Stimulation of interleukine-1 β -independent interleukine-6 production in human dental pulp cells by lipopolysaccharide. Biochem mol med..1996 Dec; 59(2):138-143.

⁴³ ABBAS A. op.cit. Pag 277.

⁴⁴ COIL J. TAM E, WATERFIELD JD. op.cit. pag:88-91.

La IL-10 es una citoquina producida por macrófagos, células T, células B y queratinocitos, cuya acción está dirigida a inhibir las citoquinas producidas por linfocitos Th1, suprime la función de los macrófagos, especialmente la producción de citoquinas inflamatorias. Favorece la proliferación de linfocitos B y síntesis de inmunoglobulinas y actúa como factor de crecimiento para tumores de células B.⁴⁵ A nivel de cultivo de células de tejido pulpar humano, ha sido demostrada por medio de RT-PCR, la capacidad de la IL-10 de inhibir la expresión de ARNm de IL-6 e IL-8.⁴⁶

La IL-12 también es una citoquina pro-inflamatoria, producida por macrófagos y células dendríticas y fibroblastos pulpares, cuya acción está dirigida principalmente estimular la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes en LT Th1, mediando la inmunidad celular. Esta induce la producción de IFN γ con la IL-18 como coestimulante y estimula la activación y proliferación de NK y células T maduras (LTC).⁴⁷ A nivel de tejido pulpar humano se han realizado estudios de extracción de ADN y RT-PCR, demostrado la capacidad del *Streptococo mutans* causante de la caries dental, de estimular linfocitos T e inducir la expresión de múltiples ARNm de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , IL-4, IL-12 e IL-10 que inducían patología pulpar.⁴⁸

Teniendo en cuenta que estos medidores están presentes en los procesos inflamatorios a nivel del tejido pulpar humano, se propone el uso de fármacos como la Capsaicina sobre FPH, cuyo efecto sea controlar la producción de PGE₂ y citoquinas pro-inflamatorias que permita disminuir el proceso inflamatorio pulpar impidiendo que la inflamación sea irreversible.

⁴⁵ MEYERS R. op.cit. Pag 188.

⁴⁶ TOKUDA M, NAGAOKA S, TORII M. op.cit. pag: 177-180

⁴⁷ MEYERS R. op.cit. Pag 188.

⁴⁸ HAHN CL, BEST AM, TEW JG. Op.cit.pag:6785-6789.

La Capsaicina es una neurotoxina constituyente activo de una gran variedad de chiles del género *capsicum*, consumido por gran parte de la población mundial.⁴⁹ Su nombre químico es (8 methyl-N-vanillyl-6-nonenamide) cuya fórmula es C₁₈H₂₇NO₃, peso molecular de 305,64g/mol, punto de fusión de 64,5°C, formando cristales blancos y translucidos.⁵⁰ La Capsaicina es insoluble en agua, sorbitol y glicerina líquida y solubles en aceites minerales, alcohol etílico, éter, cloroformo y benceno. La palabra Capsaicina proviene del griego *kapso* que significa picante y es un compuesto que químicamente se conoce con el nombre de vanillilamida del ácido pelargónico. Se ha demostrado que la reacción de la vanillilamida y el componente ácido de la capsaicina produce un producto de las mismas propiedades físicas, químicas y picantes de la capsaicina natural.⁵¹

Al ser la Capsaicina una molécula liposoluble, cuando es inyectada en el organismo se incorpora y traspasa el endotelio a través de canales de intercambio iónico, siendo un agente farmacológico utilizado contra el dolor y la inflamación en enfermedades como la artritis reumatoidea y osteoartritis con éxito clínico.⁵² El mecanismo de acción de la Capsaicina consiste en la liberación rápida de neurotransmisores y neuropéptidos como la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), de las terminaciones nerviosas, que cuando es aplicada tópicamente genera una sensación de irritación. La continua aplicación de Capsaicina induce la disminución en la liberación de neurotransmisores y neuropéptidos impidiendo la transmisión de dolor y favoreciendo la analgesia.⁵³

⁴⁹ BUCK SH, BURKS TF. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. *Pharmacol rev.* 1986 Sep;38(3):179-225.

⁵⁰ BUCK SH, BURKS TF. *Ibid.* pag:179-225.

⁵¹ GEOFFREY A, ARAUJO O. Capsaicin: identification, nomenclature and pharmacotherapy. *Ann Pharmacother*, 1993;27:330-336

⁵² HAUTKAPPE M, ROIZEN MF, TOLEDANO A, ROTH S, JEFFRIES JA, OSTERMEIER AM. *Op.cit.* pag:97-106.

⁵³ BUCK SH, BURK TF. *Op.cit.* pag:179-225.

Aunque existe poca evidencia de la presencia de receptores para la Capsaicina en tipos celulares diferentes a las neuronas, algunos estudios han mostrado la acción directa de este vanilloide sobre otros tipos celulares. Los efectos de la Capsaicina, sobre sinoviocitos *in vitro*, muestra una acción directa sobre proliferación en concentraciones de 10^{-6} M, síntesis de DNA en concentraciones de 10^{-8} M, síntesis de colagenasa en ambas concentraciones y aumentaba la síntesis de PGs en concentraciones de 10^{-8} M.⁵⁴ La Capsaicina también ha sido estudiada en fibroblastos pulpaes donde se encontró que en concentraciones de 10^{-4} M y $5 \cdot 10^{-5}$ M, induce la proliferación celular y aumenta el número de células en fase de síntesis.⁵⁵

La sensibilidad a la Capsaicina de ciertas neuronas aferentes es debida a la selectividad que presenta este compuesto por un sitio de reconocimiento específico de membrana que está unido a canales catiónicos de la membrana celular, conocidos como receptores para Vanilloides subtipo 1 (VR1,TRPV1).⁵⁶

Este receptor vanilloide subtipo 1 (VR1) es un canal catiónicos no selectivo con una gran permeabilidad a los iones de calcio, identificado como miembro de la familia de receptores de potencial transitorio de canales catiónicos siendo asignado a la nomenclatura como (TRPV1) para denotar esta asociación.⁵⁷

El TRPV1 es una proteína de 95kDa, con 838 aminoácidos, conformando seis dominios transmembrana (TM), con una pequeña zona con poro entre el dominio 5 y 6 TM. El receptor es activado por estímulos como el calor en un

⁵⁴ MATUCCI M, MARABINI S, JANTSCH S, CAGNONI M, PARTSCH G. Effects of capsaicin on the metabolism of rheumatoid arthritis synoviocytes in vitro. Ann Rheum Dis.1990 Aug;49(8):598-602.

⁵⁵ MORENO G, CAVIEDES J. op.cit. pag:89-99.

⁵⁶ CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M, ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 1997 Oct;389(6653):816-24.

⁵⁷ PINGLE SC, MATTA JA, AHERN GP. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. Handb Exp Pharmacol. 2007(179);155-171.

rango aproximado de 43°C en una membrana en reposo (-60mV), vanilloide y lípidos como la Capsaicina y compuestos similares como resiniferatoxina RTX y olvanil que son altamente lipofílicos y comparte una estructura similar a varios ácidos grasos endógenos que también han sido identificados como agonistas de TRPV1. Estos lípidos pueden activar el TRPV1 al interactuar en los sitios de unión de vanilloides, en las regiones intracelulares de TRPV1. Varios segundos mensajeros afectan la actividad de TRPV1, predominantemente por fosforilación de residuos específicos de PKA, PKC y CaMKII en el receptor. Concentraciones en el ambiente extracelular mayores a (pH<6), también activan directamente el receptor.⁵⁸

Después de la activación del TRPV1 viene la de-sensibilización. Este fenómeno puede ocurrir rápidamente durante una aplicación única rápida del agonista, o despacio con la aplicación repetitiva del agonista. La de sensibilización se cree que ocurre predominantemente vía dependiente de Ca²⁺, porque se elimina completamente con la utilización de quelantes. El mecanismo dependiente de Ca²⁺ se desarrolla porque el TRPV1 tiene una gran permeabilidad a Calcio, permitiendo su influjo a través del canal que activa una señal inhibitoria de retroalimentación.⁵⁹

El TRPV1 se expresa principalmente en neuronas sensoriales de pequeño diámetro y células no neuronales como queratinocitos⁶⁰, células epiteliales, fibroblastos de piel, cardiomiocitos⁶¹ y sinoviocitos.⁶² El TRPV1 epidermal activado por la Capsaicina induce mediadores pro inflamatorios como COX-2,

⁵⁸ PINGLE SC, MATTA JA, AHERN GP. Op.cit. pag:155-171.

⁵⁹ PINGLE SC, MATTA JA, AHERN GP. op.cit. pag:155-171.

⁶⁰ DENDA M, FUZIWARA S, INOUE K, DENDA S, AKAMATSU H, TOMITAKA A, MATSUNAGA K. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocytes of human skin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Aug;285(5):1250-2.

⁶¹ DVORAKOVA M, KUMMER W. Transiente expresión of vanilloid receptor subtype 1 in rat cardiomyocytes during development. *Histochem cell Biol.* 2001 Sep;116(3):223-5.

⁶² PARTSCH G, MATUCCI-CERINIC M, MARABINI S, JANTSCH S, PIGNONE A, CAGNONI M.. Collagenase synthesis of rheumatoid synoviocytes: Dose-dependent stimulation by substance P and Capsaicin. *Scand J Rheumatol.*1991;20(2):98-103

IL-8, PGE₂ en la piel.⁶³ En células epiteliales bronquiales, la Capsaicina estimula la liberación de citoquinas pro inflamatorias, a través de la activación del receptor TRPV1.⁶⁴ En el área dental, TRPV1 ha sido encontrado en neuronas aferentes primarias de dientes de ratas.⁶⁵ En pulpa dental bovina, la activación de TRPV1 por la Capsaicina induce la liberación de neuropéptidos como CGRP, siendo su expresión inhibida por su antagonista Capsazepina.⁶⁶ Miyamoto y col. reportaron la expresión del receptor vanilloide subtipo 1 (VR1, TRPV1) en fibroblastos de pulpa dental, utilizando RT-PCR, western blot, y análisis de inmunohistoquímica y demostraron que la Capsaicina 10⁻⁴M indujo la expresión de la producción de IL-6, en PF-10 estando su expresión relacionada con la activación del receptor TPRV1.⁶⁷ Para la obtención *in vitro* de FPH, se han establecido protocolos de cultivo,⁶⁸ los cuales nos permiten obtener fibroblastos pulpares, fenotípicamente identificados. Aproximadamente entre los 10 y 20 días de cultivo, se observan células similares a los fibroblastos caracterizadas por ser poco móviles, con ausencia de vesículas lipídicas, con propiedades osteogénicas como la formación de nódulos de mineralización en su citoplasma, actividad de fosfatasa alcalina, producción de colágeno tipo I, fibronectina y osteonectina.⁶⁹ Es importante anotar que las células pulpares que emergen del explante en los estadios iniciales del crecimiento, no son similares en

⁶³ SOUTHALL MD, LI T, GHARIBOVA LS, PEI Y, NICOL GD, TRAVERS JB. Activation of epidermal vanilloide receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. J Pharmacol Exp Ther 2003;304(1):217-22.

⁶⁴ VERONESI B, CARTER JD, DEVLIN RB, SIMON SA, OORTGIESEN M. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. Neuropeptides. 1999 Dec;33(6):447-56.

⁶⁵ CHAUDHARY P, MARTENSON ME, BAUMANN TK. Vanilloid receptor expresión and capsaicin excitation of rat dental primary afferent neurons. J Dent Res. 2001;116:223-5.

⁶⁶ HARGREAVES KM, JACKSON DL, BOWLES WR. Adrenergic regulation of capsaicin-sensitive neurons in dental pulp. J Endod. 2003;29(6):397-9.

⁶⁷ MIYAMOTO R, TOKUDA M, SAKUTA T, NAGAOKA S, TORII M. op.cit. pag:652-658.

⁶⁸ STANISLAWSKI L, CARREAU JP, POUCHETLET M, CHEN ZH. GOLDBERG M.. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cell emerging early from the explant. Clin Oral Investing. 1997 Sep;1(3):131-140.

