

**CUANTIFICACIÓN DE NEUROPEPTIDOS
INVOLUCRADOS EN LA INFLAMACIÓN
NEUROGÉNICA DEL TEJIDO PULPAR HUMANO**

J. NELSON LOMBANA SÁNCHEZ Q.F

**Tesis presentada como requisito parcial
Para la obtención del título de
Magíster Scientiae en Biología**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
BOGOTÁ D.C NOVIRMBRE DE 2003**

**CUANTIFICACIÓN DE NEUROPEPTIDOS
INVOLUCRADOS EN LA INFLAMACIÓN
NEUROGÉNICA DEL TEJIDO PULPAR HUMANO**

J. NELSON LOMBANA SÁNCHEZ Q.F

**Tesis presentada como requisito parcial
Para la obtención del título de
Magíster Scientiae en Biología**

DIRECTOR

JAVIER CAVIEDES BUCHELI O.D., M.Sc

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
BOGOTÁ D.C NOVIEMBRE DE 2003**

**CUANTIFICACIÓN DE NEUROPEPTIDOS
INVOLUCRADOS EN LA INFLAMACIÓN
NEUROGÉNICA DEL TEJIDO PULPAR HUMANO**

J. NELSON LOMBANA SÁNCHEZ Q.F

Dra. Sandra Páez . M.Sc

JURADO

Dra.Claudia Cifuentes Biol.. M.Sc

JURADO

Dr. Octavio González. O.D., M.Sc

JURADO

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
BOGOTÁ D.C NOVIEMBRE DE 2003**

ACEPTACIÓN DE LA TESIS:

CUANTIFICACIÓN DE NEUROPEPTIDOS INVOLUCRADOS EN LA INFLAMACIÓN NEUROGÉNICA DEL TEJIDO PULPAR HUMANO

Dra. Angela Umaña. M.Phil

**DECANO ACADEMICO
FACULTAD DE CIENCIAS**

Dr. Julio Alberto Arango

**DECANO DEL MEDIO UNIVERSITARIO
FACULTAD DE CIENCIAS**

Dr. Carlos Corredor P. Ph.D

**DIRECTOR POSTGRADOS
FACULTAD DE CIENCIAS**

Dr. Javier Caviedes. O.D. M.Sc

**DIRECTOR UNIDAD POSTGRADOS
FACULTAD DE ODONTOLOGIA
DIRECTOR DE TESIS**

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE POSTGRADO
BOGOTÁ D.C NOVIEMBRE DE 2003**

ADVERTENCIA

LA UNIVERSIDAD NO SE HACE RESPONSABLE POR LOS CONCEPTOS EMITIDOS POR SUS ALUMNOS EN SUS TRABAJOS DE TESIS. SOLO VELARÁ PORQUE NO SE PUBLIQUE NADA CONTRARIO AL DOGMA Y A LA MORAL CATOLICA, Y PARA QUE LAS TESIS NO CONTENGAN ATAQUES O POLÉMICAS PURAMENTE PERSONALES, ANTES BIEN SE VEA EN ELLAS EL ANHELO DE BUSCAR LA VERDAD Y LA JUSTICIA.

(Artículo 23. Resolución 13 del 6 de julio de 1996 del reglamento de la Pontificia Universidad Javeriana)

A DIOS ...

... A MI MAESTRO JESÚS

“Aquello que encanta,

también guía y protege.

Apasionadamente obsesos

por cualquier cosa que amemos,

una avalancha de magia

aplana el camino hacia el frente,

nivela reglas,

razona disiente,

nos lleva consigo

por sobre los abismos,

los miedos y las dudas.”

Richard Bach

AGRADECIMIENTOS

Al Doctor Javier Caviedes Bucheli, por su amistad, por dirigir este trabajo y permitirme incursionar en este profundo tema de los neuropéptidos.

A mis grandes amigos de la Facultad de Ciencias de la Pontificia Universidad Javeriana, la Doctora Claudia Cifuentes, el Doctor Jaime Augusto Casas y el Doctor Julio Alberto Arango, por que personas como ellas me permiten soñar con la construcción de un mundo mejor.

A Reynaldo Hernández, quien me ha enseñado que en el aprender a dar sin esperar recibir, encontramos el verdadero sentido de la vida.

A la Doctora Myriam Sánchez de Gómez, jefe del grupo de hormonas de la Universidad Nacional de Colombia, por su inmensa y desinteresada colaboración en la ejecución de los proyectos de investigación en neuropéptidos.

A la Doctora Stella Carrasco de Rodríguez, por que gracias a sus enseñanzas, pude emprender los trabajos de investigación en el área de neuropéptidos.

Al Doctor Eduardo Díaz, sus conocimientos, su amistad y su espíritu de colaboración, hacen de el una persona difícil de encontrar en el camino de la investigación.

En general a los miembros del Laboratorio de Hormonas del Departamento de Química, de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional de Colombia.

Al Centro de investigaciones Odontológicas de la Pontificia Universidad Javeriana.

A Luisa Fernanda Vera Galindo, mi esposa adorada, quien me colaboró incansablemente en la terminación de este proyecto.

Tabla de contenido

1.	Introducción.....	1
2.	Antecedentes Bibliográficos.....	4
2.1.	Anatomía del tejido pulpar	4
2.2.	Células del tejido pulpar	4
2.2.1.	Fibroblastos	4
2.2.2.	Odontoblastos	4
2.2.3.	Células mesenquimatosas	4
2.3.	Fibras colágenas del tejido pulpar	5
2.4.	Matriz extracelular en el tejido pulpar	5
2.5.	Vasos sanguíneos en la pulpa dental	6
2.6.	Fibras nerviosas del tejido pulpar	7
2.7.	Inervación del tejido pulpar	8
2.8.	Neurofisiología del tejido pulpar	9
2.9.	Neuropéptidos sensoriales en la pulpa dental.....	11
2.10.	Neuropéptidos simpáticos de la pulpa dental.....	12
2.11.	Neuropéptidos parasimpáticos en la pulpa dental.....	12
2.12.	Neurotransmisores	13
2.12.1.	Neuropéptidos de cadena corta.....	15
2.12.2.	Coliberación de los neuropéptidos con los transmisores de bajo peso molecular.	18
2.12.3.	Eliminación del transmisor de la hendidura sináptica.	19
2.13.	Neuropéptidos en el tejido pulpar humano.	20
2.13.1.	Sustancia P (SP)	20
2.13.2.	Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)	25
2.13.3.	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)	28
2.13.4.	Neurokinina A (NKA)	31

2.13.5. Neuropeptido Y (NPY)	33
2.14. Estudios recientes en neuropeptidos	35
2.15. Radioinmunoanálisis (RIA)	39
3. Materiales y métodos	40
3.1. Muestras	40
3.2. Procedimiento en los pacientes	40
3.3. Almacenamiento de los tejidos pulpaes	41
3.4. Extracción de los neuropeptidos del tejido pulpar	41
3.5. Estandarización del radioinmunoanálisis específico para los neuropeptidos	43
3.5.1. Reactivos utilizados	43
3.5.2. Montaje del radioinmunoanálisis	43
3.5.3. Tiempo de primera incubación	46
3.5.4. Tiempo de segunda incubación – Separación de las fracciones libres y unidas	46
3.5.5. Recolección de datos	47
3.6. Procesamiento de los resultados	47
3.6.1. U-test de Mann Withney	48
3.6.2. Estadístico F – Cociente de varianzas	49
3.7. Aspectos éticos	50
4. Resultados	
4.1. Sistema de extracción de neuropeptidos	53
4.2. Radioinmunoanálisis de los neuropeptidos	53
4.2.1. Curva de calibración Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)	56
4.2.2. Curva de calibración Sustancia P (SP)	56
4.2.3. Curva de calibración de neurokinina A (NKA)	57
4.2.4. Curva de calibración de neuropeptido Y (NPY)	57
4.2.5. Curva de calibración de Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)	57

4.3.	Niveles del Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)	58
4.3.1.	Prueba de contraste U-test Mann Withney (VIP)	59
4.3.2.	Prueba de contraste – Análisis de varianzas (VIP)	60
4.4.	Niveles de Sustancia P (SP)	63
4.4.1.	Prueba de contraste U-test Mann Withney (SP)	64
4.4.2.	Prueba de contraste – Análisis de varianzas (SP)	65
4.5.	Niveles de neurokinina A (NKA)	68
4.5.1.	Prueba de contraste U-test Mann Withney (NKA)	69
4.5.2.	Prueba de contraste – Análisis de varianzas (NKA)	70
4.6.	Niveles de neuropéptido Y (NPY)	73
4.6.1.	Prueba de contraste U-test Mann Withney (NPY)	74
4.6.1.	Prueba de contraste – Análisis de varianzas (NPY)	75
4.7.	Niveles de Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)	78
4.7.1.	Prueba de contraste U-test Mann Withney (CGRP)	79
4.7.2.	Prueba de contraste – Análisis de varianzas (CGRP)....	80
4.8.	Niveles de neuropéptidos en pulpas sanas	83
4.9.	Niveles de neuropéptidos en pulpitis irreversible	84
4.10.	Niveles de neuropéptidos en pulpitis inducida	85
5.	Discusión de resultados	86
6.	Conclusiones	95
7.	Recomendaciones	97
8.	Bibliografía	98

Índice de tablas

Tabla 1.	Montaje del radioinmunoanálisis	45
Tabla 2.	Niveles del Péptido Intestinal vasoactivo (VIP).....	58
Tabla 3.	Niveles de Sustancia P (SP)	63
Tabla 4.	Niveles de Neurokinina A (NKA)	68
Tabla 5.	Niveles de Neuropeptido Y (NPY)	73
Tabla 6.	Niveles de Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)	78
Tabla 7.	Niveles de Neuropeptidos en pulpas sanas	83
Tabla 8.	Niveles de Neuropeptidos en pulpitis irreversible	84
Tabla 9.	Niveles de Neuropeptidos en pulpitis Inducida	85

Índice de Gráficas

Gráfica 1.	Niveles del Péptido Intestinal vasoactivo (VIP)	58
Gráfica 2.	Niveles de Sustancia P (SP)	63
Gráfica 3.	Niveles de Neurokinina A (NKA)	68
Gráfica 4.	Niveles de Neuropeptido Y (NPY)	73
Gráfica 5.	Niveles de Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)	78
Gráfica 6.	Niveles de Neuropeptidos en pulpas sanas	83
Gráfica 7.	Niveles de Neuropeptidos en pulpitis irreversible	84
Gráfica 8.	Niveles de Neuropeptidos en pulpitis Inducida	85

Resumen

En el presente trabajo se cuantificó por Radioinmunoanálisis la liberación de 5 Neuropeptidos en tejido pulpar con diagnóstico clínico de pulpitis irreversible aguda, tomando como controles pulpas sanas y tejido pulpar con inflamación inducida.

Para la Sustancia P (SP) se encontraron valores de 0,33pg, 154,37pg y 22,98pg por miligramo de tejido; para la Neurokinina A (NKA) se encontraron valores de 73,33pg, 194,98pg y 149,11pg por miligramo de tejido; para el Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP) se encontraron valores de 67,12pg; 77,96pg y 69,08pg por miligramo de tejido; para el Neuropeptido Y (NPY) se encontraron valores de 160,39pg, 588,63pg y 441,81pg por miligramo de tejido; para el Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP) se encontraron valores de 212,71pg, 619,41pg y 510,63pg por miligramo de tejido, para pulpas sanas, pulpitis irreversible aguda y pulpitis inducida respectivamente.