⁶⁹ TSUKAMOTO Y, FUKUTANI S, SHIN-IKE T, KUBOTA T, SATO S, SUZUKI Y, MORI M. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblast. Arch Oral Biol. 1992 Dec; 37(12):1045-1055.

morfología ni histología a los fibroblastos, sin embargo a los pocos días de crecimiento se presenta una diferenciación celular *in vitro* hacia células similares a los fibroblastos.⁷⁰

Las células que crecen del explante se detectan aproximadamente entre los 4-7 días posteriores a la siembra del cultivo. Estas células morfológicamente son esféricas, y algunas veces se observan en grupos. Cuando se observa con microscopio de interferencia, las células se observan con una superficie rugosa y una protrusión similar a un cabello delgado, representando una microvelocidad. El explante mismo se observa con características de estructuras fibrilares que corren desde el centro a la periferia. Después de un tiempo que varía entre 1 y 7 días, las células se adhieren a la superficie plástica y se observan planas con una superficie lisa. Luego se observan elongadas, con formas irregulares y algunas con una delgada proyección. Se observa en este primer estadio una alta movilidad de numerosas pequeñas vesículas lipídicas originadas por macropinocitosis. Después de la primera tripsinación o primer pase (aproximadamente 12 días), las células pulpares proliferan hasta formar una monocapa confluyente. Entre los 15 y 20 días posterior a la tripsinación, las células pulpares poseen una marcación positiva fuerte para la Fosfatasa Alcalina. A este nivel las células crecen en varias capas que forman lo que se conoce como nódulos celulares que se asocian a estructuras cristalinas que contienen calcio y fósforo. Estas células que crecen en varias capas se asemejan a rosetas y representan zonas de mayor adherencia.⁷¹

Este segundo estadio de cultivo (10-20 días) representa el momento donde las células espontáneamente inician un cambio morfológico similar a los

⁷⁰ STANISLAWSKI L, CARREAU JP, POUCHETLET M, CHEN ZH, GOLDBERG M. Op.cit. pag:131-140.

⁷¹ STANISLAWSKI L, CARREAU JP, POUCHETLET M, CHEN ZH, GOLDBERG M. Op.cit. pag:131-140.

fibroblastos, las cuales son menos móviles y no poseen vesículas lipídicas. Se considera que las células del primer estadio representan células mesenquimales embrionarias que en un segundo estadio se diferencian en fibroblastos funcionales. De esta manera se establece una obtención *in vitro* de fibroblastos pulpaes con características y funciones similares a los presentes en tejido pulpar humano, para ser utilizados en experimentación.⁷²

Teniendo en cuenta lo anterior, se propuso desarrollar un estudio *in vitro* en donde se evalué si la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 e IL-10 en fibroblastos pulpaes humanos estimulados con Capsaicina a diferentes concentraciones, se encuentran afectadas y están asociadas al receptor de potencial transitorio vanilloide subtipo 1 (TPRV1).

⁷² STANISLAWSKI L, CARREAU JP, POUCHETLET M, CHEN ZH, GOLDBERG M. Op.cit. pag:131-140.

5. DISEÑO METODOLOGICO

5.1 Tipo de diseño

Se realizó un experimento controlado *In Vitro* sobre una población de fibroblastos pulpares humanos, obtenidos a partir de explantes de pulpa dental. La variable 1 de exposición fue la Capsaicina en diferentes concentraciones y la variable 2 de exposición fue los diferentes tiempos de recolección. La variable de desenlace fue la producción de PGE² IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 asociada al TPRV1.

5.2 Población y muestra

La población estuvo conformada por cultivos de fibroblastos pulpares humanos (FPH). Se trabajo con FPH a partir del quinto pase. Se realizaron 2 montajes por duplicado para cada prueba.(n=6)

5.3 Diseño de la prueba

5.3.1 Obtención del tejido pulpar.

La pulpa dental humana, se obtuvo de varios donantes, previo al consentimiento informado (anexo 1).

El tejido pulpar se obtuvo de dientes sanos, con formación radicular completa verificada radiográfica y clínicamente y que durante el procedimiento quirúrgico no requieran de odontosección que comprometa la cámara pulpar o los conductos radiculares. Inmediatamente extraídos se retiró los restos del ligamento periodontal con una gasa impregnada con hipoclorito de sodio para evitar la contaminación con fibroblastos de origen diferente al pulpar (fibroblastos gingivales o de ligamento periodontal). Con una fresa zecrya y

abundante refrigeración se realizó un corte desde la corona hasta el ápice que permitió seccionar el diente sagitalmente y remover el tejido pulpar con una cucharilla estéril y colocándolo en medio de cultivo completo (MEM suplementado con SFB al 10%, penicilina-estreptomicina 1% y Anfotericina 0,1%).

5.3.2 Cultivo de los FPH

El tejido pulpar fue extraído e inmediatamente colocado en MEM suplementado con SFB al 10%, y antibióticos (medio completo). La pulpa fue cortada en pequeñas piezas expuestas a dispa 2 unidades /ml en PBS durante 20 minutos previo a su siembra favoreciendo la disociación del tejido para que las células que crecen a partir del explante se liberaran en poco tiempo. Los explantes fueron colocados en frascos de cultivo de 25cc y se espero 20 minutos para que se adhirieran, y luego se añadió 6mL de medio completo. Los cultivos fueron incubados a 37°C con 5% CO₂. El desprendimiento de las células, y los pases se lograron utilizando tripsina al 0.25% y EDTA 1mM. Todos los experimentos se hicieron con FPH en quinto pase.

5.3.3 Estimulación de los cultivos de FPH con Capsaicina

Los fibroblastos pulpares humanos en quinto pase fueron sembrados en placas de 24 pozos a razón de 50.000 células/mL por pozo, una vez establecida la monocapa, se realizó un primer experimento duplicado, donde las células fueron estimuladas con Capsaicina $1 \cdot 10^{-4}M$, Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}M$ y Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}M$, siendo evaluadas durante la 1, 6, 8 y 12 horas. Estos experimentos tuvieron como controles células estimuladas con etanol 0,05% y metanol 0,23% y células sin estímulo de Capsaicina

Un grupo de FPH fueron preincubados por 30 minutos con Capsazepina en concentraciones de 10 μ M o 30 μ M FPH previo a la estimulación con Capsaicina, para evaluar la asociación con el TRPV1.

5.3.4 Producción de PGE₂ de FPH por Capsaicina.

Las concentraciones de PGE₂, se midieron, en los sobrenadantes de los cultivos por la técnica de ELISA, utilizando el kit de PGE₂ High Sensitivity, R&D systems. Referencia KGE004. El ELISA fue realizado siguiendo las instrucciones del fabricante. El límite de sensibilidad de detección de ELISA fue de 10,1pg/ml. Este ensayo está basado en la técnica de unión competitiva en donde la PGE₂ presente en la muestra compite por los sitios de unión presente en anticuerpos monoclonales de ratón, con PGE₂ marcada con peroxidadas de rábano. Durante la incubación el anticuerpo monoclonal de ratón se une a anticuerpos de cabra anti-anticuerpos de ratón que cubren la placa. Después de una lavada para retirar el conjugado y muestra no unida, una sustancia sustrato se adiciona a los pozos para determinar la actividad de la enzima unida. El color es detenido, y la absorbancia se lee en una longitud de onda de 450nm. La intensidad del color es inversamente proporcional a la concentración de PGE₂ en la muestra.

5.3.4.1. Producción de IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 e IL-10, en sobrenadantes de FPH estimulados con Capsaicina

Las concentraciones de IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 e IL-10, se midieron en los sobrenadantes de los cultivos mediante BDA Citometric Bead Array (CBA), Human inflammation kit, Ref. 551811. Este kit utiliza seis

grupos de perlas con diferente intensidad de fluorescencia, cubiertos con anticuerpos específicos para proteínas (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF). Los seis grupos de perlas se mezclaron con las muestras y los estándares y se incubaron con los anticuerpos de detección conjugados con la ficoeritrina para formar complejos sándwich. La intensidad de fluorescencia de la ficoeritrina PE de cada complejo sándwich reveló la concentración de la citoquina. Después se pasaron las muestras en el Citómetro de flujo (FACS ARIA), y se utilizó el software FCAP ensayo para generar los resultados graficar y tabular.

Los límites de detección para cada citoquina fueron: IL-8:3,6 pg/ml, IL-1 β : 7,2pg/ml, IL-6 .2,5pg/ml, IL-10: 3,3pg/ml, TNF:3,7pg/ml, IL12p70:1,9pg/ml.

5.4 Análisis estadístico

Los resultados de las pruebas de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 son presentados utilizando medianas y rangos y la comparación entre grupos se realizó con las pruebas de Kruskal Wallis. y como post-hoc la prueba U de Mann Whitney. Una $p < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativa.

6. RESULTADOS

Obtención de fibroblastos a partir de explantes de tejido de pulpa dental humana.

Con el fin de evaluar la producción de PGE₂, IL-8, IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-12p70 e IL-10 en FPH estimulados con Capsaicina a diferentes dosis, fue

necesaria la obtención de fibroblastos a partir de explantes de tejido de pulpa dental.

Las células que crecieron del explante se detectaron aproximadamente entre los 4-7 días posteriores a la siembra del cultivo. Estas células morfológicamente son esféricas, y algunas veces se observan en grupos. Después de un tiempo que varió entre 1 y 7 días, las células se observaron elongadas, con formas irregulares y algunas con una delgada proyección, representando las características morfológicas similares a los fibroblastos.

Fig.1a

Aproximadamente en 12 días, las células pulpares proliferaron hasta formar una monocapa confluyente. A este nivel las células crecieron en varias capas que se asemejan a rosetas y representan zonas de mayor adherencia.

Fig.1b.

A partir del primer pase la monocapa confluyente se lograba obtener entre 8 y 12 días.

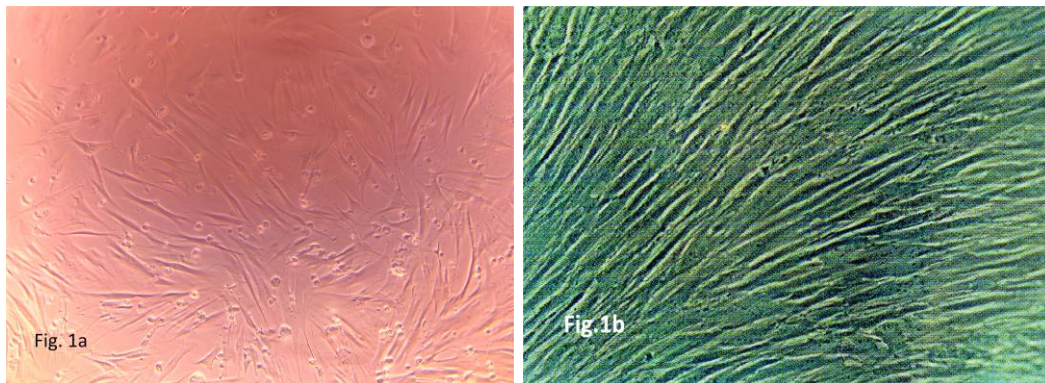


Fig.1. Características morfológicas de fibroblastos pulpares humanos. A. Morfología de fibroblastos pulpares humanos obtenidos a través de explantes dentales B. Monocapa confluyente de fibroblastos pulpares humanos a los 21 días de cultivo.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de PGE₂ en sobrenadantes de FPH

La Capsaicina es una neurotoxina que ha sido utilizada en el control del dolor y procesos inflamatorios ^{73 74}, favoreciendo a nivel del tejido pulpar la proliferación de fibroblastos y el número de células en fase de síntesis.⁷⁵ Con el fin de establecer si la Capsaicina tiene un efecto de disminución en la producción de PGE₂ en sobrenadantes de FPH estimulados, se realizó un experimento para determinar la concentración y tiempo óptimo de su utilización, descartándose la utilización de Capsaicina 1*10⁻⁴ M por cuanto no se observó disminución de PGE₂, a las 6 y 8 horas, (28,907 pg/ml 6h y 75,206 pg/ml 8h) contrario a lo sucedido con la Capsaicina 5*10⁻⁵ M (8,072 pg/ml 6h y 40,658pg/ml 8h) y la Capsaicina 2,5*10⁻⁵ M (6,537 pg/ml 6h y 28,866 pg/ml 8h) en donde se observó una disminución de la producción de PGE₂, en comparación con células sin estímulo (28,838pg/ml 6h y 89,272pg/ml 8h). En cuanto al tiempo óptimo, se observó que a la primera hora no hubo ninguna diferencia, pero a las 12 horas se detectaron niveles altos de producción de PGE₂ en relación a las células sin estímulo. El numero celular incluyo aproximadamente 30.000 células por pozo. (datos no mostrados).