En todos los neuropeptidos se encontró mayor expresión en pulpitis irreversible aguda que en pulpitis inducida; pero solo en SP, NKA, CGRP y NPY, el aumento fue estadísticamente significativo entre los dos tipos de inflamación y las pulpas sanas, pero no fue sino en SP y en NPY donde además se presentó un aumento significativo en la pulpitis irreversible aguda sobre la pulpitis inducida.

Estos resultados sugieren que la inflamación neurogénica del tejido pulpar está condicionada por la liberación de péptidos como la SP, NKA y CGRP presentes en las fibras nerviosas tipo C, y por NPY de origen simpático, todos presentes en fibras nerviosas que están en estrecha relación con los vasos sanguíneos del tejido pulpar.

El VIP, de origen parasimpático y presente en fibras nerviosas que no atraviesan la dentina, no participa en los procesos inflamatorios del tejido pulpar.

Abstract

In the present paper I quantify per radioimmunometric the liberation of five neuropeptides in pulpar tissue with a clinic diagnose of a hard irreversible inflammation, taking for the control wealthy pulps and pulps tissue with caused by inflammation.

For the substance P (SP) I found levels of 0.33pg, 154.37pg and 22.98pg per milligram of tissue; for the Neurokinine A NKA I found levels of 73,33 pg, 194,98 pg and 149,11 pg per milligram of tissue; for the Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP) I found levels of 67,12 pg, 77,96 pg and 69,08 pg per milligram of tissue; for the Neuropeptide Y (NPY) I found levels of 160,39 pg, 588,63 pg and 481,81 pg per milligram of tissue; for the Peptide related with the Calcitonine Gene (CGRP) I found levels of 212,71 pg, 619,41 pg and 510,63 pg per milligram of tissue for wealthy pulps, irreversible hard inflammation and inflammation caused by, respectively.

In all the neuropeptides I found a big amount of hard irreversible inflammation comparing with the ones with caused by inflammation, but only in SP, NKA, CGRP and NPY, the highness was found significative between the two types of inflammation and the wealthy pulps, but it was only in SP and in NPY where were shown a significative highness in the irreversible hard inflammation comparing with the caused by inflammation in the pulps.

These results suggest that the neurogenic inflammation of the pulps tissue was conditioned to the peptides liberation such us SP, NKA and CGRP, all present in the nerve fibers type C and by NPY of sympatic origin, all present in the nerve fibers that are in deep relation with the blood vessels of the pulp tissue.

The VIP of parasympatic origin and present in nerve fibers that do not cross the dentine, do not participate in the inflamm process of the pulps tissue.

1. Introducción

Existe la necesidad de cuantificar la expresión de la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), el péptido vasoactivo intestinal (VIP), la neurokinina A (NKA) y el neuropéptido Y (NPY), en tejidos pulpares humanos que presenten pulpitis irreversible aguda e inflamación inducida, y compararla con la expresión de estos neuropéptidos en pulpas sanas, para determinar el patrón de liberación de estas moléculas en los procesos de inflamación aguda, con el fin de encontrar en un futuro, medidas terapéuticas que puedan llevar al control de la inflamación del tejido pulpar lesionado, para de esta forma preservarlo y generar mecanismos que lleven a la reparación y regeneración de este tejido.

Así mismo, el conocer los niveles de expresión de estos neuropéptidos en los procesos inflamatorios del tejido pulpar humano, sirve como punto de partida a investigaciones que nos permitan conocer estos mecanismos en otros tejidos, donde la inflamación dependa directa o indirectamente de la liberación de estos neuropéptidos.

La pulpa dental es un tejido de origen mesenquimal, originada a partir de la papila dental, la cual se desarrolla cuando proliferan las células ectomesenquimales y se condensan en sitios adyacentes al listón dentario.

A diferencia de otros tejidos conectivos, la pulpa está rodeada por tejidos duros como la dentina, la cual le brinda cierta particularidad, ya que por esta razón la pulpa dental tiene muy restringida su capacidad de aumentar de volumen en episodios de vasodilatación, por lo cual se considera a este tejido como un sistema de baja adaptabilidad, en el cual es fundamental la cuidadosa regulación del flujo sanguíneo.

La inervación del tejido pulpar está dada por dos tipos de fibras nerviosas que están en íntima relación con la microcirculación pulpar, denominadas fibras A-delta y fibras tipo C.

Las fibras aferentes amielínicas tipo C van entorchadas alrededor de los vasos sanguíneos y presentan un diámetro pequeño, conteniendo en sus porciones terminales neuropéptidos como la sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), neurokinina A (NKA), neuropéptido Y (NPY) y péptido vasoactivo intestinal (VIP), los cuales pueden coexistir dentro de la misma neurona, y pueden ser liberados luego de la estimulación nerviosa.

El papel de estos neuropéptidos en la inflamación del tejido pulpar sigue generando nuevos conceptos en lo referente a la relación neurovascular de los componentes pulpares, por lo que surgió el término “inflamación neurogénica” del tejido pulpar, el cual describe cambios patológicos en la relación neurovascular como resultado de la inflamación.

Los niveles de estos neuropéptidos son definitivos en los episodios de la inflamación pulpar, la cual ha sido denominada “inflamación neurogénica”, por la interacción neurovascular de sus componentes, ya que la estimulación de las fibras nerviosas da como resultado una vasodilatación y extravasación de plasma en el área circulante.

Esta inflamación es una respuesta fisiológica específica del organismo o tejido contra una lesión o un agente irritante, y en el caso concreto del tejido pulpar puede ser ocasionada por factores externos tales como la estimulación mecánica producida durante el corte de la estructura dental; estimulación química debido a la interacción del tejido con los componentes de algunos materiales dentales; y estimulación bacteriana, causada por los productos obtenidos como resultado de la caries dental.

Es importante el estudio de los neuropéptidos y el papel que juegan en la inflamación neurogénica del tejido pulpar, porque debido a su naturaleza somatosensorial y por ser vasodilatadores o vasoconstrictores, la

disminución de su presencia puede llevarnos al control de la inflamación y la necrosis del tejido pulpar.

Estas razones permiten plantear como objetivo general de este trabajo, la cuantificación por métodos inmunoradiométricos de los niveles de los neuropéptidos: sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), neurokinina A (NKA), neuropéptido Y (NPY) y péptido vasoactivo intestinal (VIP), en tejido pulpar humano sano, en pulpas con diagnóstico clínico de pulpitis irreversible aguda y en pulpas sometidas a inflamación inducida para observar el comportamiento en la liberación de estos péptidos, en los dos mecanismos inflamatorios mas frecuentes en este tejido.

Como objetivos específicos del trabajo se encuentran:

Establecer las condiciones de extracción de los péptidos del tejido pulpar; estandarizar el radioinmunoanálisis para la cuantificación de la sustancia P (SP), péptido vasoactivo intestinal (VIP), Neurokinina A (NKA), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), y del neuropéptido Y (NPY); comparar los niveles de estos 5 neuropéptidos en tejidos pulpares humanos sanos, con los niveles que se presentan en tejidos con pulpitis irreversible aguda y con inflamación inducida, y comparar la liberación de estos 5 neuropéptidos en tejidos con pulpitis irreversible aguda con la presentada en tejidos sometidos a inflamación inducida, para ver las diferencias en estos dos mecanismos de inflamación. La significancia estadística se analizara mediante pruebas no paramétricas y análisis de varianzas.

2. Antecedentes Bibliográficos

2.1. Anatomía del tejido pulpar

La pulpa dental es un tejido conectivo formado por células, fibras colágenas, matriz extracelular, vasos sanguíneos y fibras nerviosas cuyo origen embrionario es ectomesenquimal. Está ubicada en la parte interna de las porciones coronales y radiculares del diente, rodeada herméticamente por tejidos duros, como el cemento, esmalte y la dentina (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Kim, S. 1990).

2.2. Células del tejido pulpar

2.2.1. Fibroblastos

Son las células básicas del tejido pulpar, similares a las de cualquier tejido conectivo del cuerpo humano. Están distribuidos por todo el lumen de la pulpa dental, teniendo como principal función la producción de colágeno tipo I y tipo II (Cohen, S., et al. 1994) (Bender, I. 1978) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Ten, A. 1989).

2.2.2. Odontoblastos

Son las células más especializadas y diferenciadas del tejido pulpar, se distribuyen por todo el lumen de la pulpa y su función es la producción de dentina, siendo el mecanismo de defensa para reducir al máximo posible la exposición de la pulpa por atricción y caries dental (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Avery, J. 1971) (Ten, A. 1989).

2.2.3. Células mesenquimatosas

Están presentes en la pulpa dental como en cualquier tejido conectivo; tienen la capacidad de diferenciarse en macrófagos, fibroblastos y

odontoblastos, según las necesidades fisiológicas del diente (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S., and Bender, I. 1987) (Avery, J. 1971) (Ten, A. 1989).

2.3. Fibras colágenas del tejido pulpar

Condicionan en mayor grado la estructura del tejido pulpar. En la pulpa las fibras son iguales que en otros tejidos conectivos. Estas fibras forman una red reticular laxa que da apoyo a otros elementos estructurados de la pulpa. Se distribuyen por todo el lumen de la pulpa en estrecha relación con los odontoblastos, ya que estos últimos junto a los fibroblastos son los encargados de sintetizar este colágeno.

Las fibras colágenas, los odontoblastos, las fibras nerviosas y los vasos sanguíneos otorgan protección estructural durante las lesiones que sufre la pulpa dental.

El colágeno sintetizado es depositado en dos formas principales: Difusa, en la que fibras colágenas carecen de orientación definida, y en forma de paquete donde haces grandes y rugosos van paralelos a nervios o van independientes.

El tejido pulpar coronal tiene más colágeno en paquetes que colágeno difuso. En las pulpas jóvenes hay menos fibras colágenas y conforme envejece la pulpa se elabora más colágeno; tal incremento es principalmente de colágeno tipo III. Así mismo, las fibras colágenas de la pulpa joven son típicamente delgadas y tienen orientación irregular. En las pulpas de mayor edad se ven haces mayores de fibras, en particular en la porción central de la pulpa. El periodo de renovación de las fibras colágenas es más alto en la pulpa que en otros tejidos dentales (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Avery, J. 1971) (Ten, A. 1989).

2.4. Matriz extracelular en el tejido pulpar

La matriz extracelular está compuesta por glicoproteínas y glicosaminoglicanos, como el dermatán sulfato, el ácido hialurónico, y el

condroitin sulfato. Como en todo tejido conectivo, su función es mediar el metabolismo de las células del tejido pulpar, proporcionando el transporte de nutrientes desde el flujo sanguíneo a las células y a su vez eliminando los productos de desecho metabólicos de estas mismas células en la pulpa dental (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Avery, J. 1971) (Ten, A. 1989).

2.5. Vasos sanguíneos en la pulpa dental

La microcirculación del tejido pulpar es un componente estructural muy importante en este tejido, ya que juega un papel determinante en los procesos fisiológicos e inflamatorios de la pulpa. La circulación del tejido pulpar proviene de la arteria maxilar interna, cuyas ramificaciones penetran en el forámen apical y se esparcen a lo largo del tejido pulpar, siempre acompañados por haces de fibras nerviosas (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987).

Los principales vasos de la microcirculación son las *arteriolas*, las cuales tienen un diámetro de 50 μm y una capa muscular continua; las *metaarteriolas* o *precapilares* presentan un diámetro de 20 μm y una capa muscular discontinua; los *capilares* que tienen un diámetro de 8 μm y no presentan capa muscular sino solamente endotelio; y por último las *vénulas*, involucradas en la circulación de retorno con una capa muscular discontinua y con un diámetro de 20 μm (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Rapp, R., et al. 1977).

Las arteriolas se ubican en la porción central de la pulpa radicular, las metaarteriolas resultan de la división de las arteriolas, y su función es alimentar a los capilares con la sangre. Cuando las metaarteriolas o en algunos casos las arteriolas llegan a la pulpa coronaria, se ramifican en abanico hacia la porción dentaria, disminuyendo de tamaño y dando origen a una red capilar en la región subodontoblástica, las cuales tienen como

función el transporte de metabolitos y nutrientes desde la sangre hacia las células (Rapp, R., et al. 1977).

Los precapilares nacen de las metaarteriolas y se distinguen por la presencia de un esfínter precapilar el cual consta de células musculares lisas (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Kim, S. 1985) (Provenza, D., et al. 1958).

Se ha observado que estos esfínteres precapilares controlan el ciclo de la microcirculación pulpar abriéndose o cerrándose de acuerdo a las demandas metabólicas del tejido (Kim, S. 1985).

A nivel venular, estos vasos tienen la función de recolectar sustancias del metabolismo sanguíneo pulpar y además son una reserva del volumen sanguíneo, por medio del cual se mantiene el equilibrio de la microcirculación pulpar (Kim, S. 1985).

En el tejido pulpar se observan unas anastomosis arteriovenosas, las cuales conectan arteriolas con vénulas atravesando el sistema capilar. Su diámetro es aproximadamente de 10 a 15 μm , presentando una capa muscular suave que recubre la terminación arterial, la cual al relajarse permite el bombeo de sangre de la arteriola a la vénula sin pasar por los capilares. Estas anastomosis son importantes en el control del flujo sanguíneo de los tejidos especialmente en condiciones patológicas, y están ubicadas en el tercio apical del tejido pulpar (Kim, S. 1985).

2.6. Fibras nerviosas del tejido pulpar

Las fibras nerviosas que componen el tejido pulpar le dan la característica a la pulpa de ser un órgano sensorial, capaz de transmitir información desde sus receptores sensoriales hacia el sistema nervioso central. Por lo tanto, independiente de la naturaleza de los estímulos sensoriales, los cuales pueden ser una alteración térmica, deformación mecánica, lesión tisular, etc, todos los impulsos aferentes provenientes

desde la pulpa traen como consecuencia sensaciones de dolor y episodios inflamatorios (Anneroth, G. and Nordenberg, K. 1968).

Los nervios somatosensoriales del tejido pulpar se originan en el ganglio del trigémino llamado también ganglio de Gasser, de tal modo que los dientes superiores están inervados por el nervio maxilar superior, y los dientes inferiores por el nervio dentario inferior (Tonder, K., et.al. 1978) (Matthews., et al. 1980) (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999).

Estas fibras somatosensoriales penetran el tejido pulpar en fascículos a través del foramen apical, en una estrecha relación con arteriolas y vénulas (Anneroth, G. and Nordenberg, K. 1968) (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S., and Bender, I. 1987).

2.7. Inervación del tejido pulpar

La pulpa dental, como tejido conectivo, requiere de una inervación para cumplir sus principales funciones: Control vasomotor y defensa. Así mismo, es un órgano capaz de transmitir información desde sus receptores sensitivos hacia el sistema nervioso central (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987).

El sistema nervioso periférico se encuentra dividido en: Sistema nervioso somatosensorial, originado en el ganglio del trigémino, y Sistema nervioso autónomo, originado a partir del ganglio cervical superior, el cual a su vez se subdivide en sistema nervioso simpático y parasimpático, cuyas funciones son generar vasoconstricción (fibras simpáticas) y vasodilatación (fibras parasimpáticas).

Tanto las fibras del sistema nervioso autónomo, como las del somatosensorial, se encuentran asociados con vasos sanguíneos, y por tanto su función es la regulación del flujo sanguíneo, lo cual ha sido demostrado mediante estudios inmunohistoquímicos. Por lo tanto es posible afirmar que el tejido pulpar presenta inervación perivascular. (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989).

La inervación del tejido pulpar incluye neuronas aferentes, las cuales conducen los impulsos nerviosos, y fibras autónomas, las cuales proveen modulación nerviosa de la microcirculación, además de regular la dentinogénesis (Cohen, S., et al. 1994).

Los nervios simpáticos de la pulpa dental provienen del ganglio cervical superior, conociéndose dos vías simpáticas hacia la pulpa dental (Wakisaka, S. 1990).

La principal vía está compuesta por nervios simpáticos, los cuales abandonan el ganglio cervical superior, corren alrededor de la arteria carótida externa y posteriormente con la arteria maxilar interna para entrar finalmente a la pulpa en compañía de la arteria alveolar superior e inferior (Avery, J., et al. 1980) (Matthews., et al. 1980).

La otra vía comprende las fibras del nervio simpático que abandonan el ganglio cervical superior siguiendo su camino hacia el ganglio trigémino, para posteriormente penetrar a la pulpa dental en compañía de las fibras nerviosas sensoriales (Kim, S. 1990).

2.8. Neurofisiología del tejido pulpar

Las fibras nerviosas del tejido pulpar se clasifican generalmente de acuerdo a su función, diámetro, y velocidad de conducción (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S., and Bender, I. 1987).

En el tejido pulpar la descripción de las fibras sensoriales se ha realizado utilizando dos tipos de técnicas:

Una es haciendo un registro intradental, donde unos electrodos miden la actividad del nervio utilizando como modelo de estudio cavidades en dentina de dientes de perro (Cohen, S., et al. 1994) (Kim, S. 1990) (Olgart, L. 1974) (Bilotto, G., et al. 1987).

La otra técnica, es una actividad de registro de fibra sencilla, en la cual la actividad nerviosa del nervio dentario inferior se mide disecándolo tanto en

perros como en gatos (Cohen, S., et al. 1994) (Kim, S. 1990) (Matthews, B. 1977).

Según estos modelos de estudio se encontraron dos tipos de fibras nerviosas en la pulpa dental, las fibras tipo A-delta y las fibras tipo C.

Las fibras tipo A-delta, tienen una velocidad de conducción rápida (4 a 30 m/s), presentan mielina, están localizadas principalmente en la región donde se unen la pulpa y la dentina, sus características de transmisión de sensación de dolor son agudas y punzantes, y su umbral de estimulación es relativamente bajo (8,4 a 13,4 mA).

Las fibras tipo C, tiene una velocidad de conducción lenta (0,4 a 1,6 m/s), no presentan mielina, su distribución en la pulpa está ligada a los vasos sanguíneos en todo el lumen del tejido pulpar, sus características de transmisión de dolor son de incomodidad, presión e inflamación, y su umbral de dolor es relativamente alto (37,4 a 40,4 mA) (Cohen, S., and Burns, R. 1994)) (Olgart, L. 1974) (Bilotto, G., et al. 1974) (Matthews, B. 1977) (Norhi, M., et al. 1982).

Las fibras nerviosas tipo C en sus porciones terminales contienen neuropéptidos como el Neuropeptido Y (NPY), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), neurokinina A (NKA), péptido vasoactivo intestinal (VIP) y sustancia P (SP), los cuales, cuando se liberan intervienen intensamente en el fenómeno de inflamación neurogénica del tejido pulpar, controlando los cambios vasculares y las sensaciones de dolor cuando se presenta este evento como respuesta de la pulpa dental a estímulos externos (Kim, S. 1990) (Luthman, J., et al. 1992) (Olgart, L., et al. 1977) (Wakisaka, S. 1990) (Byers, M.R. and Narhi, M.V. 1999) (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999) (Heyeraas, K.J. and Berggreen, E. 1999).

Estos neuropéptidos del tejido pulpar se clasifican de acuerdo a su naturaleza sensorial simpática o parasimpática (Kim, S. 1990) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989).

2.9. Neuropeptidos sensoriales en la pulpa dental

En la pulpa dental hoy en día se conocen tres neuropeptidos sensoriales, cuyo origen es el ganglio trigémino: Sustancia P (SP), Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y Neurokinina A (NKA) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999).

La sustancia P fue el primer neuropeptido demostrado en la pulpa dental (Olgart, L., et al. 1977) (Rossell, S., et al. 1981) (Ohkubo, T., et al. 1993).

Este neuropeptido es sintetizado en los cuerpos celulares aferentes primarios de pequeño diámetro (fibras amielínicas), transportados por el flujo axonal central y periférico, el cual es liberado en la porción terminal de la fibra nerviosa por un estímulo (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Ohkubo, T., et al. 1993) (Rossell, S., et al. 1981).

Se ha reportado que la sustancia P interactúa con los vasos sanguíneos, causando vasodilatación y extravasación de plasma debido a que este neuropeptido está ubicado en las porciones terminales de las fibras nerviosas amielínicas tipo C, las cuales entran y se distribuyen en la pulpa en una estrecha relación con los vasos sanguíneos (Olgart, L., et al. 1977) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Byers, M.R. and Narhi, M.V. 1999).

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) es otro de los péptidos identificados en la pulpa dental, y se encuentra ubicado en las porciones terminales de las fibras nerviosas tipo C, estando en una estrecha relación con los vasos sanguíneos del tejido pulpar. Ambos provienen del ganglio trigémino, y mientras la sustancia P está relacionada con los procesos de inflamación y vasodilatación, el CGRP está relacionado únicamente con los procesos de vasodilatación (Wakisaka, S., et al. 1987) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S., et al. 1985) (Ohkubo, T., et al. 1993) (Gazelius, B., et al. 1987).

La neurokinina A (NKA), es el otro péptido identificado en el tejido pulpar, y este se distribuye de la misma manera que la sustancia P, siendo también un péptido que se origina en el ganglio trigémino (Wakisaka, S., et al. 1988) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999).

2.10. Neuropéptidos simpáticos de la pulpa dental

En los nervios simpáticos, las catecolaminas se han considerado un neurotransmisor, las cuales en el tejido pulpar se distribuyen en las fibras nerviosas que están alrededor de los vasos sanguíneos y en la capa odontoblástica.

El neuropéptido Y (NPY), cuya presencia ha sido demostrada en la pulpa dental, se distribuye de manera muy similar a la de las fibras nerviosas que contienen catecolaminas (Oddman., et al. 1983) (Edwall, B., et al. 1985).

El NPY es de origen simpático y proviene del ganglio cervical superior, y está relacionado con procesos de vasoconstricción (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Oddman., et al. 1983) (Olgart, L., et al. 1993) (Edwall, B., et al. 1985).

2.11. Neuropéptidos parasimpáticos en la pulpa dental

El péptido vasoactivo intestinal (VIP), es otro de los neuropéptidos cuya presencia está demostrada en los tejidos pulpares. El VIP se distribuyen las fibras nerviosas alrededor de los vasos sanguíneos, sin penetrar en la dentina. Este neuropéptido es de origen parasimpático, y está involucrado directamente en procesos de vasodilatación (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989).

Es importante el estudio de los neuropéptidos y el papel que juegan en la inflamación neurogénica del tejido pulpar, porque debido a su naturaleza somatosensorial y por ser vasodilatadores o vasoconstrictores, la

disminución de su presencia puede llevarnos al control de la inflamación y la necrosis del tejido pulpar (Heyeraas, K.J. and Berggreen, E. 1999).

2.12. Neurotransmisores

El concepto de “transmisor químico” se hizo familiar a partir de 1930, cuando Otto Loewi demostró la liberación de la acetil colina (Ach) en las terminales del nervio vago del corazón de rana, y del trabajo sobre la transmisión colinérgica y adrenérgica de Henry Dale.

Los términos colinérgico y adrenérgico se propusieron para indicar que una neurona utiliza acetil colina o noradrenalina como neurotransmisor.