Teniendo en cuenta lo anterior, se analizaron muestras de FPH, estimulados con Capsaicina 5*10⁻⁵ M y Capsaicina 2.5*10⁻⁵ M, a las 6 y 8 horas. Las concentraciones de PGE₂ en el sobrenadante fueron cuantificadas por Elisa. La producción de PGE₂ dependiente de la concentración de Capsaicina y tiempo, se muestra en la fig.2.

⁷³ MATUCCI C, McCARTHY G. op.cit. pag:147-49.

⁷⁴ CAVIEDES JF, AZUERO MM, MORENO GC. Control de la Sustancia P en la inflamación neurogenica del tejido pulpar con capsaicina. Federacion Odontologica Colombiana. 1998:9:56

⁷⁵ MORENO G, CAVIEDES J. op.cit. pag::89-99.

Se observó una disminución estadísticamente significativa en la producción de PGE₂ de FPH cuando fueron estimulados con Capsaicina 5*10⁻⁵ M a las 6 horas post estimulación (mediana:235pg/ml rango:154pg/ml-403pg/ml) y a las 8 horas post estimulación, (mediana:190pg/ml, rango:137pg/ml-237pg/ml), en comparación con las células que no fueron estimuladas. Este mismo efecto se observó con Capsaicina 2,5*10⁻⁵M, a las 6 horas (mediana:231 pg/ml, rango:223pg/ml-284pg/ml) y a las 8 horas (mediana:199pg/ml, rango:135pg/ml-723pg/ml 8h), en comparación con células que no fueron estimuladas a las 6 horas (mediana:608pg/ml, rango:540pg/ml-1059pg/ml) y 8 horas (mediana:629pg/ml ,rango:245pg/ml-1071pg/ml). (p=0,0250 p=0,022 6h respectivamente) y (p=0,001 p=0,02 8h respectivamente).

La producción de PGE₂, en los sobrenadantes de FPH cuando son estimulados con etanol 0,05% (vehículo de la Capsaicina), esta disminuida al compararlo con las células que no fueron estimuladas, tanto a las 6 como a las 8 horas. (P= 0,002 6h y P= 0,015 8h). (mediana:252pg/ml, rango:140pg/ml-482pg/ml 6h) y (mediana:229pg/ml, rango:135pg/ml-384pg/ml 8h). No se observa una diferencia significativa entre el etanol 0,05% y la Capsaicina 5*10⁻⁵ M y Capsaicina 2,5*10⁻⁵ M . (p=0,32 y p=0,46 6h) y (p=0,16 p=0,42 8h). Estos resultados sugieren que el etanol esta generando una disminución en la producción de PGE₂ y además existe una tendencia de la Capsaicina, ha disminuir la producción de PGE₂.

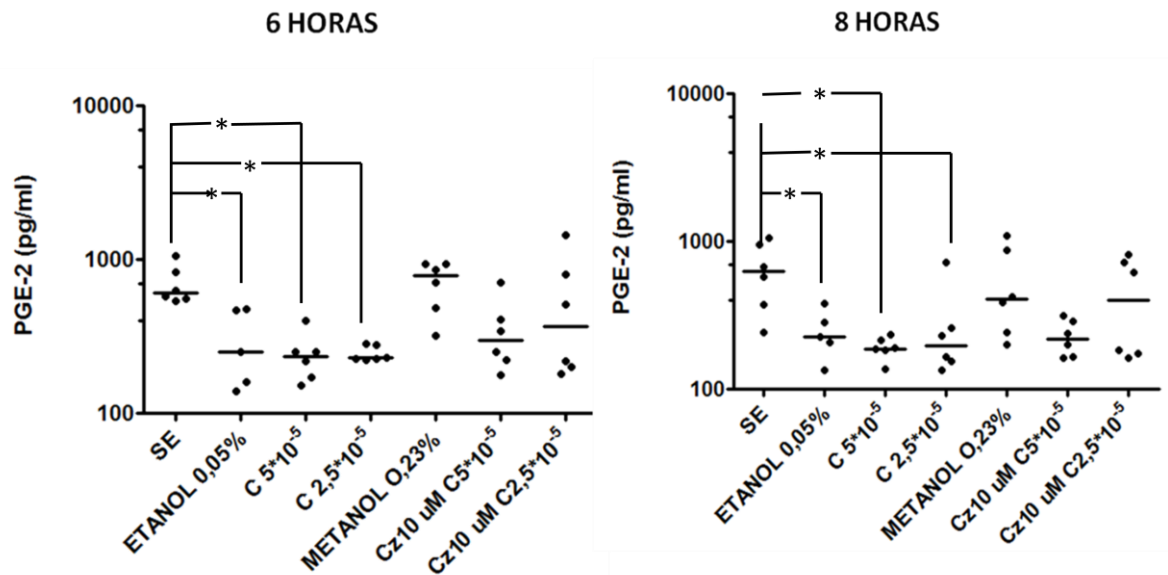


Fig.2 Producción de PGE₂ en sobrenadantes FPH, estimulados con Capsaicina. Representación de los datos de Elisa para PGE₂. Cada punto representa la concentración de PGE₂ en pg/ml. SE=sin estímulo, C 5*10⁻⁵M=Capsaicina 5*10⁻⁵M, C 2,5*10⁻⁵M=Capsaicina 2,5*10⁻⁵M, Cz10uMC5*10⁻⁵M=Capsazepina 10uM más Capsaicina 5*10⁻⁵M, Cz10Um C2,5*10⁻⁵=Capsazepina 10uM más Capsaicina 2,5*10⁻⁵M. Control=(Etanol 0,05%, Metanol 0,23%), (—)=Línea horizontal corta, representa la mediana, (*)=representa las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. p< 0,05 Prueba U de Mann Withney.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de PGE₂ en sobrenadantes de FPH asociado al receptor TRPV1

Con el fin de determinar si el efecto de producción de PGE₂, por la Capsaicina sobre FPH, es vía receptor TRPV1; las muestras de fibroblastos pulpares fueron preincubados por 30 minutos con Capsazepina 10μM, siendo posteriormente estimuladas con Capsaicina 5*10⁻⁵M y Capsaicina 5*10⁻⁵M y evaluadas a las 6 y 8 horas. Las concentraciones en el sobrenadante de

PGE₂ fueron medidas por Elisa. La producción de PGE₂ dependiente de la estimulación con Capsazepina 10uM y tiempo, se muestra en la fig.2.

La concentración de Capsazepina 30uM fue descartada debido a que se observaron niveles en la producción de PGE₂ mayores a los producidos cuando se pretrataron con capsazepina 10uM. (Dato no mostrado). No existió diferencia estadística significativa entre las muestras estimuladas con Capsazepina 10uM más Capsaicina 5*10⁻⁵ M y con Capsaicina 5*10⁻⁵ M a las 6 horas post estímulo (mediana:300pg/ml rango:179pg/ml-712pg/ml), ni a las 8 horas post estímulo (mediana:220pg/ml rango=167pg/ml-318pg/ml 8h). Tampoco existió diferencia significativa entre Capsazepina 10uM más Capsaicina 2,5*10⁻⁵M y con Capsaicina 2,5*10⁻⁵M a las 6 horas post estímulo (mediana:368pg/ml, rango:181pg/ml-1460pg/ml 6h), ni a las 8 horas post estímulo (mediana:403pg/ml, rango:163pg/ml-822pg/ml 8h), (p=0,08 p=0,5 6h) y (p=0,19 P=0.16 8h). Estos resultados sugieren que el efecto de la disminución de PGE₂ por parte de la Capsaicina no es exclusivo del receptor TRPV1.

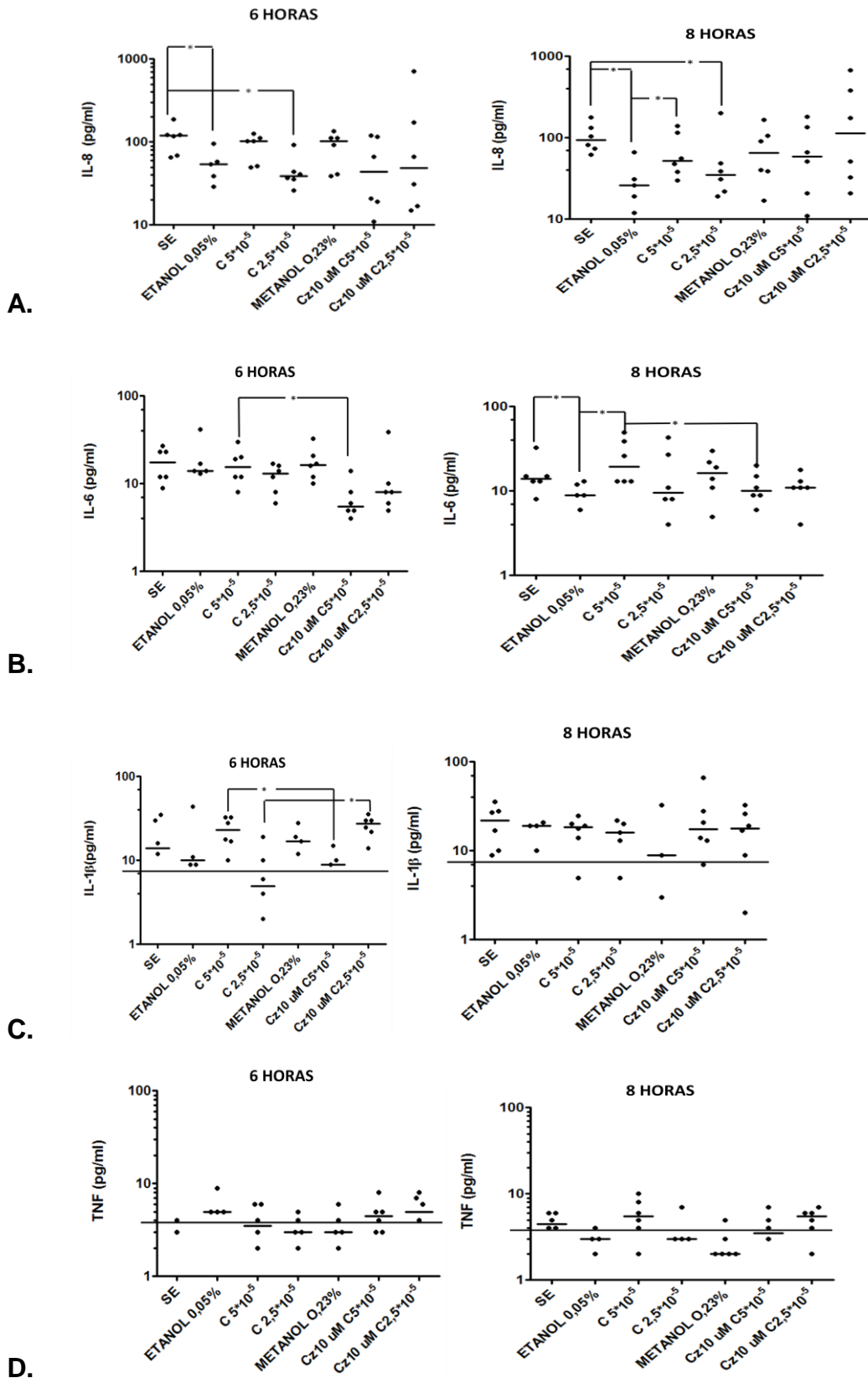
En cuanto a la producción de PGE₂ por parte del Metanol 0,23% vehículo de la Capsazepina, (mediana:791pg/ml, rango:320pg/ml-943pg/ml 6h) (mediana:409pg/ml, rango:246pg/ml-1095pg/ml 8h), se observó que no hubo diferencias significativas cuando se comparó con las células sin estímulo tanto a las 6 como 8 horas post estímulo. (p=0,34 6h y p=0,46 8h) lo que muestra que el vehículo no está generando un efecto significativo en la producción de PGE₂.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-8 en sobrenadantes de FPH. Con el fin de establecer si la Capsaicina tiene un efecto de disminución en la producción de IL-8 en sobrenadantes de FPH; se tomaron muestras de sobrenadantes de FPH, estimulados con Capsaicina 5*10⁻⁵ M y Capsaicina 2.5*10⁻⁵ M, a las 6 y 8 horas. Las concentraciones en el

sobrenadante de IL-8 fueron medidas por CBA. La producción de IL-8 dependiente de la concentración de Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3A.