A partir de ese momento se han descubierto muchas sustancias que actúan como transmisores, y el concepto se ha ido modificando continuamente para adecuarlo a la nueva información de la biología celular de las neuronas y de la farmacología de los receptores (Amara, S.G. 1993) (Kupfermann, I. 1991).

Se puede de manera muy general definir un transmisor como una sustancia que se libera por una neurona en la sinapsis y que afecta de manera específica a otra célula, ya sea una neurona o un órgano efector.

De manera general, se acepta como un neurotransmisor, a un pequeño número de sustancias, de bajo peso molecular, que cumplan con los siguientes 4 criterios:

1. Que se sintetice en la neurona
2. Que esté presente en un terminal presináptico y que se libere en cantidades suficientes, y ejerciendo un efecto definido sobre la neurona postsináptica u órgano efector.
3. Cuando se administre exógenamente un fármaco en concentraciones razonables, mimetice perfectamente los efectos del transmisor liberado endogenamente; o sea que

active los mismos canales iónicos, o ruta del segundo mensajero en la celda postsináptica.

4. La existencia de un mecanismo específico para eliminarla del lugar donde actúe.

El sistema nervioso utiliza dos principales tipos de sustancias químicas para la comunicación:

1. Los transmisores de pequeño tamaño molecular.
2. Los péptidos neuroactivos de cadena corta de aminoácidos.

Se aceptan de manera general como neurotransmisores a 9 sustancias de bajo peso molecular. Ocho (8) son aminas, de las cuales siete (7) son aminoácidos o sus derivados. El otro que no es amina, es el ATP o sus productos de degradación.

Estos compuestos que son considerados neurotransmisores son:

Acetil colina

Aminas: Dopamina
Noradrenalina
Adrenalina
Serotonina
Histamina

Aminoácidos: Ácido gama amino butírico
Glicina
Glutamato

Todas se forman en rutas biosintéticas relativamente cortas, y se sintetizan a partir de precursores derivados de sustratos de carbohidratos principales del metabolismo intermediario; y al igual que en otras rutas, la

síntesis de los neurotransmisores se catalizan por enzimas que, casi sin excepción son citosólicas.

En las rutas biosintéticas de los transmisores tipo amina, como en otras rutas, la síntesis global del transmisor se regula por una reacción enzimática, y es característico que el control de la enzima se realice por un tipo de neurona, y habitualmente que no se haga en otros tipos neuronales.

2.12.1. Neuropéptidos de cadena corta

Con contadas excepciones, las enzimas que catalizan la síntesis de neurotransmisores de bajo peso molecular, se encuentran en el citosol. Estas enzimas se sintetizan en los polisomas libres del soma neuronal, y se distribuyen a lo largo de toda la neurona, mediante transporte axoplásmico lento (Kandel, R., Jessel, T. and Schwartz, J. 2000).

Debido a la dispersión neuronal de estas enzimas biosintéticas, los transmisores de pequeño tamaño molecular pueden formarse en cualquier parte de la neurona; lo mas importante, es que estos transmisores pueden sintetizarse en los terminales nerviosos donde se liberan.

Por el contrario, los péptidos neuroactivos se originan de proteínas secretadas, que se han formado en el soma celular. Como en otras proteínas, estos péptidos o sus precursores, primero se procesan en el retículo endoplasmático y luego se desplazan al aparato de Golgi para su procesamiento adicional. Luego abandonan el aparato de Golgi en gránulos secretores y se dirigen a los terminales, mediante un transporte axonal rápido.

Son mas de 50 pequeños péptidos farmacologicamente activos los que se han descubierto en las terminaciones de las células nerviosas.

Estos péptidos se clasifican según su localización tisular en:

HORMONAS LIBERADORAS HIPOTALÁMICAS

Hormona liberadora de la tirotrópina

Hormona liberadora de la gonadotropina

Somatostatina
 Hormona liberadora de la corticotropina
 Hormona liberadora de la hormona de crecimiento

HORMONAS NEUROHIPOFISIARIAS

Vasopresina
 Oxitocina

PEPTIDOS HIPOFISIARIOS

Hormona adrenocorticotrópica
 Beta endorfina
 Hormona estimuladora del melanocito alfa
 Prolactina
 Hormona luteinizante
 Hormona de crecimiento
 Tirotropina

PEPTIDOS GASTROINTESTINALES

Péptido Vasoactivo Intestinal
 Colecistoquinina
 Gastrina
 Sustancia P
 Neurotensina
 Metionina-Encefalina
 Leucina-Encefalina
 Insulina
 Glucagón
 Bombesina
 Secretina
 Somatostatina
 Hormona liberadora de la tirotropina
 Motilina

OTROS

Angiotensina II
 Bradiquinina
 Calcitonina
 Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
 Neuropeptido Y
 Galanina
 Neurokinina A

(Kandel, R., Jessel, T., and Schwartz, J. 2000)

La forma como se relacionan estructuralmente determinados péptidos entre si, es comparar cada una de las secuencias de aminoácidos actuales de los péptidos o las secuencias de los nucleótidos en los genes que los codifican.

La evolución divergente y convergente de los genes explica como se relacionan estructuralmente algunos neuropeptidos. En la evolución divergente, el RNAm es el molde de varias copias del mismo péptido, se

transcribe a partir del DNA genómico, que podría evolucionar mediante varias duplicaciones de un DNA ancestral mas simple. La reduplicación seguida por la divergencia, puede conducir a la producción de grupos de péptidos relacionados estructuralmente, pero divergentes.

En la evolución convergente, secuencias nucleotídicas independientes, con la posibilidad de codificar péptidos activos parecidos fisiológicamente, podrían haberse localizado inicialmente en distintos lugares de un cromosoma ancestral, y que durante la evolución, estas secuencias podrían haberse combinado y organizado de un modo semejante en todos los genes que codifiquen los precursores de la proteína de una determinada familia (Lee, J. 1991).

En la mayoría de las ocasiones varios neuropéptidos distintos están codificados por un solo RNAm continuo, que se traduce en una gran proteína precursora, o una poliproteína. La producción a partir de un gran precursor puede servir como mecanismo de amplificación, ya que puede producirse mas de una copia del mismo péptido desde una poliproteína.

La evolución de los precursores de neuropéptidos se da en el sistema de la principal membrana de la neurona y en las vesículas. Varios péptidos se producen de una misma poliproteína por fragmentaciones limitadas y concretas, catalizadas por proteasas específicas. Estas enzimas se denominan proteasas de serina, porque todas tienen un residuo de serina en el centro catalítico cuyo grupo hidroxilo participa en la reacción de fragmentación.

Se sugieren dos posibles mecanismos por los cuales ocurre el procesamiento bioquímico por medio de estas proteasas. El que dos neuronas procesen la misma poliproteína de manera diferente, es porque cada célula puede tener las mismas proteasas de procesamiento, aunque cada célula pueda glicosilar a la poliproteína común en diferentes lugares; por tanto, se protegen diferentes regiones del polipéptido de la fragmentación (Steiner, D.F., et al. 1992).

2.12.2. Coliberación de los neuropéptidos con los transmisores de bajo peso molecular

Los neuropéptidos, los transmisores de pequeño peso molecular y otras moléculas neuroactivas pueden coexistir en la misma neurona. En las neuronas adultas la combinación habitual es de un transmisor de pequeño tamaño molecular y uno o más péptidos derivados de alguna poliproteína. Por ejemplo, la acetil colina y el péptido vasoactivo intestinal (VIP), pueden liberarse juntos por una neurona presináptica y actuar sinérgicamente en diferentes receptores de las mismas células blanco.

Otro ejemplo es el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), que se localiza en algunas motoneuronas de la médula espinal junto con la acetil colina. El CGRP activa la adenil-ciclase, aumentando el AMP cíclico y la fosforilación de las proteínas dependientes de AMP cíclico en los músculos. El aumento de la fosforilación proteica conduce a un incremento de la fuerza contráctil. Por eso, se liberan a la vez en la unión neuromuscular, un transmisor de bajo peso molecular (acetil colina) y un neuropéptido (CGRP), por la misma neurona presináptica (Kupfermann, I. 1991).

Las neuronas que contienen péptidos, los procesan a partir de una sola poliproteína, pudiendo liberar varios neuropéptidos con diferentes acciones post-sinápticas potenciales.

Las vesículas que liberan péptidos se diferencian de las que liberan transmisores de bajo peso molecular, en que las primeras son mayores y no necesitan especialización de la membrana presináptica para liberarlas mediante exocitosis. Estas vesículas que contienen péptidos también pueden o no tener conjuntamente transmisores de bajopeso molecular, pero todas las vesículas tienen ATP, liberándose este con ambos tipos de mensajeros químicos (Barinaga, M. 1993).

La liberación de ATP (que después de liberarse puede degradarse a adenosina) es un buen ejemplo de que coexistencia y coliberación no

significan necesariamente cotransmisión, puesto que el ATP, como otras sustancias, pueden liberarse de las neuronas, aunque no tengan utilidad, debido a la ausencia de receptores específicos en la cercanía del sitio de liberación. Por otra parte, algunas neuronas postsinápticas tienen receptores tanto para el ATP como para la adenosina, o para el uno y no para el otro, en algunos de estos casos podemos entonces hablar de cotransmisión.

2.12.3. Eliminación del transmisor de la hendidura sináptica

La eliminación de los transmisores de la hendidura sináptica es crítica en el proceso de transmisión, ya que la persistencia de dicho transmisor en la hendidura, seguida de la liberación, podría impedir nuevas comunicaciones, haciendo que la sinápsis acabara siendo refractaria, principalmente debido a la desensibilización del receptor por la exposición continuada del transmisor.

Hay 3 mecanismos por los cuales el tejido nervioso es capaz de inducir o disponer de sustancias que desacoplen el transmisor: La difusión, la degradación enzimática y la recaptación del transmisor.

La difusión suprime alguna fracción de todos los mensajeros químicos, como mecanismo de eliminación de las moléculas transmisoras de la hendidura sináptica.

La degradación enzimática de la sustancia transmisora se utiliza primariamente por el sistema colinérgico, donde la enzima extracelular implicada es la acetil-colinesterasa.

Las zonas activas del terminal nervioso presináptico de la unión neuromuscular, se localizan justamente en la parte superior de los pliegues de unión de la membrana muscular, donde se sitúan los receptores colinérgicos. Los receptores están concentrados en la superficie muscular y no se interiorizan en la profundidad de los pliegues mientras que la esterasa se fija a la membrana basal exclusivamente en el interior de los pliegues.

Esta localización anatómica de las moléculas tiene dos funciones. Una vez que se ha disociado una cantidad del transmisor (acetil colina) del

receptor, este se dirige entre los pliegues de unión y se hidroliza en colina y acetato, así las esterases interrumpen el mensaje sináptico. La segunda función es permitir que uno de los productos de hidrólisis, la colina, se recapte al interior del terminal nervioso colinérgico (Amara, S.G. 1993).

2.13 Neuropéptidos en el tejido pulpar humano

2.13.1 Sustancia P (SP)

Es un péptido compuesto por una cadena de 11 aminoácidos (Chang, M., Leeman, S. and Niall, H. 1971).

Fue identificado en 1931 mediante el análisis bioquímico y farmacológico de extractos de cerebro e intestino de equino, donde se observó que había un factor hipotensivo y espasmogénico que difería de la acetil colina y su efecto no era bloqueado por la atropina (Pernow, B. 1983) (Bradford, H. 1988).