No se observó una disminución estadísticamente significativa en la producción de IL-8 del sobrenadante de FPH cuando fueron estimulados con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M, a las 6 horas post estimulación (mediana:102pg/ml rango:51pg/ml-126pg/ml), ni tampoco a las 8 horas post estimulación, (mediana:52pg/ml, rango:30pg/ml-116pg/ml 8h). ($p=0,15$ 6h $p=0,089$ 8h). Sin embargo se observa una tendencia de disminuir la producción de la citoquina. Se observó una disminución en la producción de IL-8 de FPH cuando fueron estimuladas con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 6 horas post estimulación, (mediana:39pg/ml, rango:26pg/ml-93pg/ml) y a las 8 horas post estimulación, (mediana: 35pg/ml, rango:19pg/ml-201pg/ml 8h), en comparación con células que no fueron estimuladas (mediana:119pg/ml, rango:65pg/ml-187pg/ml 6h) y (mediana:93pg/ml, rango:62pg/ml-179pg/ml 8h). ($p=0,0043$ 6h) y ($p=0,032$ 8h).

La producción de IL-8 en sobrenadantes de FPH cuando son estimulados con etanol 0,05% (vehículo de la Capsaicina), esta disminuida al compararlo con las células que no fueron estimuladas, tanto a las 6 como a las 8 horas. ($p= 0,0087$ 6h y $p= 0,043$ 8h). (mediana: 54pg/ml, rango:29pg/ml-96pg/ml 6h) y (mediana:26pg/ml, rango:12pg/ml-67pg/ml 8h). No se observó una diferencia significativa entre el etanol 0,05% y la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M ni la Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M . ($p=0,062$ y $p=0,21$) a las 6 horas, sin embargo se observa una tendencia a disminuir la IL-8. A las 8 horas se detecto una diferencia significativa entre el etanol 0,05% y la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M, diferente a Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. ($p=0,04$ $p=0,20$), indicando un mayor efecto de disminución de la citoquina por parte del etanol 0,05%. Estos resultados sugieren que el etanol 0,05% esta ejerciendo un efecto sobre la producción de IL-8 al igual que el descrito para PGE_2 .



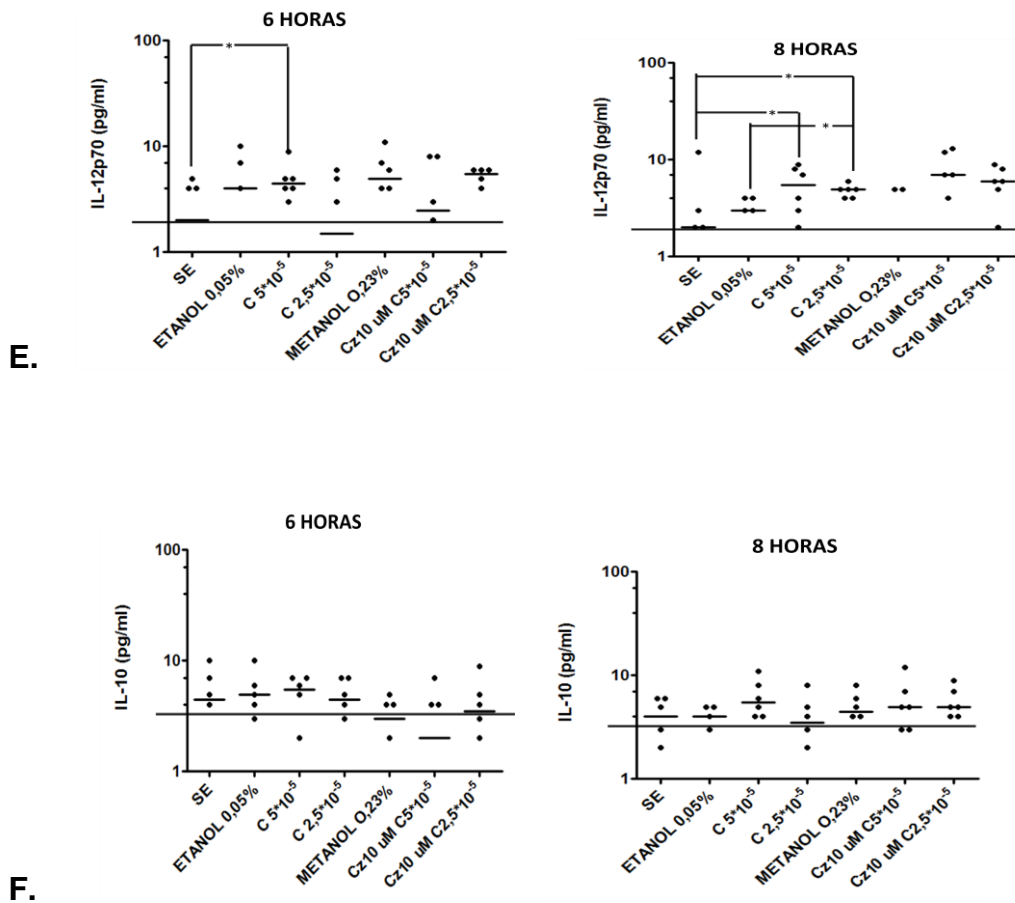


Fig.3 Citoquinas proinflamatorias e IL-10 en sobrenadantes FPH, estimulados con Capsaicina. A. IL-8, B. IL-6, C. IL-1 β , D. TNF α , E. IL-12p70, F.IL-10 Los puntos representan las concentraciones para cada citoquina. SE=sin estimulo. C 5*10⁻⁵M=Capsaicina 5*10⁻⁵M, C 2,5*10⁻⁵M=Capsaicina 2,5*10⁻⁵M. Cz10uMC5*10⁻⁵M=Capsazepina 10uM más Capsaicina 5*10⁻⁵M, Cz10uM. C2,5*10⁻⁵M=Capsazepina 10uM más Capsaicina 2,5*10⁻⁵M. Control= (Etanol 0,05%, Metanol 0,23%). (—)=Línea horizontal corta, representa la mediana. Línea horizontal continua, representa el límite de sensibilidad. (*)=representa las diferencias estadísticamente significativas entre los grupos. P< 0,05. Prueba U de Mann Withney.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-8 en sobrenadantes de FPH asociado al receptor TRPV1

Con el fin de determinar si el efecto de producción de IL-8 por la Capsaicina sobre FPH, es vía receptor TRPV1, fueron medidas las concentraciones en el sobrenadante de IL-8 por CBA. La producción de IL-8 dependiente de la estimulación con Capsazepina 10uM y tiempo, se muestra en la fig.3A. No existió diferencia estadística significativa entre las muestras estimuladas con Capsazepina 10uM más Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M, a las 6 horas post estímulo (mediana:44pg/ml, rango:11pg/ml-120pg/ml) ni a las 8 horas post estímulo (mediana:59pg/ml, rango=11pg/ml-182pg/ml). Tampoco existió diferencia significativa entre Capsazepina10uM más Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, a las 6 horas post estímulo, (mediana:49pg/ml, rango:15pg/ml-719pg/ml) ni a las 8 horas post estímulo, (mediana:114pg/ml, rango:21pg/ml-673pg/ml). ($p=0,19$ $p=0,5$ 6h) y ($p=0,5$ $p=0.1$ 8h). Sin embargo se observa una tendencia de disminución de la citoquina por parte del bloqueador. Estos resultados sugieren que el efecto de la disminución de IL-8 por parte de la Capsaicina no es exclusivo del receptor TRPV1.

En cuanto a la producción de IL-8 por parte del Metanol 0,23% vehículo de la Capsazepina, (mediana:102pg/ml, rango:41pg/ml-136pg/ml 6h) (mediana:65pg/ml, rango:17pg/ml-166pg/ml 8h), se observó que no hubo diferencias significativas cuando se comparo con las células sin estímulo. ($p=0,15$ 6h y $p=0,19$ 8h) lo que muestra que el vehículo no está generando un efecto significativo en la producción de IL-8.

En general se observa un efecto de disminución de la citoquina IL-8 tanto por el alcohol 0,05% como por la Capsaicina, siendo mayor la ejercida por la Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M tanto a las 6 como a las 8 horas. La Capsazepina no inhibe el efecto de la Capsaicina a través del receptor TRPV1.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-6 en sobrenadantes de FPH. La producción de IL-6 dependiente de la concentración de Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3B.

No se observó disminución significativa en la producción de IL-6 de FPH cuando fueron estimuladas con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M (mediana:15pg/ml, rango:8pg/ml-30pg/ml 6h) (mediana:20pg/ml, rango:13pg/ml-50pg/ml 8h), Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (mediana:13pg/ml, rango:6pg/ml-17pg/ml 6h) (mediana: 10pg/ml, rango:4pg/ml-43pg/ml 8h), en comparación con células que no fueron estimuladas (mediana:17pg/ml, rango:9pg/ml-27pg/ml 6h) (mediana:14pg/ml, rango:8pg/ml-33pg/ml 8h). ($p=0,40$ y $P=0,14$ 6h) y ($p=0,22$ y $p=0,2$ 8h). Sin embargo se observa una tendencia a disminuir la citoquina.

La producción de IL-6 en sobrenadantes de FPH cuando fueron estimulados con etanol 0,05% a las 8 horas, (mediana:14pg/ml, rango:13pg/ml-42pg/ml 6h) (mediana:9pg/ml, rango:6pg/ml-13pg/ml 8h), estuvo disminuida al compararlo con las células que no fueron estimuladas. ($p= 0,039$ 8h), contrario a las 6 horas, en donde no hubo diferencia significativa. ($p=0,32$ 6h). No se observó una diferencia significativa entre el etanol 0,05% y la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M y Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. ($p=0,32$ y $p=0,13$) a las 6 horas, pero se observa una tendencia a disminuir la citoquina. A las 8 horas se observó una diferencia significativa entre el etanol 0,05% y la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M, diferente a Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. ($p=0,007$ $p=0,46$). Estos resultados sugieren que el vehículo de la Capsaicina está ejerciendo un efecto sobre la producción de IL-6.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-6 en sobrenadantes de FPH asociado al receptor TRPV1

La producción de IL-6 dependiente de la concentración de Capsazepina 10uM más Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3B.

Existió diferencia estadística significativa entre las muestras estimuladas con Capsazepina 10uM más Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M, a las 6 horas post estímulo (mediana:6pg/ml, rango:4pg/ml-14pg/ml) y a las 8 horas post estímulo (mediana:10pg/ml, rango=6pg/ml-20pg/ml). ($p=0,01$ 6h) y ($p=0,031$ 8h). indicando que la capsazepina está ejerciendo un mayor efecto de disminución de la citoquina que la Capsaicina,. No existió diferencia significativa entre Capsazepina10uM más Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, a las 6 horas post estímulo, (mediana:8pg/ml, rango:5pg/ml-39pg/ml), ni a las 8 horas post estímulo, (mediana:11pg/ml, rango:4pg/ml-18pg/ml). ($p=0,16$ 6h) y ($p=0,46$ 8h), pero se observa una tendencia a disminuir más la citoquina, que la Capsaicina.

En cuanto a la producción de IL-6 por parte del Metanol 0,23% vehículo de la Capsazepina, se observó que no hubo diferencias significativas cuando se comparo con las células sin estímulo. (mediana:17pg/ml, rango:10pg/ml-33pg/ml 6h) (mediana:16pg/ml, rango:5pg/ml-30pg/ml 8h). ($p=0,46$ 6h y $p=0,46$ 8h). los resultados muestran que el vehículo no está generando un efecto significativo en la producción de IL-6.

En general se observa tendencia a que la Capsaicina disminuya la IL-6 siendo mayor el efecto ejercido por la Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M. A las 8 horas se observa que el alcohol tuvo efecto en la disminución de la citoquina. La Capsazepina parece tener efecto directo sobre el TRPV1 por lo que el efecto de la Capsaicina es parcialmente asociado al receptor (TRPV1)

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-1 β en sobrenadantes de FPH. La producción de IL-1 β dependiente de la concentración de Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3C.

Los resultados no muestran un efecto de disminución estadísticamente significativo, en la producción de IL-1 β de FPH cuando fueron estimuladas con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M a las 6 horas post estímulo, (mediana:23pg/ml, rango:10pg/ml-33pg/ml), ni a las 8 horas post estímulo, (mediana:18pg/ml, rango:5pg/ml-25pg/ml), ni con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 6 horas post estímulo, (mediana:5pg/ml, rango:2pg/ml-19pg/ml), ni a las 8 horas post estímulo, (mediana: 16pg/ml, rango:5pg/ml-22pg/ml), en comparación con células que no fueron estimuladas (mediana:14pg/ml, rango:12pg/ml-35pg/ml 6h) y (mediana:22pg/ml, rango:9pg/ml-36pg/ml 8h). ($p=0,18$ y $p=0,23$ 6h) y ($p=0,29$ y $p=0,22$ 8h) respectivamente. Sin embargo a las 6 horas se observa una tendencia a aumentar la citoquina con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M y a disminuir con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M cuya mediana esta bajo los límites de sensibilidad; contrario a las 8 horas en donde la tendencia es similar a la de las células sin estímulo.

Tampoco se observó un efecto estadísticamente significativo en la producción de IL-1 β de FPH cuando fueron estimuladas con etanol 0,05% a las 6 y 8 horas, (mediana:10pg/ml, rango:9pg/ml-44pg/ml 6h) (mediana:19pg/ml, rango:10pg/ml-21pg/ml 8h), al compararlo con las células sin estímulo. ($p= 0,45$ 6h y $p=0,41$ 8h). No se observo una diferencia significativa entre el etanol 0,05% y la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M y Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, a las 6 u 8 horas. ($p=0,16$ y $p=0,08$ 6h) ($p=0,45$ y $p=0,45$). Sin embargo a las 6 horas se observa una tendencia de el etanol 0,05% a aumentar la citoquina, contrario a las 8 horas en donde la tendencia es similar a la de las células sin estímulo.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-1 β en sobrenadantes de FPH asociado al receptor TRPV1

La producción de IL-1 β dependiente de la concentración de Capsazepina 10uM más Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3C.

Los resultados emitidos, muestran que existió diferencia estadística significativa a las 6 horas entre las muestras estimuladas entre Capsazepina 10uM Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M (mediana:5pg/ml, rango:9pg/ml-15pg/ml 6h) con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M y Capsazepina 10uM Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M, (mediana:27pg/ml, rango:14pg/ml-36pg/ml 6h), con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M $P=0,008$ y $P=0,004$ respectivamente. Contrario a lo observado a las 8 horas donde no se observó diferencia significativa ($p=0,37$ y $=0,39$). Esto nos indica que la Capsazepina 10uM ejerció un buen bloqueo del receptor

En cuanto a la producción de IL-1 β por parte del Metanol 0,23% (mediana:17pg/ml, rango:12pg/ml-28pg/ml 6h) (mediana:9pg/ml, rango:9pg/ml-33pg/ml 8h), se observó que no hubo diferencias significativas cuando se comparó con las células sin estímulo. ($p=0,5$ 6h y $p=0,21$ 8h) lo que muestra que el vehículo tampoco está generando un efecto significativo en la producción de IL-1 β .

En general se observa que a las 6 horas existe una tendencia a aumentar la citoquina IL-1 β , por la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M y a disminuir con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M teniendo en cuenta que sus datos se encuentran debajo de los límites de sensibilidad. El efecto de la Capsaicina parece estar inhibido por la acción de la Capsazepina 10uM en ambas concentraciones.

A las 8 horas la tendencia de comportamiento es similar entre las células estimuladas y células sin estímulo.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de TNF α en sobrenadantes de FPH. La producción de TNF α dependiente de la concentración de Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3D.

Los resultados se encontraron en su mayoría debajo del límite de sensibilidad ofrecido por el fabricante para TNF α , mostrando que no hubo un efecto significativo en comparación con las células sin estímulo.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-12p70 en sobrenadantes de FPH. La producción de IL-12p70 dependiente de la concentración de Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3E.

A las 6 horas se observó un aumento significativo en la producción de IL-12p70, en sobrenadantes de FPH cuando fueron estimuladas con Capsaicina 5×10^{-5} M (mediana:5pg/ml, rango:3pg/ml-9pg/ml), ($P=0,05$), mientras que la Capsaicina $2,5 \times 10^{-5}$ M (mediana:1pg/ml, rango:0pg/ml-6pg/ml 6h), no mostro diferencias significativas en comparación con células que no fueron estimuladas (mediana:2pg/ml, rango:0pg/ml-5pg/ml 6h) ($p=0,46$) pero la tendencia fue a disminuir la concentración de la citoquina. A las 8 horas, se observo un aumento en la producción de IL-12p70 estadísticamente significativo al ser estimuladas con Capsaicina 5×10^{-5} M (mediana:5pg/ml, rango:2pg/ml-8pg/ml) y con Capsaicina $2,5 \times 10^{-5}$ M,(mediana: 5pg/ml, rango:4pg/ml-6pg/ml), comparándolas con las muestras sin estímulo,(mediana:2pg/ml, rango:0pg/ml-5pg/ml). ($p=0,07$ y $p=0,03$ 8h).

No se observo un efecto significativo a las 6 y 8 horas en la producción de IL-12p70 en los sobrenadantes de FPH cuando fueron estimulados con etanol 0,05%, (mediana:4pg/ml, rango:0pg/ml-10pg/ml 6h) (mediana:3pg/ml, rango:0pg/ml-4pg/ml 8h), al compararlo con las células sin estímulo. ($p=0,24$ 6h y $p=0,20$ 8h), aunque la tendencia es a aumentar la producción de la citoquina. Tampoco se observo una diferencia significativa entre las muestras estimuladas con el etanol 0,05% y con la Capsaicina 5×10^{-5} M ni a las 6 u 8

horas posterior al estímulo. ($p=0,39$ 6h y $p=0,11$ 8h), sin embargo a las 8 horas la tendencia de la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5} M$, es a aumentar más la concentración de la citoquina que el alcohol. Mientras que las muestras estimuladas con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5} M$ a las 8 horas aumentan significativamente la concentración de la IL-12p70 en relación con el etanol. ($p=0,009$ 8h y $p=0,11$ 6h).

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-12p70 en sobrenadantes de FPH asociado al receptor TRPV1

La producción de IL-12p70 dependiente de la concentración de Capsaicina $10 \mu M$ más Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3E.

Los resultados indican que no existió diferencia estadística significativa entre las muestras estimuladas con Capsaicina $10 \mu M$ más Capsaicina $5 \cdot 10^{-5} M$ con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5} M$. a las 6 horas post estimulación, (mediana: 3pg/ml, rango: 0pg/ml-8pg/ml), ni a las 8 horas post estimulación, (mediana: 7pg/ml, rango: 0pg/ml-13pg/ml) ($p=0,12$ 6h) y ($p=0,31$ 8h). Tampoco existió diferencia significativa entre Capsaicina $10 \mu M$ más Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5} M$ con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5} M$. a las 6 horas post estimulación, (mediana: 5pg/ml, rango: 0pg/ml, 6pg/ml), ni a las 8 horas post estimulación, (mediana: 6pg/ml, rango: 0pg/ml-14pg/ml). ($p=0,09$ 6h) y ($p=0,09$ 8h). sin embargo se observa una tendencia a aumentar la citoquina. Estos resultados sugieren que el efecto de aumento en la producción de IL-12p70 por la Capsaicina no es exclusivo del receptor.

En cuanto a la producción de IL-12p70 por parte del Metanol 0,23%, (mediana: 5pg/ml, rango: 0pg/ml-11pg/ml 6h) (mediana: 0pg/ml, rango: 0pg/ml-5pg/ml 8h), se observó que no hubo diferencias significativas cuando se comparó con las células sin estímulo. ($p=0,065$ 6h y $p=0,27$ 8h) lo que

muestra que el vehículo no está generando un efecto significativo en la producción de IL-12p70.

En general todos los estímulos tienden a aumentar la producción de la IL-12p70 siendo mas marcado su efecto a las 8 horas. El único caso en que la concentración de la interleuquina disminuye se da a las 6 horas con la Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M y está asociado a que tres datos estaban por debajo del límite de sensibilidad.

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-10 en sobrenadantes de FPH. La producción de IL-10 dependiente de la concentración de Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3F.

Los resultados evaluados a las 6 horas y 8 horas post estimulación no muestran un efecto de aumento estadísticamente significativo en la producción de IL-10 de FPH cuando fueron estimuladas con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M (mediana:5pg/ml, rango:0pg/ml-7pg/ml 6h) (mediana:4pg/ml, rango:0pg/ml-11pg/ml 8h) ($p=0,43$ y $P=0,09$), ni con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M (mediana:6pg/ml, rango:0pg/ml-7pg/ml 6h) (mediana:5pg/ml, rango:0pg/ml-8pg/ml 8h), ($p=0,46$ y $p=0,46$), en comparación con células que no fueron estimuladas (mediana:4pg/ml, rango:0pg/ml-10pg/ml 6h)(mediana:4pg/ml, rango:0pg/ml-6pg/ml 8h). Sin embargo se observa una tendencia a aumentar levemente la citoquina especialmente con la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M tanto a las 6 como 8 horas.

Tampoco se observó un efecto estadísticamente significativo en la producción de IL-10 de FPH cuando fueron estimuladas con etanol 0,05% a las 6 y 8 horas, (mediana:4pg/ml, rango:3pg/ml-10pg/ml 6h) (mediana:4pg/ml, rango:0pg/ml-5pg/ml 8h), al compararlo con las células sin estímulo. ($p=0,35$ 6h y $p=0,39$ 8h). No se observó una diferencia significativa

entre el etanol 0,05% y la Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}M$ y Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}M$, a las 6 u 8 horas. ($p=0,46$ y $p=0,35$ 6h) ($p=0,06$ y $p=0,5$).

Efecto de la Capsaicina sobre la producción de IL-10 en sobrenadantes de FPH asociado al receptor TRPV1

La producción de IL-10 dependiente de la concentración de Capsazepina 10uM más Capsaicina y tiempo, se muestran en la fig.3F.

Los resultados emitidos, muestran que no existió diferencia estadística significativa a las 6 y las 8 horas entre las muestras estimuladas con Capsazepina 10uM Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}M$ (mediana:3pg/ml, rango:0pg/ml-7pg/ml 6h), (mediana:5pg/ml, rango=3pg/ml-12pg/ml 8h) con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}M$. y Capsazepina10uM Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}M$ (mediana:2pg/ml, rango:0pg/ml-9pg/ml 6h), (mediana:5pg/ml, rango:4pg/ml-9pg/ml 8h), con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}M$ ($p=0,12$ y $p=0,34$ 6h) ($p=0,34$ y $p=0,08$ 8h) respectivamente.

En cuanto a la producción de IL-10 por parte del Metanol 0,23% (mediana:4pg/ml, rango:0pg/ml-5pg/ml 6h) (mediana:3pg/ml, rango:0pg/ml-8pg/ml 8h), se observó que no hubo diferencias significativas cuando se comparo con las células sin estímulo. ($p=0,2$ 6h y $p=0,34$ 8h) lo que muestra que el vehículo tampoco está generando un efecto significativo en la producción de IL-10.

7. DISCUSION

Buscando controlar la inflamación pulpar en estados iniciales que pueden desencadenar la necrosis del tejido pulpar, como los que suceden con las agresiones generadas cuando se preparan dientes para recibir coronas completas, se ha propuesto el uso de fármacos como la Capsaicina con el fin, de modular la producción de mediadores de la inflamación que incluyen neuropéptidos, PGE₂ y citoquinas proinflamatorias, producidos por las neuronas y otros tipos celulares, que permitan mantener la vitalidad del tejido pulpar. Bajo esta premisa, el propósito de este estudio, fue analizar el efecto de la Capsaicina sobre FPH en la producción de mediadores de la inflamación (PGE₂, IL6, IL8, IL1β, IL12p70, TNFα e IL10) relacionado su efecto con el receptor de potencial transitorio vanilloide subtipo 1 (TRPV1).

La Capsaicina ha sido un medicamento utilizado ampliamente, para disminuir el dolor y los procesos inflamatorios en pacientes con neuralgia post herpética, osteoartritis, neuropatía diabética, y artritis reumatoidea⁷⁶. La Capsaicina actúa sobre neuronas y diferentes tipos celulares^{77,78,79,80} donde se muestran efectos en la proliferación celular y en la expresión de citoquinas pro inflamatorias. En fibroblastos pulpares la Capsaicina favorece la

⁷⁶ HAUTKAPPE M, ROIZEN MF, TOLEDANO A, ROTH S, JEFFRIES JA, OSTERMEIER AM.