Al principio se creyó que este compuesto no era mas que una proteína y por esta razón se denominó con la letra P. Posteriormente se pudo establecer que esta sustancia está altamente relacionada no solo con los procesos de inflamación tisular, sino también con los síntomas de dolor, por esto se le denominó como sustancia P, haciendo alusión a la palabra dolor en inglés "pain" (Pernow, B. 1983).

La biosíntesis de la sustancia P se lleva a cabo en el soma de la neurona, donde hay un gen que es transcrito en una pre-proteína precursora precursora del neuropéptido sustancia P (Pernow, B. 1983).

Esta preproteína es procesada en el aparato de Golgi de la neurona, donde hay ciertas enzimas proteolíticas que la hidrolizan produciendo el polipéptido de 11 aminoácidos, que corresponde a la estructura definitiva de la sustancia P (Pernow, B. 1983).

Una vez el neuropéptido se ha producido en el interior del soma de la célula, es transportado a través de las fibras de tubulina del axón de la neurona (transporte axónico) a la sinapsis de la terminación nerviosa, donde es almacenado o liberado por exocitosis, para ejercer sus funciones uniéndose a receptores de alta afinidad en ciertas células involucradas en inflamación, o para ser activado y degradado por endopeptidasas (Pernow, B. 1983)

Se ha comprobado que cerca del 50% del total de la sustancia P en nervios periféricos está presente en fracciones granulares y en homogenizados de cerebro. Además una considerable porción de SP se encuentra en fracciones microsomales (Pernow, B. 1983).

La localización sinaptosomal de la SP se ha establecido por medio de pruebas como el Radioreceptoanálisis (RRA) y la inmunohistoquímica, con la utilización de marcadores de alta afinidad. Esto permitió saber que la SP en el cerebro se encuentra localizada en el hipotálamo, la parte media y baja del cerebro y en el cerebelo. A nivel de sistema nervioso periférico, se pudo precisar que la sustancia P se ubica en las ramificaciones de las terminales nerviosas de las fibras amielínicas tipo C (Pernow, B. 1983).

El medio de unión de la sustancia P en las vesículas sinápticas es a través de fosfolípidos, siendo de especial interés la unión de fosfatidil-serina y SP, la cual permite que el neuropéptido se pegue a las fracciones de la membrana sináptica (Pernow, B. 1983).

Con el descubrimiento de neuropéptidos involucrados en inflamación pulpar como la sustancia P, se encontró una estrecha relación entre el sistema vascular y el sistema nervioso en este tejido, por lo tanto se dio origen al término “inflamación neurogénica” el cual describe cambios patológicos en la relación neurovascular como producto de la inflamación (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Wakisaka, S., et al. 1984).

Cuando un diente recibe un estímulo nocivo sobre su corona o superficie radicular ya sea de tipo mecánico, térmico o químico, produce la excitación de las fibras tipo C, las cuales liberan sustancia P, por lo tanto este neuropéptido interviene activamente en los procesos de inflamación neurogénica en el tejido pulpar (Olgart, L., et al. 1989).

Las fibras amielínicas tipo C, están relacionadas con los vasos sanguíneos del tejido pulpar, con un patrón de distribución típico para una fibra vasomotora de naturaleza sensorial (Pernow, B. 1983).

El mecanismo por medio del cual se libera SP de las terminaciones nerviosas de las fibras amielínicas tipo C, depende de la naturaleza del estímulo y del grado de estimulación neural que se produzca (Markowitz, K., et al. 1988) .

Existen 2 tipos de estímulos que pueden tener efecto sobre las terminaciones nerviosas de las fibras tipo C y generar la liberación de la sustancia P: La estimulación ortodrómica y la estimulación antidrómica (Markowitz, K., et al. 1988) (Olgart, L., et al. 1989)

La estimulación ortodrómica leve de la superficie dentinal, donde solamente se excitan las fibras A-delta, no causa cambios en el flujo sanguíneo pulpar, lo cual sugiere que la estimulación de estas fibras no tiene un efecto significativo en el flujo sanguíneo pulpar. Por otra parte, la estimulación ortodrómica fuerte en la superficie dentinal, causa cambios significativos en el flujo sanguíneo pulpar, debido a la excitación de las fibras tipo C.

Cuando las fibras C son excitadas en las porciones terminales, se produce la despolarización de la membrana celular de las neuronas ubicadas en este sitio, llevando a la entrada masiva de iones Ca^{+2} y la posterior liberación de la sustancia P, la cual participa activamente en los procesos de inflamación del tejido pulpar (Kim, S. 1990) .

La estimulación antidrómica, la cual está relacionada con los procesos de vasodilatación de la pulpa dental, es el otro tipo de estímulo que puede

generar liberación de sustancia P por parte de las terminaciones nerviosas de las fibras tipo C (Kim, S. 1990) (Kim, S., et al. 1988).

La sustancia P liberada por una estimulación antidrómica o por un estímulo nocivo fuerte, es un evento conocido como la vasodilatación mas potente del cuerpo humano que conduce a aumentar el flujo sanguíneo del tejido pulpar, aumentando la permeabilidad vascular y la exudación plasmática (Chang, M., Leeman, S. and Niall, H. 1971).

Estudios *in vitro* han demostrado que la SP conduce a la liberación de histamina en los mastocitos, además de estimular la quimiotaxis de estas células en los sitios donde se presente la inflamación neurogénica (Payan, D. 1989).

Este efecto de liberación de histamina de los mastocitos desencadenado por la SP, es independiente de la acción que puede producir la inmunoglobulina E (IgE), la cual requiere de calcio extracelular para la liberación de este mediador de la inflamación, en cambio la sustancia P causa la liberación directa sin necesidad de calcio extracelular (Payan, D. 1989) (Foreman, J. and Jordan, C. 1983) (Baxter, J. and Adamik, R. 1978).

La histamina liberada en los tejidos genera la vasodilatación de los vasos sanguíneos y la extravasación plasmática, lo cual juega un papel determinante en el proceso de inflamación neurogénica (Payan, D. 1989).

Esto difiere de otros péptidos de carácter básico, los cuales no presentan ningún tipo de actividad específica sobre los mastocitos a diferencia de la sustancia P, la cual puede inclusive generar la liberación de mediadores de la inflamación no almacenados, como los leucotrienos (Payan, D. 1984) (Foreman, J. and Jordan, C. 1983) (Baxter, J. and Adamik, R. 1978).

Así, un mecanismo hipotético de necrosis pulpar como resultado de estimulación nociva, ya sea mecánica , térmica o química, causada por la preparación de un diente, puede ser, que una vez sea irritado el tejido pulpar, se liberan neuropéptidos, donde la sustancia P (SP) es el mas importante de

estos mediadores del proceso inflamatorio. Estos mediadores alteran las funciones neurales y vasculares, dando como resultado un aumento de la presión tisular (Kim, S. 1990).

Este aumento de la presión tisular en un complejo de baja adaptabilidad, como es el caso específico del tejido pulpar, conlleva a una disminución del flujo sanguíneo pulpar en lugar de un aumento de este, como normalmente sucede en el resto de los tejidos conectivos (Cohen, S., et al. 1994) (Seltzer, S. and Bender, I. 1987) (Kim, S. 1990).

El aumento del flujo sanguíneo facilita la remoción de mediadores de la inflamación y con ello se ayuda a reparar el tejido, pero en el tejido pulpar no ocurre esto, sino por el contrario, el flujo sanguíneo disminuye, lo que produce acumulación de los mediadores de la inflamación, los cuales causan graves daños sobre el tejido, traduciéndose en necrosis pulpar o muerte de este tejido (Kim, S. 1990).

Una vez liberada la sustancia P es inactivada por enzimas en los diferentes tejidos, lo cual se ha corroborado por la exposición de este neuropéptido en tejidos homogenizados, donde se ha observado que es rápidamente degradado; en cambio cuando es almacenada en tejidos intactos, los niveles de SP endógenos se mantienen estables durante varias horas *post mortem* (Gazelius, J. 1981) (Pernow, B. 1983) (Geoffrey, A. and Araujo, O. 1993).

Esto condujo a estudios que demostraron que cuando la SP se libera en las terminaciones nerviosas de las fibras tipo C, su vida media está entre 12 y 15 minutos, para luego tener una rápida inactivación por degradación en el tejido por parte de las endopeptidasas (Gazelius, J. 1981) (Pernow, B. 1983).

Además se pudo comprobar que cuando se realizan estimulaciones antidrómicas del nervio dentario inferior en gatos, al cuantificar los niveles de sustancia P en las pulpas dentales por medio de radioinmunoanálisis, se han encontrado niveles 40% mas bajos de sustancia P que en las pulpas donde

no se había realizado la estimulación, lo que indica que cuando el neuropéptido no es liberado de las terminaciones nerviosas, es protegido de la degradación enzimática (Gazelius, J. 1981).

En este proceso están implicados los enlaces Gln⁶-Phe⁷, Phe⁷-Phe⁸ y Gly⁹-Leu¹⁰, los cuales son hidrolizados por metaloendopeptidasas neutras, identificadas en las hendiduras sinápticas, que pueden ser inhibidas mediante la utilización de compuestos como el ácido etilendiaminotetracético (EDTA), la tripsina y el captopril (Gazelius, J. 1981) (Pernow, B. 1983) (Couture, R. and Regoli, D. 1981).

2.13.2. Péptido intestinal vasoactivo (VIP)

El péptido intestinal vasoactivo, es un péptido de 28 aminoácidos que pertenece a la superfamilia de las hormonas peptídicas estructuralmente relacionadas, que incluyen glucagón, secretina y factor de crecimiento hormonal.

Fue originalmente aislado del intestino de porcino, y le fueron atribuídas funciones como vasodilatador en la arteria femoral canina. Posteriormente, se ha demostrado que tiene otras funciones como hormona neuroendocrina y neurotransmisor.

Estudios posteriores demostraron que el VIP estimula la reabsorción ósea por la vía de la prostaglandina E2.

La presencia de este neuropéptido en el cerebro indica que este podría jugar un papel importante en el funcionamiento del sistema nervioso central.

Además el péptido intestinal vasoactivo estimula la secreción de prolactina desde la glándula pituitaria y la liberación de catecolaminas desde la médula adrenal.

A nivel del sistema inmune, inhibe la proliferación mitógena de células T, ya que inhibe la producción de interleukina 2.

Posteriormente se demuestra que este neuropéptido regula el metabolismo del glicógeno en la corteza cerebral. Otras acciones del VIP, incluyen la estimulación de la secreción de electrolitos y relajación del músculo liso (Luthman, J. et al. 1992).

Diferentes investigaciones realizadas en embriones de ratón, sugieren que el VIP es un promotor del crecimiento celular, ya que incrementa el número de células en la fase S de la división mitótica en el neuroepitelio primitivo y aumenta el total de DNA del embrión.

También se ha encontrado que el VIP es un potente regulador del crecimiento de células tumorales, ya que es secretado por terminaciones nerviosas y algunas células neoplásicas, y además puede ejercer estimulación sobre estas células en neuroblastomas, cáncer de colon, pulmón y seno.

Por otra parte, el péptido intestinal vasoactivo ha sido encontrado en terminaciones nerviosas del pulmón, actuando como un potente broncodilatador, y en terminaciones nerviosas del tracto urogenital tanto de hombres como de mujeres, en ovarios, y en testículos, sugiriendo alguna función como mediador de la función sexual

Además, diversos investigadores han realizado estudios demostrando la presencia del VIP en fibras nerviosas pulpaes de gatos y perros (Wakisaka., S. et al. 1987) (Luthman, J. et al. 1992).