Review of the effectiveness capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. Clin J Pain. 1998 Jun;14(2):97-106. Review

⁷⁷ MATUCCI M. Effects of capsaicin on the metabolism of rheumatoid arthritis synoviocytes in vitro. Ann of reumat dis. 1990;49:598-602.

⁷⁸ OHK LEE I, HYOUNG L. Antiinflammatory effect of Capsaicina in helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells. Journal compilation.2007;12:510-517.

⁷⁹ BHUTANI M, PATHAK AK, GUHA S, SETHI G, AGGARNAIR AS, KUNNUMAKKARA ABWAL BB. Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin-6-inducible STAT3 activation. Clin Cancer Res. 2007 May 15;13(10):3024-32.

⁸⁰ HUANG J, QIU L, DING L, WANG S, WANG J, ZHU Q, SONG F, HU J. Ginsenoside Rb1 and paeoniflorin inhibit transient receptor potential vanilloid-1-activated IL-8 and PGE₂ production in a human keratinocyte cell line HaCaT. Int Immunopharmacol. 2010 Oct;10(10):1279-83. Epub 2010 Aug 2.

proliferación celular⁸¹ y produce un aumento en la expresión de IL-6.⁸² Sobre tejido pulpar de ratas el pre-tratamiento con Capsaicina disminuye la liberación de SP.⁸³

En esta investigación al evaluar el efecto de la Capsaicina sobre FPH como un fármaco que potencialmente pueda controlar la inflamación pulpar, se encontró, que disminuye significativamente la producción de PGE₂ a las 6 y a las 8 horas, pero este efecto está asociado fuertemente al etanol que fue usado como vehículo de dilución, considerando que los otros solventes de la Capsaicina⁸⁴ como el cloroformo, el éter y el benceno no podrían ser usados clínicamente por su toxicidad y que las investigaciones en el área biológica utilizan alcohol etílico como diluyente. Recientemente se ha probado que el etanol tiene capacidad de activar al receptor de la Capsaicina (TRPV1) directamente, cuando se utiliza en concentraciones de 0.1-3% sobre tejido de esófago, piel y médula espinal dorsal de ratas, produciendo la liberación de neuropéptidos y extravasación de plasma⁸⁵ y en una concentración del 0,001%,⁸⁶ la respuesta del TRPV1 mediada por el etanol que aumenta el flujo de calcio intracelular, comparte la vía que modula el *fosfatidil inositol* PIP₂ en una línea celular (HEK293). Aunque no hay estudios previos que valoren el efecto del etanol como diluyente de la Capsaicina a través del TRPV1, el antecedente más cercano en FPH, muestra que el etanol al 0.05% tiene un efecto sobre la proliferación de estas células, pero este efecto nunca supera

⁸¹ MORENO G, GONZÁLEZ JM, CAVIEDES J. Efecto de la capsaicina sobre la proliferación y ciclo celular de fibroblastos pulpares humanos. *Federacion Odontologica Colombiana*. 2002;89-99.

⁸² MIYAMOTO R, MASAYUKI T, TETSUYA S, SHIGETAKA N, MITSUO T. Expression and characterization of vanilloid receptor subtype 1 in human dental pulp cell cultures. *J. Endod.* 2005;31(9):652-8.

⁸³ CAVIEDES JF, AZUERO MM, MORENO GC. **Op.cit.** 1998.

⁸⁴ POLATO DE LIMA, Denise. *Farmacologia de Manipulação e Homeopatia*. Citada, abril 15, 2004. Disponible en internet:<http://www.idemperidem.com/textos/capsaicina.htm>

⁸⁵ TREVISANI M, SMART D, GUNTHORPE MJ, TOGNETTO. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci.* 2002;5:546-51

⁸⁶ VETTER I, WYSE B, ROBERTS-THOMSON S, MONTEITH G, CABOT P. Mechanisms involved in potentiation of transient receptor potential vanilloid 1 responses by ethanol. *European Journal of Pain* 12;2008:441-454.

la acción de la Capsaicina,⁸⁷ en contraste, la presente investigación mostró que en lo referente a la disminución de PGE₂ en los sobrenadantes, el diluyente llegó a tener en ocasiones más efecto que la Capsaicina en las dos concentraciones analizadas.

La disminución de la PGE₂, producida por la Capsaicina diluida en etanol encontrada en este estudio, representa un efecto antiinflamatorio importante en tejido pulpar,^{88, 89} teniendo en cuenta que la presencia de PGE₂ aumenta la respuesta vascular inflamatoria aguda, llevando en ocasiones a la necrosis del tejido, por las características del ambiente que rodea a la pulpa dental. Adicionalmente Chang y colaboradores demostraron que las células pulpares humanas en cultivo, disminuyen la síntesis de DNA en presencia de PGE₂⁹⁰ por lo que se puede pensar que la Capsaicina además de disminuir la producción de PGE₂ y promover que el FPH entre en ciclo celular y proliferare⁹¹ favorecería los procesos de reparación del tejido pulpar injuriado. La disminución en la producción de PGE₂ por parte de la Capsaicina, es debida a que esta tiene un efecto de inhibición del factor de transcripción NF-κB, a través de inhibir la acción de la quinasa de inhibición κ B (IKK), e impedir la degradación del inhibidor κ B (IκB). La unión de IκB a NF-κB impide que este pueda traslocarse al núcleo, y de esta manera no se puede iniciar la

⁸⁷ MORENO GC, GONZALEZ JM, CAVIEDES JF Op. Cit. pág 89-99

⁸⁸ CHIDIAC J, HAWWA N, BALIKI M. A perfusión technique for the determination of proinflammatory mediators induced by intradental application of irritants. Journal of Pharmacological and toxicological methods. 2001;125-130

⁸⁹ CHIDIAC J, AL-ASMAR B, RIFAI K, JABBUR S. Inflammatory mediators release following application of irritants on the rat injured incisor. The effect of treatment with anti-inflammatory drugs. 2009;46:194-200.

⁹⁰ CHANG MC, JENG JH, LIN CP, LAN WH, TSAI W, HSIEH CC. [Thrombin activates the growth, cell-cycle kinetics, and clustering of human dental pulp cells.](#) J Endod. 1999 Feb;25(2):118-22.

⁹¹ CHANG M, LIN C, HAUNG T, Trombin-induced DNA synthesis of cultured human dental pulp cells is dependen ton its proteolytic activity and modulated by prostaglandin E₂. J. Endod. 1998;24:11:709-13.

transcripción de los genes asociados a la producción de COX-2, enzima necesaria para la producción de PGE₂.⁹²

Al analizar el efecto de la Capsaicina sobre la producción de citoquinas proinflamatorias (IL 8, IL 6, IL1 β y la IL12p70) y la IL 10 se encontró que el efecto es diverso. Se evidenció un efecto significativo de disminución de la IL-8, con la menor concentración de Capsaicina a las 6 y 8 horas en relación con las células sin estimular, mientras que la IL-12p70 con la mayor concentración aumentó a las 6 y 8 horas y con la menor aumentó solamente a las 6 horas. La tendencia mostrada por la IL-6 fue a disminuir en tanto que la IL-1 β tendió a aumentar. El efecto de la Capsaicina sobre la producción de la IL-10 mostró una leve tendencia a aumentar.

Al contrastar los hallazgos de la presente investigación con la literatura es interesante resaltar que el aumento o disminución que causa la Capsaicina en la producción de citoquinas pro inflamatorias, depende del tipo celular, de la concentración de la Capsaicina y del tiempo del estímulo. La IL 6 tiene una acción dosis dependiente^{93,94,95} aumenta su producción en FPH a las 24 horas post-estímulo⁹⁶ con dosis superiores a las usadas en esta investigación y con un estímulo más prolongado, mientras que en células de mieloma y células epiteliales de tracto respiratorio con dosis de 50 μ M y 10 μ M respectivamente, la IL 6 se disminuye. La IL 8 tiene una acción dosis dependiente^{97,98} su producción aumenta en queratinocitos de piel a las 24

⁹² HAN S, KEUM Y, CHUN K. Suppression of phorbol ester-induced NF- κ B activation by capsaicin in cultured human promyelocytic leukemia cells. Arch. Pharmacol. Res. 2002;25;475-479

⁹³ MIYAMOTO R, TOKUDA M. Op. Cit pág 652-8

⁹⁴ BHUTANI M, PATHAK AK, GUHA S, SETHI G, AGGARNAIR AS, KUNNUMAKKARA ABWAL BB : op.cit. pag:3024-3031.

⁹⁵ SEIKI N, SHIRASAKI H, KIKUCHI M, HIMI T. Capsaicin induces the production of IL-6 in human upper respiratory epithelial cells. Life Sciences.2007;1592-1597

⁹⁶ MIYAMOTO R, TOKUDA M. Op. Cit pág 652-8

⁹⁷ HUANG J, QIU L, DING L, WANG S, WANG J, ZHU Q, SONG F, HU J. Ginsenoside Rb1 and paeoniflorin inhibit transient receptor potential vanilloid-1-activated IL-8 and PGE₂

horas post-estímulo⁹⁹ con dosis menores a las usadas en esta investigación y con un estímulo más prolongado, mientras que en células epiteliales gástricas con dosis de 10^{-4} M, la IL 8 se disminuye.

En cuanto a la IL-12p70 e IL-1 β , se produjo un aumento significativo en la producción de IL-12p70 a las 6 y 8 horas con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M y con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}$ M a las 8 horas, observándose una tendencia a aumentar la producción de IL-1 β a las 6 horas y de IL-10, tanto a las 6 como 8 horas con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}$ M. La IL-12p70 es una citoquina proinflamatorias cuya acción está dirigida principalmente estimular la diferenciación de linfocitos T CD4+ vírgenes en LT Th1, mediando la inmunidad celular, inducir la producción de IFN γ y estimular la activación y proliferación de NK y células T maduras (LTC).¹⁰⁰ El efecto de aumento en su producción por parte de la Capsaicina no favorecería los procesos inflamatorios pulpaes sino que empeoraría el cuadro clínico, efecto similar que se presenta con la IL-1 β . En cuanto a la la tendencia de la IL-10 a aumentar, sería un efecto favorable por ser una citoquina anti inflamatoria, cuya acción está dirigida a inhibir las citoquinas producidas por linfocitos Th1, suprimir la función de los macrófagos, especialmente la producción de citoquinas inflamatorias, favorece la proliferación de linfocitos B y síntesis de inmunoglobulinas y actuar como factor de crecimiento para tumores de células B.¹⁰¹

La secreción de proteínas, en este caso citoquinas, se debe a la activación de factores de transcripción que permiten la inducción de varios genes reguladores de inflamación. El NF- κ B es un importante factor transcripcional para la cascada de señalización inflamatoria e inicia la transcripción de varios

production in a human keratinocyte cell line HaCaT. *Int Immunopharmacol.* 2010 Oct;10(10):1279-83. Epub 2010 Aug 2.

⁹⁸ OHK LEE, HYOONG LEE, HEE PYO, HYUN KIM. Anti-inflammatory effects of Capsaicin in *Helicobacter pylori* infected gastric epithelial cells. *Journal compilation.* 2007;12:510-517.

⁹⁹ HUANG J. *Op. Cit.* pag.1279-83.

¹⁰⁰ MEYERS R. *op.cit.* Pag 188.