Posteriormente se demostró que el VIP es expresado en fibras nerviosas pulpaes durante la regeneración del tejido alveolar inferior luego de axotomía. (Norevall, I. 1998) (Frtistad, et al. 1998)

La expresión del péptido intestinal vasoactivo en algunas neuronas del ganglio trigeminal, indica su origen a este nivel (Wakisaka, S. 1990).

Además este péptido ha sido encontrado en neuronas parasimpáticas, sugiriendo que al menos algunas de las fibras nerviosas pulpaes que expresan este neuropéptido tienen ese origen (Norevall, I. 1998).

A nivel pulpar se han aislado diferentes neuropéptidos, el péptido intestinal vasoactivo (VIP) es uno de ellos, que junto a la sustancia P (SP), neuropéptido Y (NPY), neurokinina A (NKA) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), juega un papel importante en los procesos de inflamación de este tejido (Wakisaka, S. 1990).

El VIP tiene receptores que pueden unirse a la proteína G estimuladora, lo cual induce la formación de AMPc (adenosin monofosfato cíclico), estimulando la formación de fosfato de inositol y diacilglicerol. El VIP también estimula la producción prostaglandina E2 en células parecidas a odontoblastos. Sus efectos en el hueso parecen estar mediados por la vía de los segundos mensajeros del AMPc, lo cual estimula osteólisis, sugiriendo un modo de acción indirecta sobre los osteoclastos. Sin embargo, algunos estudios preliminares sugieren un efecto inhibitorio del VIP sobre la reabsorción ósea (Kontinen, Y. 1996).

La síntesis del péptido intestinal vasoactivo es similar a la de los otros neuropéptidos, y bien diferente de la síntesis de los transmisores de bajo peso molecular. El VIP no se forma en el citosol de las terminales presinápticas, sino que es sintetizado por los ribosomas del soma neuronal y forma parte de las grandes proteínas. Luego, estas moléculas entran en el retículo endoplasmático donde se ensamblan para pasar al aparato de Golgi, donde se producen 2 cambios:

Uno de ellos implica una hidrólisis enzimática de la proteína, para que se forme el neuropéptido.

Después el aparato de Golgi lo introduce en las vesículas de transmisión que están diseminadas en el citosol de la neurona presináptica. Estas vesículas luego son transportadas por corriente axonal y liberan el transmisor para responder a los potenciales de acción dependientes de calcio. La cantidad de VIP que se libera en la hendidura presináptica, está directamente relacionada con la cantidad de iones calcio que penetran en la terminal presináptica.

Este péptido se localiza específicamente en grupos separados de neuronas y se libera en vías nerviosas determinadas. Estas vías conducen información a lo largo de series complejas de neuronas unidas por sinápsis.

Se ha determinado que las células del ganglio trigémino liberan cantidades de VIP *in vitro*, las cuales aumentan por una alta concentración de potasio en el medio. La administración intracerebroventricular de VIP estimula el flujo sináptico *in vivo*, aumentando los niveles de noradrenalina circulante, produciendo taquicardia y aumento de la presión sanguínea; razones por las cuales se ha clasificado al péptido vasoactivo intestinal como un neuropéptido.

2.13.3. Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

El CGRP es un neuropéptido que participa en la transmisión del sistema nervioso central y periférico. Se origina en el ganglio trigémino y tiene una estructura constituida por 7 aminoácidos, péptido que resulta del procesamiento a nivel nuclear del RNA por splicing alternativo primario del gen de la calcitonina (Uddman, 1999) (Brain, S.D. 1985).

Su síntesis es diferente a la síntesis de los transmisores de bajo peso molecular, y no se lleva en el citosol de las terminales presinápticas, sino que es sintetizado en el ribosoma del soma neuronal y forma parte de una familia de grandes moléculas de tipo proteico.

El procesamiento intracelular del CGRP ocurre de la misma forma que el de los otros neuropéptidos. Básicamente son cambios en la estructura del péptido por hidrólisis de endonucleasas específicas dentro del aparato de Golgi, con la posterior formación de las vesículas presinápticas, donde se almacenarán las moléculas del CGRP, hasta que sean trasladadas por corriente axonal hasta la membrana y sean liberadas por potenciales de acción dependientes de calcio (Guyton. 1992).

La mayor parte del péptido relacionado con el gen de la calcitonina CGRP, no está distribuido por todo el sistema nervioso, sino que se localiza

específicamente en grupos separados de neuronas y se libera en vías nerviosas determinadas. Las vías nerviosas conducen información a lo largo de series complejas de neuronas unidas por sinápsis (Wakisaka, S. 1990).

El CGRP circula en el plasma humano y es liberado por axones nerviosos perivasculares. Es un potente agente vasodilatador, por lo que tiene potentes efectos sobre el corazón. Así mismo modula algunas funciones de los macrófagos, incluyendo la presentación antigénica *in vitro*, lo cual indica que tiene efectos durante el proceso inflamatorio (Patton, K. 1998).

También se ha observado que se encuentra en la superficie de las células de Langerhans e inhibe la presentación antigénica de estas células. Estos hallazgos indican que el CGRP puede tener efectos inmunomoduladores *in vivo*, y sugiere una interacción entre el sistema nervioso y la función inmune, particularmente durante el proceso inflamatorio (Hosoi, G.F. 1993).

Al igual que otros neuropéptidos, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), también está involucrado en la liberación de histamina, la cual incrementa la permeabilidad vascular (Brain, S.D. 1985).

En las fibras nerviosas del tejido pulpar humano, hay un rico contenido de péptidos, de los cuales, los más abundantes son la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). El CGRP se localiza en las fibras aferentes primarias, y se han encontrado altas concentraciones de este neuropéptido en pulpa.

Las reacciones nerviosas sensoriales a las lesiones dentales incluyen la ramificación de las fibras sensoriales y una inmunoreactividad aumentada para neuropéptidos como la SP y el CGRP (Uddman, R. 1999).

Una vez estas fibras se estimulan, se libera el CGRP, el cual juega un papel muy importante en el proceso inflamatorio, ya que interactúa con los mastocitos produciendo liberación de histamina, la cual causa una elevación

en la presión pulpar del tejido y un aumento de la permeabilidad vascular (Trantor, I.R. 1995) (Wakisaka, S. 1990).

Además de esto, el CGRP interactúa con otras células del proceso inflamatorio, como los macrófagos, alterando su función, induciendo a la célula a liberar o suprimir mediadores de la inflamación como las citoquinas, prostaglandinas y tromboxanos. Así mismo, el CGRP actúa con células del sistema inmune regulando y manteniendo su homeostasis, lo cual sugiere que el sistema nervioso puede actuar como un regulador del sistema inmune (Trantor, I.R. 1995) (Byers, M. 1990).

Todos estos mediadores de la inflamación, junto con el aumento de los niveles de CGRP, tienen efectos directos sobre el tejido pulpar, alterando las funciones neurales y vasculares, lo que resulta en un aumento de la presión tisular (Trantor, I.R. 1995) (Byers, M. 1990).

En el tejido pulpar humano, el CGRP tiene una potente acción vasodilatadora y puede incrementar la permeabilidad vascular. También hay evidencias del papel del CGRP en la regulación de la microcirculación pulpar, estudios realizados principalmente en modelos animales (Olgart, L. 1994).

Estudios que han evaluado los diferentes tipos de lesiones mecánicas y microbianas en cuanto a inmunoseñalización de las fibras periféricas de CGRP en pulpa dental, sugieren que una cavidad dentinal cervical, siendo esta una lesión leve a la pulpa dental, produce un aumento del CGRP en las fibras nerviosas después de 4 días. Otro resultado, con una lesión un poco más agresiva es cuando se realiza la preparación de una cavidad removiendo el barrillo dentinal, en la cual hay una producción de microabscesos y aumento de los niveles de CGRP cerca del área lesionada, como reacción local a la misma (Uddman, R. 1999) (Byers., et al. 1988).

2.13.4. Neurokinina A (NKA)

En 1949 Rocha y Silva y colaboradores, reportaron la existencia de una sustancia liberada en el plasma por acción del veneno de una serpiente clasificada como *Bothrops jararaca* , sustancia que fue llamada Bradikinina BK (Rocha e Silva., et al. 1949). Tanto la Bradikinina como otros péptidos relacionados han sido implicados en múltiples procesos fisiológicos como el control de la presión sanguínea, contracción y relajación muscular, respuesta inflamatoria e inducción de la nocicepción y la hiperalgia.

A parte de esto, esta familia de péptidos llamadas las Kininas, está implicada en muchos estados patológicos como el asma, alergia, artritis reumatoidea y pancreatitis (Regoli, D and Barabé, J. 1980) (Bhoola, K.D., et al. 1992) (Hall, J.M and Morton, I.K.M. 1997). Esta familia de las kininas se subdivide en un grupo de péptidos abundantes en el sistema nerviosos llamados las neurokininas.

La sustancia P fue el primer miembro de la familia de las neurokininas completamente purificado y caracterizado (Chang, M., et al. 1971), y pocos años después fueron identificados algunos péptidos relacionados, entre ellos la neurokinina A NKA, que es el mas importante de los neuropéptidos de esta familia (Guard, S. And Watson, S. 1991) (Helke, C., et al. 1990)

Las kininas están formadas a partir de unas proteínas, los kininógenos de alto y bajo peso molecular, por acción de proteasas de serina presentes en el plasma y en tejidos periféricos. Estos péptidos son rápidamente degradados por un grupo de enzimas llamadas Kininasas (Bhoola, K.D., et al. 1992).

La mayoría de los efectos de las kininas estan mediados por la activación de al menos 2 distintos tipos de receptores llamados B₁ y B₂, los cuales han sido invetigados en muchas especies de mamíferos, encontrándose entre ellos homologías estructurales del 36% (Pesquero, J.B., and Bader, M. 1998). Los receptores B₂ son los mejor caracterizados de las kininas, y estos son expresados tanto en el sistema nervioso central como en

el sistema nervioso periférico, mediando la mayoría de los efectos fisiológicos de las kininas (Hall, J.M and Morton, I.K.M. 1997).

Para las neurokininas, han sido identificados 3 tipos de receptores con similar potencia: NK₁, NK₂ y NK₃ (Maggi, C.A. and Schwartz, T.W. 1997).

El receptor NK₁ presenta mayor especificidad para la sustancia P SP, el receptor NK₂ para Neurokinina A NKA y el receptor NK₃ para Neurokinina B NKB (Nakanishi, S. 1991).

Estudios bioquímicos y moleculares han mostrado que tanto los receptores B₁ y B₂, como los receptores NK₁, NK₂ y NK₃, pertenecen a la familia de los receptores acoplados a las proteínas G transmembranales.

La distribución de los receptores de Neurokinina A es amplia en el sistema nervioso central. Diversos estudios muestran que los receptores NK₁ para sustancia P predominan en motoneuronas (Charlton, C.G., and Helke, J. 1985) (Manaker, S., and Zucchi, P.C. 1998), y los receptores NK₂ para Neurokinina A están preferencialmente localizados en el sistema nervioso periférico, con bajos niveles en el sistema nervioso central (Ding, Y.Q. 1996)

La acción de las kininas está asociada con la producción de otros mediadores como los prostanoideos,taquikininas, citoquinas y otros productos celulares, lo cual demuestra la importancia de las kininas en el desarrollo de los procesos nociceptivos en inflamatorios (Marceau, F., Hess, J.F., and Bachvarov, D.R. 1998) (Marceau, F., and Bachvarov, D.R. 1998)

Los procesos inflamatorios del tejido pulpar, son mediados por la activación de los receptores NK₁, NK₂ , los cuales se activan principalmente por la sustancia P y la neurokinina A (NKA), ya que estos neuropéptidos están contenidos en las fibras tipo C amielínicas, por lo que desencadenan todos sus efectos en tejidos periféricos, incluida la pulpa dental. Su excitación produce la liberación de los neuropéptidos, produciendo la respuesta inflamatoria, razón por la cual este proceso se conoce como inflamación neurogénica (Gyorfi, A., et al. 1993).