¹⁰¹ MEYERS R. *op.cit.* Pag 188.

mediadores proinflamatorios.¹⁰² La activación del NF- κ B se inicia por la señal inducida por degradación de las proteínas I κ B.¹⁰³ Esta degradación se da previo activación de la kinasa I κ B, y con su degradación, las proteínas de el NF- κ B, están libres para entrar al núcleo y activar la expresión de genes específicos.¹⁰⁴ Estudios han reportado que la Capsaicina inhibe la activación de varias células, como los macrófagos y las células de leucemia mielomonoblastica, entre otras.¹⁰⁵ La Capsaicina bloquea la activación del NF- κ B mediada por el forbol y la degradación de I κ B α y permitiendo la traslocación de la subunidad p65 no se puede traslocar al núcleo, lo que es esencial para la activación del NF- κ B.¹⁰⁶ El estudio realizado por Miyamoto y colaboradores ha demostrado la inhibición de NF- κ B por Capsaicina en pulpa dental, y reflejado en la reducción de TNF α por la inactivación de NF- κ B en FPH, cuando los FPH fueron pretratados con capsazepina 10uM por 30 minutos previo a la estimulación con Capsaicina, se observo la inhibición del TNF α inducida por inactivación de NF- κ B. Esto sugiere que el TRPV1 está involucrado en la inhibición de NF- κ B por Capsaicina.¹⁰⁷

Los FPH expresan TRPV1¹⁰⁸¹⁰⁹. El efecto de activación que ejerce la Capsaicina sobre el TRPV1 se genera por la unión de esta, a sitios de unión específicos para *vanilloides* que están presentes en los dominios del receptor.¹¹⁰ Se han identificado seis familias de TRPV, los cuales poseen

¹⁰²REUTER S, CHARLET J, JUNCKER T. effect of Curcumin on nuclear factor κ B signaling pathways in human cronic myelogenous K562 leukemia cells. Natural compounds and their roll in apoptotic cell signaling pathways. Ann. NY Acad. Sci. 2009;1171:436-447.

¹⁰³ SINGH S, NATARAJAN K. BHARAT B. Capsaicin (8-methyl-N-Vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor- κ B activation by diverse agents. J. Immunol 1996;157:4412-20.

¹⁰⁴ REUTER S, CHARLET J, JUNCKER T. op.cit. pag::436-447.

¹⁰⁵ SINGH S.Op. Cit.Pag. 4412-20.

¹⁰⁶ SINGH S. op.cit. pag 4412-20.

¹⁰⁷ MIYAMOTO R, TOKUDA M . Op. Cit pág 652-8

¹⁰⁸ MIYAMOTO R, TOKUDA M. Op. Cit pág 652-8

¹⁰⁹ CHAUDHARY P, MARTENSON ME, BAUMAN TK. Vanillide receptor expression and capsaicin excitation of rat dental primary afferent neurons. J Dent Res. 2001;80:1518-23.

¹¹⁰ CATERINA M, SCHUMACHER M, TOMIGA M. op.cit. pag:816-824.

características estructurales similares, identificándose que el rojo de rutenio ofrece bloqueo completo para todos los TRPVs. Sin embargo a nivel de FPH solamente se ha identificado el TRPV1, lo que indica la posibilidad de la existencia de cualquiera de los otros, y por lo tanto la posible acción por parte de la Capsaicina.¹¹¹ Adicionalmente se ha propuesto que la su interacción con la bicapa lipídica, altera la fluidez membranal e induce la formación de pseudocanales, puede ser un componente importante de la actividad biológica de la Capsaicina y sus análogos.¹¹²

En esta investigación se utilizó Capsazepina, un antagonista de la Capsaicina como bloqueador del receptor TRPV1, para determinar si el efecto de la Capsaicina se daba por vía del receptor antes mencionado, sin embargo, se encontró que con concentraciones de Capsazepina 10 μ M la respuesta fue muy variada dependiendo del mediador de la inflamación analizado, la concentración de Capsaicina y el tiempo del estímulo, se logró disminuir la acción de la Capsaicina sobre la producción de la IL 1 β a las 6 horas con las dos concentraciones de Capsaicina, se evidenció una leve tendencia a disminuir la acción de la Capsaicina 2, 5x10⁻⁵M con la IL8 a las 8 horas y en ocasiones se evidenció que las células pre-tratadas con Capsazepina lograron un efecto mayor que el obtenido por la Capsaicina, como en el caso de la IL6 (Capsaicina 5x10⁻⁵M y 2,5x10⁻⁵M) y la IL8 (Capsaicina 5x10⁻⁵M) a las 6 horas., por último se encontró, que la Capsazepina tuvo el mismo efecto de la Capsaicina a las 8 horas con las citoquinas analizadas con excepción de la IL8 y IL6..

La capsazepina ha sido usada como bloqueador de la respuesta de Capsaicina y la resinferotoxina tanto *in vivo* como *in vitro* por acción

¹¹¹ GARCIA-SANZ NURIA, VALENTE PIERLUIGI, GOMIS ANA. A role of the transient receptor potential domain of vanilloide receptor I in channel gating. The journal of neuroscience. 2007: 27(43);11641-11650.

¹¹² SZALLASI A, BLUMBER PM. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanism. Pharmacol Rev. 1999;51:159-211.

competitiva.¹¹³ La capsazepina tiene efectos diversos en su capacidad para inhibir la respuesta inducida por la Capsaicina, según la concentración utilizada desde 10nM, hasta 1000nM¹¹⁴ y el tipo celular¹¹⁵ en concordancia con los hallazgos de la presente investigación sobre FPH. Estas diferencias en el efecto bloqueador se explican porque el TRPV1, es un receptor considerado promiscuo, pues regula varias respuestas celulares porque estructuralmente incluye múltiples sitios de fosforilación, secuencias intracelulares, sitio de unión al calcio-calmodulina, sitio de unión al fosfatidil inositol difosfato¹¹⁶ PiP₂. El TRPV1 funciona como un canal iónico no selectivo que controla, tanto el influjo de calcio extracelular como la regulación de calcio almacenado intracelularmente.¹¹⁷ Se ha demostrado que en neutrófilos, la Capsazepina no suprime la respuesta de la Capsaicina, y por sí misma tiene efecto tanto en el influjo de calcio extracelular como en la liberación de calcio intracelular, este efecto es menos potente que la resinferotoxina y mayor que la Capsaicina dependiendo de la concentración utilizada.¹¹⁸

¹¹³ BEVAN S, HOTHI S, HUGHES G. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. Br. J. Pharmacol. 1992;107:544-552.

¹¹⁴ DRAY A, CAMPBELL E, HUGHES G. Antagonism of capsaicin-induced activation of C-fibres by a selective capsaicin antagonist, capsazepine. Br.J.Pharmacol. 102:pag.78:1991

¹¹⁵ SZALLASI A, GOSO C, BLUMBERG P, MANZINI S. Competitive inhibition by capsazepine of [3H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. J Pharmacol Exp Ther. 1993 Nov;267(2):728-33

¹¹⁶ PINGLE S, MATTA J, AHERN G. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. Department of Pharmacology, Georgetown University Medical Center. HEP (2007)179;155-171.

¹¹⁷ NAGY I Op. cit. pág 351-69

¹¹⁸ WANG JP, TSENG CS, SUN SP, CHEN YS, TSAI CR, HSU MF. Capsaicin stimulates the non-store-operated Ca²⁺ entry but inhibits the store-operated Ca²⁺ entry in neutrophils. Toxicol Appl Pharmacol. 2005 Dec 1;209(2):134-44.

8. CONCLUSIONES

La Capsaicina disminuye o aumenta producción de mediadores inflamatorios dependiendo del tipo de mediador, encontrándose además un efecto asociado al etanol 0,05%. La producción de PGE_2 tuvo una disminución con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}M$ y Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}M$ a las 6 y 8 horas, estando su efecto asociado al etanol 0,05%. Hubo una disminución de IL-8 asociada a Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}M$ a las 6 y 8 horas, asociada al etanol 0,05%. Existió una tendencia a disminuir la producción de IL-6 con Capsaicina $2,5 \cdot 10^{-5}M$ a las 6 y 8 horas, al igual que IL- 1β a las 6h, estando también asociada etanol 0,05%. La IL-10 tuvo una tendencia de aumento con Capsaicina $5 \cdot 10^{-5}M$ a las 6 y 8 horas, y hubo un efecto desfavorable de aumento de IL-12p70 a las 6 y 8 horas con ambas concentraciones de Capsaicina, efecto que también fue asociado al etanol 0,05%.

La Capsazepina no inhibió la acción de la Capsaicina y parece tener efecto directo sobre el TRPV1 en la producción de los mediadores de la inflamación analizados, por lo que el efecto de la Capsaicina esta parcialmente asociado al receptor (TRPV1).

Considerando que en la presente investigación se muestran tendencias interesantes, se requiere ampliar la muestra para poder confirmar los hallazgos.

9. PROYECCIONES

Analizar el efecto de la Capsaicina sobre modelos que simulen lo sucedido por caries dental, en donde la inflamación inicial del modelo sea generado por la presencia de LPS.

Estudiar el flujo de calcio intracelular asociado a la Capsaicina.

Estudiar el efecto directo de la capsazepina sobre el TRPV1 de FPH .

Determinar si el efecto de la Capsaicina es a través de TRPVs, utilizando como bloqueador el Rojo de Rutenio.

BIBLIOGRAFIA

1. ABBAS A, LINCHMAN A, PILLAI S. Inmunología celular y molecular. 2008; 277
2. BARKHORDAR RA, HAYASHI C, HUSSAIN MZ. Detection of interleukin-6 in human dental pulp and periapical lesions. Endodental Traumatol. 1999 Feb;15(1):26-27
3. BARKHORDAR RA, GHANI QP, RUSSELL TR, HUSSAIN MZ. Interleukin-1 β activity and collagen synthesis in human dental pulp fibroblasts. J Endod. 2002 Mar;28(3):157-9 .
4. BEVAN S, HOTH S, HUGHES G. Capsazepine: a competitive antagonist of the sensory neurone excitant capsaicin. Br. J. Pharmacol. 1992;107:544-552
5. BHUTANI M, PATHAK AK, NAIR AS, KUNNUMAKKARA AB, GUHA S, SETHI G, AGGARWAL BB. Capsaicin is a novel blocker of constitutive and interleukin-6-inducible STAT3 activation. Clin Cancer Res. 2007 May 15;13(10):3024-32
6. BUCK SH, BURKS TF. The neuropharmacology of capsaicin: review of some recent observations. Pharmacol rev. 1986 Sep;38(3):179-225
7. CATERINA MJ, SCHUMACHER MA, TOMINAGA M, ROSEN TA, LEVINE JD, JULIUS D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. Nature 1997 Oct;389(6653):816-24
8. CAVIEDES JF, AZUERO MM, MORENO GC. Control de la Sustancia P en la inflamación neurogenica del tejido pulpar con capsaicina. Federacion Odontologica Colombiana. 1998;9:56
9. CHANG MC, JENG JH, LIN CP, LAN WH, TSAI W, HSIEH CC. Thrombin activates the growth, cell-cycle kinetics, and clustering of human dental pulp cells. J Endod. 1999 Feb;25(2):118-22.
10. CHANG M, LIN C, HAUNG T, Trombin-induced DNA synthesis of cultured human dental pulp cells is dependen ton its proteolytic activity and modulated by prostaglandin E₂. J. Endod. 1998;24:11:709-13
11. CHAUDHARY P, MARTENSON ME, BAUMANN TK. Vanilloid receptor expresión and capsaicin excitation of rat dental primary afferent neurons. J Dent Res. 2001;116:223-5

12. COHEN S, BURNS C. Pathway of the pulp. Sexta edición. Mosby;2008.
13. COHEN JS, READER A, FERTEL R, BECK M, MEYERS WJ. A radioimmunoassay determination of the concentration of prostaglandins E₂ AND F₂ α in painful and asymptomatic human dental pulps. J. Endod. 1985 Aug;11(8):330-5
14. CHIDIAC J, HAWWA N, BALIKI M. A perfusion technique for the determination of proinflammatory mediators induced by intradental application of irritants. Journal of Pharmacological and toxicological methods. 2001;125-130
15. CHIDIAC J, AL-ASMAR B, RIFAI K, JABBUR S. Inflammatory mediators release following application of irritants on the rat injured incisor. The effect of treatment with anti-inflammatory drugs. 2009;46:194-200.
16. COIL J, TAM E, WATERFIELD JD. Proinflammatory cytokine profiles in pulp fibroblasts stimulated with lipopolysaccharides and methyl mercapta. J. Endod;2004 Feb;30(2);88-91
17. COOPER G, ASUMAN R. La célula. Marban. 2006. 548-549
18. D'SOUZA R, BROWN JR. Detection and characterization of interleukin-1 in human dental pulps. Arch Oral Biol. 1989;34(5):307-13
19. DENDA M, FUZIWARA S, INOUE K, DENDA S, AKAMATSU H, TOMITAKA A, MATSUNAGA K. Immunoreactivity of VR1 on epidermal keratinocyte of human skin. Biochem Biophys Res Commun. 2001 Aug 3;285(5):1250-2.
20. DRAY A, CAMPBELL E, HUGHES G. Antagonism of capsaicin-induced activation of C-fibres by a selective capsaicin antagonist, capsazepina. Br.J.Pharmacol. 102;pag.78:1991
21. DVORAKOVA M, KUMMER W. Transient expression of vanilloid receptor subtype 1 in rat cardiomyocytes during development. Histochem cell Biol. 2001 Sep;116(3):223-5
22. GARCIA-SANZ NURIA, VALENTE PIERLUIGI, GOMIS ANA. A role of the transient receptor potential domain of vanilloid receptor I in channel gating. The journal of neuroscience. 2007; 27(43);11641-11650.
23. GEOFFREY A, ARAUJO O. Capsaicin: identification, nomenclature and pharmacotherapy. Ann Pharmacother, 1993;27:330-336