El desarrollo de la inflamación es un proceso que incluye vasodilatación arteriolar (NK1), incremento de la permeabilidad vascular, extravasación del plasma en vénulas post-capilares (NK1), y migración celular, adhesión leucocitaria al endotelio de venulas post-capilares (NK1) y activación de las células inflamatorias (NK1), para culminar en dolor e hiperlagesia (Hall, J.M and Morton, I.K.M. 1997). Estos fenómenos ocurren debido a que las fibras tipo C que contienen la neurokinina A, se encuentran entorchadas alrededor de los vasos sanguíneos que irrigan el tejido pulpar. Esto mismo ocurre en las mismas fibras con la sustancia P y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina CGRP, los cuales están también implicados en la inflamación neurogénica de la pulpa (Geppeti, P. 1993).

Otros efectos fisiológicos de la neurokinina A NKA son contracción (NK2) o relajación (NK1) de los músculos traqueobronquiales, con la correspondiente respuesta inflamatoria (Maggi, C.A., et al. 1995).

2.13.5. Neuropéptido Y (NPY)

El neuropéptido Y (NPY) es un neuropéptido de 36 aminoácidos, y es un péptido de la familia de los polipéptidos pancreáticos que ha sido renombrado por poseer una gran diversidad de actividades biológicas.

Originalmente fue aislado de tejido cerebral de mamíferos, y está descrito como uno de los neuropéptidos más abundantes en el sistema nervioso central y periférico de estos (Wettstein, J.C., et al. 1995).

Dentro de las múltiples actividades biológicas del neuropéptido Y se destacan la regulación de las funciones cardiovasculares en general, y la participación en la hipertensión arterial, controlando la presión sanguínea (Michel, M.C. and Rascher, W. 1995) (Di Bona., and Gerald, I. 2002) (Cerdeira-Reverter, J.M and Larhammar, D. 2000) (Zukowska-Grojec, Z. 1995).

El NPY también tiene la capacidad in vivo e in vitro de revascularizar tejidos isquémicos, lo cual lo involucra como una nueva generación de

compuestos angiogénicos con una promisoriosa aplicación clínica (Grant, D.S. and Zukowska, Z. 2000).

El neuropéptido Y se expresa exclusivamente en neuronas, y todas las respuestas fisiológicas que desencadena son provocadas por activación específica de sus receptores. Estudios usando análogos del NPY en varios sistemas modelo y tipos de células, demostraron diferentes afinidades de unión al receptor y diferentes ordenes de potencia del ligando, lo cual indican que existen múltiples subtipos de receptores de NPY, de los cuales han sido descritos 3 tipos de receptores: Y1, Y2 y Y3.

Estudios de unión a ligando revelan que los receptores tipo Y1, Y2 y Y3 están todos acoplados a proteínas G. Algunos estudios muestran que los receptores NPY pueden interactuar con otros receptores clásicos como los adrenoreceptores α y β y los receptores colinérgicos.

Los receptores NPY están acoplados a varios mecanismos de señales de transducción, incluida la inhibición de la adenil ciclasa y la estimulación o inhibición del incremento del calcio intracelular (Lundell, I. et al. 1995).

Al igual que otros neuropéptidos, el neuropéptido Y es inactivado por endopeptidasas especializadas e incluso se ha visto que sufre hidrólisis enzimática e contacto con la saliva humana (Marini, M. And Roda, L.G. 2000).

Se han realizado estudios de los neuropéptidos sustancia P (SP), neurokinina A (NKA), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), péptido vasoactivo intestinal (VIP) y neuropéptido Y (NPY) sobre la síntesis de DNA en células de pulpa dental, principalmente en fibroblastos. Se hizo un ensayo de respuesta proliferativa dependiente con la concentración, realizado con SP, NPY, NKA, CGRP y VIP (0.01 a 1 nM) en presencia de factor de crecimiento epitelial, Hidrocortisona y suero fetal bovino, usando timidina tritiada como trazador de incorporación; observándose que SP, NKA y CGRP pro no NPY y VIP, incrementan el número de células en forma dependiente de la concentración, sugiriendo a

SP, NKA y CGRP como péptidos con propiedades reguladoras en el crecimiento, estableciendo así que neuropéptidos sensoriales pueden estar involucrados en el desarrollo pulpar y la regeneración de pulpas injuriadas (Bongenhielm, U., et al. 1995).

2.14. Estudios recientes en neuropéptidos

Técnicas radioinmunométricas se han utilizado para determinar los niveles de estos neuroéptidos en la piel humana, encontrando altas concentraciones de neurokinina A (NKA), la sustancia P (SP), y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), en regiones de la piel relacionadas con gran sensación táctil; encontrando en estas mismas regiones bajas concentraciones de péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Eedy, D.J., Shaw, C., Johnston, C.F, and Buchanan, K.D. 1994).

La sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), neuropéptido Y (NPY) y el péptido vasoactivo intestinal (VIP) han sido identificados en tejidos óseos por inmunohistoquímica y radioinmunoanálisis, encontrándose las mayores concentraciones para NPY en todo el hueso, el VIP se encontró principalmente en periostio y médula ósea, y el CGRP se encontró uniforme en todos estos tejidos, lo cual sugiere funciones a nivel de metabolismo local por parte de estos neuropéptidos (Ahmed, M., Srinivasan, G.R., Theodorsson, E. Bjurholm, A. and Kreicbergs, A. 1994).

Se observó el efecto directo de CGRP y SP in vitro, sobre la proliferación de fibroblastos aislados de tejido pulpar humano, evaluando la captación de timidina tritiada, y la incorporación de azufre 35 en las estructuras de glicosaminoglicanos, lo cual sugiere la función de estos dos neuropéptidos en la regeneración de estas células en un tejido pulpar injuriado (Trantor, I.R., Mecer, N.H. and Birner, R. 1995).

Se evaluaron en fibras nerviosas y médula ósea los niveles por radioinmunoanálisis de neuropéptido Y (NPY) y péptido intestinal vasoactivo (VIP) en ratas sanas y con artritis, encontrando niveles ligeramente superiores de NPY en las ratas con artritis comparados con las ratas sanas, encontrándose también que los niveles de VIP en fibras nerviosas no difieren en estos dos grupos de animales. Estos niveles de NPY no fueron alterados en ratas previamente tratadas con capsaicina, pero si se aumentaron los niveles de VIP en estas ratas pretratadas con la capsaicina (Ahmed, M., Bjurholm, A., Theodorsson, E., Schultzberg, M. and Kreicbergs, A. 1995).

Se han estudiado los efectos de SP, NKA, CGRP, NPY y VIP sobre la síntesis de DNA en células pulpares en crecimiento. Estos estudios demostraron que SP, NKA y CGRP tienen un efecto positivo y directo con su concentración sobre la síntesis de DNA en estas células. El NPY y VIP no mostraron tener relación dependiente de la concentración sobre la síntesis de DNA. Esto demuestra el papel regulatorio en el crecimiento por parte de SP, CGRP y NKA in vitro, lo cual sugiere que estos neuropéptidos sensoriales pueden estar involucrados en el desarrollo pulpar y en la regeneración de un tejido pulpar injuriado (Bongenhielm, U., Haegerstrand, A., Theodorsson, E. and Fried, K. 1995).

Se ha identificado por radioinmunoanálisis la expresión de una proteína precursora del péptido intestinal vasoactivo (VIP) en tracto genital femenino humano. Este pro-VIP no causa alteraciones en la función muscular, pero su presencia sugiere que en estos tejidos puede ocurrir procesamiento post-transcripción de este precursor (Bredkjoer, H.E., Palle, C., Ekblad, E., Fahrenkrug, J. and Ottesen, B. 1997).

El CGRP demostró su capacidad de aumentar en 1.8 veces la expresión de las proteínas BMP-2 (Bone Morphogenetic protein-2), y en 2.8 veces la cantidad de AMPc (Adenosin monofosfato cíclico) in vitro en células pulpares, lo cual indica que estas células poseen la maquinaria para responder a la estimulación por parte de estos péptidos, asociándolos con la

capacidad de formar dentina y por lo tanto de regenerar tejidos duros en el diente (Calland, J.W., Harris, S.E. and Carnes, D.L. 1997).

El péptido intestinal vasoactivo VIP, administrado intracerebroventricularmente, ha mostrado sus propiedades analgésicas a nivel central. Esto indica que el VIP juega un papel importante en los procesos nociceptivos (Macasai, M., Szabo, G. and Telegdy, G. 1998).

Además se ha visto que es claramente expresado y transportado en regeneración primaria de neuronas aferentes, luego de efectuar axotomía del nervio alveolar inferior (Fristad, I., Jacobsen, E.B. and Kvinnsland, I.H. 1998).

Ha sido evaluada la presencia de receptores del péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la sustancia P (SP) en nodos linfoides, apéndice, bazo y timo, encontrándose expresados en todos estos tejidos. En el timo, los receptores de VIP se expresan principalmente en corteza y en médula, mientras los receptores de SP se expresan mayoritariamente en vasos sanguíneos; sugiriéndose una compartimentalización de estos receptores en los diferentes tejidos linfoides, otorgándole a estos neuropéptidos, un papel importante en la regulación inmune (Reubi, J.C., Horisberger, U., Kappeler, A. and Laissue, J.A. 1998).

Se ha observado que hay aumentos significativos en la expresión de CGRP y SP en pulpas dentales y en ligamento periodontal de dientes sometidos a movimientos ortodónticos, lo cual involucra al CGRP y a la SP, en procesos tisulares en el remodelamiento del ligamento periodontal y hueso alveolar durante movimientos dentales ortodónticos (Norevall, L.I., Matsson, L. and Forsgren, S. 1998).

Comparando cuatro métodos de extracción de neuropéptidos, se demostró que el uso de inhibidores de proteasas no incrementa la recuperación de los neuropéptidos, pero son fundamentales para obtener esta recuperación con mínima variabilidad (Awawdeh, L., Lundy, F.T., Shaw, C., Lamey, P.J., Linden, G.F. and Kennedy, J.G. 1999).

La pulpa dental es un tejido altamente innervado por neuronas que contienen CGRP y SP, cuyos niveles son aumentados en los procesos inflamatorios. Por medio de radioinmunoanálisis se evaluó la especificidad de la respuesta inflamatoria con el transporte axonal, en ratas cuyos molares fueron sometidos a exposición pulpar, observándose que la inflamación pulpar conlleva a una alteración selectiva en los niveles de los neuropéptidos, con alteraciones en el transporte o síntesis de estos neuroéptidos a nivel de ganglio trigémino (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999) (Byers, M.R. and Narhi, M.V. 1999).

Los procesos inflamatorios en el tejido pulpar humano, conducen a un incremento en el volumen de fluidos y al volumen de sangre en este tejido de baja adaptabilidad, llevándolo a un aumento de la presión tisular (Heyeraas, K.J. and Berggreen, E. 1999).

Estudios recientes han mostrado que el péptido intestinal vasoactivo (VIP), puede regular la actividad de osteoblastos y osteoclastos, siendo un buen “reclutador” de osteoclastos, lo cual le brinda un papel neuro-osteogénico en el metabolismo óseo. Esto se observó, analizando los efectos del VIP sobre la formación de osteoclastos y sobre la expresión de RNAm de 3 proteínas involucradas en la formación de osteoclastos; mostrando que los efectos inhibidores del VIP sobre el reclutamiento de osteoclastos son debidos a la regulación de la expresión de estas 3 proteínas envueltas en las largas fases de diferenciación de los osteoclastos (Mukohyama, H., Ransjo, M., Taniguchi, H., Ohyama, T. and Lerner, U.H. 2000).