24. HAHN CL, BEST AM, TEW JG. Cytokine induction by streptococcus mutans and pulpal pathogenesis. *Infect Immun.* 2000 Dec;68(12):6785-6789
25. HAN S, KEUM Y, CHUN K. Suppression of phorbol ester-induced NF- κ B activation by capsaicin in cultured human promyelocytic leukemia cells. *Arch. Pharmacol. Res.* 2002;25:475-479
26. HARGREAVES KM, JACKSON DL, BOWLES WR. Adrenergic regulation of capsaicin-sensitive neurons in dental pulp. *J Endod.* 2003 Jun;29(6):397-9
27. HAUTKAPPE M, ROIZEN MF, TOLEDANO A, ROTH S, JEFFRIES JA, OSTERMEIER AM. Review of the effectiveness of capsaicin for painful cutaneous disorders and neural dysfunction. *Clin J Pain.* 1998 Jun;14(2):97-106
28. HOSOYA S, MATSUSHIMA K. Stimulation of interleukin-1 β production of human dental pulp cells by porphyromonas endodontalis lipopolysaccharides. *J. Endod.* 1997 Jan; 23(1):39-42.
29. HOSOYA S, MATSUSHIMA K, OHBAYASHI E, YAMAZAKI M, SHIBATA Y, ABIKO Y. Stimulation of interleukin-1 β -independent interleukin-6 production in human dental pulp cells by lipopolysaccharide. *Biochem mol med.* 1996 Dec; 59(2):138-143.
30. HUANG GT, POTENTE AP, KIM JW, CHUGAL N, ZHANG X. Increased interleukin-8 expression in inflamed human dental pulps. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 Aug;88(2):214-20.
31. HUANG J, QIU L, DING L, WANG S, WANG J, ZHU Q, SONG F, HU J. Ginsenoside Rb1 and paeoniflorin inhibit transient receptor potential vanilloid-1-activated IL-8 and PGE₂ production in a human keratinocyte cell line HaCaT. *Int Immunopharmacol.* 2010 Oct;10(10):1279-83
32. MAK T, SIMARD J. *Handbook of immune response.* 1998: 236
MALE D, BROSTOFF J, ROTH D, ROITT I. *Immunology.* Seventh edition, Mosby Elsevier. 2006;140-141
33. MATUCCI C, McCARTHY G. Neurogenic influences in arthritis: potential modifications by capsaicin. *J Rheumatol.* 1995;22:147-49
34. MATUCCI M, MARABINI S, JANTSCH S, CAGNONI M, PARTSCH G. Effects of capsaicin on the metabolism of rheumatoid arthritis synoviocytes in vitro. *Ann Rheum Dis.* 1990 Aug;49(8):598-602
35. MEYERS R. *IMMUNOLOGY. From cell biology to disease.* 2007. Pag 188

36. MIYAMOTO R, TOKUDA M, SAKUTA T, NAGAOKA S, TORII M. Expression and characterization of vanilloid receptor subtype 1 in human dental pulp cell cultures. *J. Endod.* 2005 Sep;31(9):652-658.
37. MORENO G, CAVIEDES J. Efecto de la capsaicina sobre la proliferación y ciclo celular de fibroblastos pulpareos humanos. *Federación Odontológica Colombiana.* 2002:89-99.
38. NAGAOKA S, TOKUDA M, SAKUTA T, TAKETOSHI Y, TAMURA M, TAKADA H, TAWAGOE M. Interleukin-8 gene expression by human dental pulp fibroblast in cultures stimulated with Prevotella intermedia lipopolysaccharide. *J. Endod.* 1996 Jan;22(1):9-12
39. OHK LEE, HYOUNG LEE, HEE PYO, HYUN KIM. Antiinflammatory effect of Capsaicin in helicobacter pylori-infected gastric epithelial cells. *Journal compilation.* 2007;12:510-517
40. PARTSCH G, MATUCCI-CERINIC M, MARABINI S, JANTSCH S, PIGNONE A, CAGNONI M. Collagenase synthesis of rheumatoid synoviocytes: Dose-dependent stimulation by substance P and Capsaicin. *Scand J Rheumatol.* 1991;20(2):98-103
41. PAUL W. *FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY.* 2008,106
42. PINGLE SC, MATTA JA, AHERN GP. Capsaicin receptor: TRPV1 a promiscuous TRP channel. *Handb Exp Pharmacol.* 2007;(179):155-171
43. POLATO DE LIMA, Denise. Farmacia de Manipulação e Homeopatia. Citada, abril 15, 2004. Disponible en internet: <http://www.idemperidem.com/textos/capsaicina.htm>
44. REUTER S, CHARLET J, JUNCKER T. Effect of Curcumin on nuclear factor κ B signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. *Natural compounds and their role in apoptotic cell signaling pathways.* *Ann. NY Acad. Sci.* 2009;1171:436-447.
45. SEIKI N, SHIRASAKI H, KIKUCHI M, HIMI T. Capsaicin induces the production of IL-6 in human upper respiratory epithelial cells. *Life Sciences.* 2007;1592-1597
46. SINGH S, NATARAJAN K, BHARAT B. Capsaicin (8-methyl-N-Vanillyl-6-nonenamide) is a potent inhibitor of nuclear transcription factor- κ B activation by diverse agents. *J. Immunol* 1996;157:4412-20.
47. SOUTHALL MD, LI T, GHARIBOVA LS, PEI Y, NICOL GD, TRAVERS JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 2003 Jan;304(1):217-2
48. STANISLAWSKI L, CARREAU JP, POUCHELET M, CHEN ZH, GOLDBERG M. In vitro culture of human dental pulp cells: some aspects of cell emerging early from the explant. *Clin Oral Investig.* 1997 Sep;1(3):131-140

49. SZALLASI A, GOSO C, BLUMBERG P, MANZINI S. Competitive inhibition by capsazepine of [3H]resiniferatoxin binding to central (spinal cord and dorsal root ganglia) and peripheral (urinary bladder and airways) vanilloid (capsaicin) receptors in the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 1993 Nov;267(2):728-33
50. TOKUDA M, NAGAOKA S, TORII M. Interleukin-10 inhibits expression of interleukine-6, IL-8 mRNA in human dental pulp cell cultures via nuclear factor-kappaB deactivation. *J Endod.* 2002 Mar;28(3):177-80
51. TOKUDA M, SAKUTA T, FUSHUKU A, TORII M, NAGAOKA S. Regulation of interleukin-6 expression in human dental pulp cell cultures stimulated with prevotella intermedia lipopolysaccharide. *J Endod.* 2001 Apr;27(4):273-277
52. TREVISANI M, SMART D, GUNTHORPE MJ, TOGNETTO. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci.* 2002;5:546-51
53. TSUKAMOTO Y, FUKUTANI S, SHIN-IKE T, KUBOTA T, SATO S, SUZUKI Y, MORI M. Mineralized nodule formation by cultures of human dental pulp-derived fibroblast. *Arch Oral Biol.* 1992 Dec; 37(12):1045-1055.
54. VERONESI B, CARTER JD, DEVLIN RB, SIMON SA, OORTGIESEN M. Neuropeptides and capsaicin stimulate the release of inflammatory cytokines in a human bronchial epithelial cell line. *Neuropeptides.* 1999 Dec;33(6):447-56.
55. VETTER I, WYSE B, ROBERTS-THOMSON S, MONTEITH G, CABOT P. Mechanisms involved in potentiation of transient receptor potential vanilloid 1 responses by ethanol. *European Journal of Pain* 12;2008:441-454.
56. WANG JP, TSENG CS, SUN SP, CHEN YS, TSAI CR, HSU MF. Capsaicin stimulates the non-store-operated Ca²⁺ entry but inhibits the store-operated Ca²⁺ entry in neutrophils. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2005 Dec 1;209(2):134-44.

ANEXO 1

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES ODONTOLÓGICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Según la resolución del Ministerio de Salud de Colombia No. 008430 de 1993 y Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de 2000.

El estudio se denomina: “Asociación entre la producción de PGE₂, citoquinas proinflamatorias e IL-10, en fibroblastos pulpares humanos estimulados con Capsaicina, con el Receptor de Potencial Transitorio Vanilloide subtipo (TRPV1).

El objetivo del estudio es: observar si la expresión de PGE₂ de FPH estimulados con capsaicina en diferentes dosis, está asociado al VR1 y depende del flujo de calcio.

Para el cual es necesario tomar una muestra de tejido pulpar humano de dientes que han sido indicados para exodoncia según manejo del odontólogo tratante. Los dientes serán extraídos y con una fresa zecrya y abundante refrigeración se realizara un corte desde la corona hasta el ápice que permita seccionar el diente sagitalmente y remover el tejido pulpar para posteriormente ser seccionado y cultivado. Los restos del diente serán manejados como desecho biológico.

Las muestras serán conservadas adecuadamente y serán utilizadas únicamente en esta investigación, una vez finalice el proyecto, las muestras serán destruidas.

Yo _____ autorizo al grupo investigador para hacer uso de mi diente_____. Cuya extracción fue solicitada por _____ como parte el tratamiento que me está realizando.

Se me ha explicado y he entendido en qué consiste la investigación y cómo se manejará el diente y el tejido pulpar.

Las dudas pueden ser resueltas por comunicación con: Gloria Cristina Moreno Abello, (e-mail:gcmoreno@javeriana.edu.co), y María Alexandra Bedoya Mejía (e-mail:malexbedoya@yahoo.es) o al teléfono 3208320 extensión 2875.

Fecha: _____ Nombre: _____

Firma: _____

No. de Cédula _____

Testigo # 1:

Testigo # 2:

Nombre _____ Nombre: _____

No.de cédula _____ No.de cédula _____

Firma _____ Firma _____

ANEXO 2

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

CENTRO DE INVESTIGACIONES ODONTOLÓGICAS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

Según la resolución del Ministerio de Salud de Colombia No. 008430 de 1993 y Pautas Éticas Internacionales para la Investigación y Experimentación Biomédica en Seres Humanos de 2000.

Usted está siendo invitado a participar en un proyecto de investigación, propuesto por el Centro de Investigaciones Odontológicas. Es muy importante que el investigador le explique claramente en qué consiste el estudio y cuáles son sus posibles riesgos. Después de leer y entender la información que se presenta a continuación y usted acepta participar en el estudio, por favor firme este documento.

1. La participación en este estudio es totalmente voluntaria.
2. La participación en este estudio puede no beneficiarlo a usted directamente, pero los resultados obtenidos podrían beneficiar posteriormente a otras personas.
3. Usted tendrá libertad de retirarse de la investigación en cualquier momento sin sanción alguna; esta decisión no perjudicará la relación con el Odontólogo tratante.
4. Ninguna persona que acepte participar en este estudio recibirá beneficios económicos como pago por su participación.

5. Este estudio no tiene ningún interés económico por parte del grupo de investigación, así como tampoco el desarrollo de patentes con base en el material recolectado.
6. Los registros con la información de cada individuo son de carácter absolutamente confidencial, solamente usted y el equipo de investigación tendrán acceso a ella.
7. Cuando los resultados de este estudio se reporten en revistas o congresos científicos, se omitirán los nombres de los participantes.
8. El riesgo existente en la toma de muestra(s) para este estudio es muy bajo y por lo tanto no reviste riesgo para su salud.
9. Sí usted tiene dudas con respecto al estudio o desea obtener alguna información adicional, no dude en manifestarlo a los investigador(es).

A usted se le debe entregar una copia de este consentimiento informado