2.15. Radioinmunoanálisis (RIA)

El radioinmunoanálisis es una técnica muy utilizada en la cuantificación de sustancias que se encuentran en muy bajas concentraciones en los diferentes tejidos, como es el caso de las hormonas peptídicas y los neuropéptidos (Yallow, R.S. and Berson, S.A. 1960).

Esta técnica se basa en el principio de competición entre antígenos fríos **Ag** (analito sin radiomarcado) y un antígeno caliente **Ag*** (analito radiomarcado), por los sitios de unión de un anticuerpo específico **Ab**, para obtener especies enlazadas no radiactivas Antígeno frío-Anticuerpo (**Ag-Ab**), especies enlazadas radiactivas Antígeno caliente-Anticuerpo (**Ag*-Ab**), y las diferentes especies libres marcadas y no marcadas.

Conociendo la cantidad de **Ag*** colocada en cada tubo de ensayo, al aumentar la cantidad de **Ag** estándar, se obtienen menores cantidades de **Ag*-Ab**, y mayores cantidades de **Ag-Ab**. Del mismo modo, habrá mayor cantidad de **Ag*-Ab** y menor cantidad de **Ag-Ab**, cuando el estándar esté presente en bajas cantidades.

Cuando se logran separar las fracciones libres de las unidas en el ensayo, por ejemplo por precipitación selectiva, es posible elaborar una curva de calibración, donde se tenga en cuenta el porcentaje de **Ag*** unido al anticuerpo específico **Ab**, contra la concentración de **Ag** estándar adicionada (curva dosis-respuesta (Bolton, A. and Hunter, W.M. 1973) (Yallow, R.S. and Berson, S.A. 1960) (Hunter, W.M. 1971).

A pesar de existir varias técnicas para cuantificar analitos de características similares a las de los neuropéptidos, el radioinmunoanálisis (RIA) es el que presenta mayor especificidad, exactitud, precisión, sensibilidad y reproducibilidad, lo cual hace del RIA una técnica confiable (Moos, A. et al. 1982) (Chard, T. 1990).

3. Materiales y métodos

3.1. Muestras

Como población de muestras se tomaron 3 tipos de tejido pulpar humano: tejido pulpar sano (Grupo control negativo), tejido pulpar con diagnóstico clínico de pulpitis irreversible aguda (Grupo experimental) y tejido pulpar con inflamación inducida (Grupo control positivo).

Como criterio de inclusión, se tuvo en cuenta que las muestras fueran tomadas de pacientes sistémicamente sanos, con edad entre 20 y 40 años.

El tejido pulpar de dientes sanos, se obtuvo de premolares con exodoncia indicada para fines ortodónticos, previa autorización de los pacientes que voluntariamente quisieran participar en el estudio.

Las muestras de pulpitis irreversible aguda, se obtuvieron de dientes con diagnóstico clínico de pulpitis irreversible aguda.

Las muestras pulpares con inflamación inducida, se obtuvieron también de dientes con exodoncia indicada para fines ortodónticos.

El número de muestras fue de 30 en total, de las cuales 12 fueron pulpas sanas utilizadas en el proceso de estandarización del método de extracción de los neuropéptidos y el resto de las muestras fueron utilizadas en el montaje de los radioinmunoanálisis específicos.

Las 18 muestras restantes correspondieron: 6 a las pulpas sanas, 6 a las pulpas con inflamación inducida y 6 a las pulpas con diagnóstico de inflamación irreversible aguda.

3.2. Procedimiento en los pacientes

En el manejo del paciente para obtener los tejidos sanos, se realizaron profilaxis de los premolares indicados para exodoncia, se anestesiaron los pacientes conductivamente con Prilocaína sin vasoconstrictores, para evitar la liberación de los neuropéptidos y evitar cualquier lesión sobre el tejido pulpar.

Se realizaron las exodoncias simples. Se lavaron los premolares con NaClO al 5% para retirar los restos de ligamento periodontal. Luego se seccionaron los dientes con fresa estéril cilíndrica de diamante, en una pieza de mano de alta velocidad. Por último se retiraron los tejidos pulpares con ayuda de una cucharilla de endodoncia estéril, en no mas de 2 minutos.

Para la obtención de las pulpas con inflamación inducida, primero se anestesiaron los pacientes conductivamente con Prilocaína sin vasoconstrictores. Se hizo aislamiento de los campos operatorios. Se tomaron los tejidos pulpares de dientes indicados para exodoncia con fines ortodónticos, realizando una exposición mecánica de los tejidos pulpares. Se esperó un tiempo entre 5 y 10 minutos induciendo la inflamación, para luego retirar las pulpas con un tira-nervios estéril.

Para obtener los tejidos pulpares con pulpitis irreversible aguda, primero se anestesiaron a los pacientes. Luego se realizó un aislamiento de los campos operatorios, y por último se realizó la apertura de los dientes involucrados para extraer los tejidos pulpares con un tira-nervios estéril.

3.3. Almacenamiento de los tejidos pulpares

Los tejidos pulpares se fijaron en paraformaldehído al 4% para evitar la degradación del neuropéptido por inactivación de las peptidasas endógenas, y se almacenaron en tubos Eppendorf a una temperatura de -70°C.

3.4. Extracción de los neuropéptidos del tejido pulpar

Antes de realizar la cuantificación de los 5 neuropéptidos involucrados en este estudio, se realizó la extracción por 3 métodos distintos con la posterior cuantificación de la sustancia P y del péptido relacionado con el gen de la calcitonina CGRP, con el fin de elegir el sistema de extracción en el que se obtenga una mayor recuperación de los neuropéptidos.

Los 3 sistemas de extracción evaluados fueron:

Método 1: El tejido pulpar fue pesado y congelado a -20°C . Luego se colocó un volumen de 400 μL de una mezcla de HCl 0,7M – Etanol (3:1) y se maceró manualmente. Se dejó 12 horas a 4°C para que se realizara la extracción, y posteriormente se centrifugó a 2200g (3500 r.p.m), 20 min. y 4°C . El sobrenadante fue colectado y almacenado a -70°C . Para el radioinmunoanálisis, se utilizó el extracto puro o diluido con agua desionizada y destilada (Awawdeh, L., et al. 1999).

Método 2: El tejido pulpar fue pesado y homogenizado en hielo seco usando un mortero de vidrio con mano de teflón, adicionando 500 μL de ácido acético en ebullición 0,5M. Posteriormente la mezcla se dejó en ebullición por 10 minutos, para luego centrifugar a 2200 g (3500 r.p.m), 20 min. y 4°C . El sobrenadante fue colectado y almacenado a -70°C . Para el radioinmunoanálisis, se utilizó el extracto puro o diluido con agua desionizada y destilada (Awawdeh, L., et al. 1999).

Método 3: Una vez recolectadas todas las muestras, fueron pesadas y conservadas en paraformaldehído al 4% a -70°C . Luego se descongelaron sin choque térmico y se les agregó un volumen de 250 μL de ácido acético 0,5M y 100 μL de un cocktail de inhibidores de proteasas : EDTA (para metalo-peptidasas) 1.3mM, pepstatina (para aspartico peptidasas) 1 μM , y leupeptina (para serin y cisteín peptidasas) 1 μM , para hacer la extracción de los neuropéptidos del tejido pulpar. Las muestras en ácido acético y los inhibidores de proteasas se colocaron a ebullición en un baño de maría durante 10 minutos en tubos Eppendorf sellados con cinta parafinada en la tapa. Se centrifugaron por 20 minutos a 2200 g (3500 r.p.m) y 4°C . Este procedimiento permitió obtener un sobrenadante con los neuropéptidos a analizar (Awawdeh, L., et al. 1999) (El-Karim, F.T., Lundy, G.J., Linden, P.J. and Lamey, J. 2003).

3.5. Estandarización del radioinmunoanálisis específico para los neuropéptidos.

3.5.1. Reactivos utilizados

Los radioinmunoanálisis específicos para cuantificar la SP, NKA, CGRP, NPY y VIP, se desarrollaron utilizando los siguientes reactivos para RIA de la casa comercial Phoenix Pharmaceutical® :

RK-015-02 Human Calcitonine Gene Related Peptide (CGRP)

RK-049-03 Human Neuropeptide Y (NPY)

RK-064-16 Human Vasoactive Intestinal Polypeptide (VIP)

RK-046-15 Human neurokinine A (NKA)

RK-061-05 Human Substance P (SP).

3.5.2. Montaje del Radioinmunoensayo

Se utilizaron tubos de ensayo de vidrio, los cuales fueron previamente recubiertos con SIGMACOTE SL-2, una solución especial de silicona en heptano, la cual forma una capa microscópica sobre el vidrio, minimizando el fenómeno de adsorción de las sustancias involucradas en el ensayo a las paredes del tubo.

El montaje de la curva de calibración se realizó con tubos dispuestos de la siguiente manera:

T: Tubos de cuentas totales. Estos tubos llevan únicamente péptido radiomarcado, y son los tubos control que nos indican la dosis radiactiva presente en todos los tubos del ensayo.

Bo: Tubos de máxima unión. Estos tubos llevan péptido radiomarcado y anticuerpo específico. Indican la máxima unión alcanzada en el ensayo, ya que el péptido radiomarcado se une al anticuerpo en ausencia de péptido frío.

NSB: Tubos de unión no específica. Estos tubos indican la posible unión no específica que pueda existir entre el péptido radiomarcado y el segundo antisuero del sistema de separación de las fracciones libres y unidas, y llevan ausencia de primer anticuerpo.

TS: Tubos estándar. Estos tubos contienen péptido radiomarcado, primer anticuerpo, y cantidades crecientes de péptido frío. Esta serie de tubos permite la elaboración de la curva de calibración del radioinmunoanálisis.

TM: Tubos de muestra. Estos tubos contienen péptido radiomarcado, primer anticuerpo y un volumen de muestra donde se encuentra en concentración desconocida el péptido a analizar. Aquí marcamos estos tubos de tres formas diferentes, para diferenciar el tipo de muestra a analizar:

TM P.S: Muestras provenientes de Pulpas Sanas

TM P.Ind: Muestras provenientes de Pulpitis Inducida

TM P.Irrev: Muestras provenientes de Pulpitis Irreversible Aguda

La siguiente tabla muestra la forma en que se montó el Radioninmunoanálisis específico para cada uno de los neuropéptidos analizados en este estudio.

Tabla 1
Montaje del Radioinmunoanálisis

MUESTRA	N° tubo	Pépt (125I)	Pépt. stand	Muestra	Buffer	Anti-péptido
		uL	100 uL	uL	uL	UL
T	1	100	-----	-----	-----	-----
T	2	100	-----	-----	-----	-----
NSB	3	100	-----	-----	200	-----
NSB	4	100	-----	-----	200	-----
Bo	5	100	0 ng/mL	-----	100	100
Bo	6	100	0 ng/mL	-----	100	100
TS 1	7	100	128 pg/tub	-----	-----	100
TS 1	8	100	128 pg/tub	-----	-----	100
TS 2	9	100	64 pg/tub	-----	-----	100
TS 2	10	100	64 pg/tub	-----	-----	100
TS 3	11	100	32 pg/tub	-----	-----	100
TS 3	12	100	32 pg/tub	-----	-----	100
TS 4	13	100	16 pg/tub	-----	-----	100
TS 4	14	100	16 pg/tub	-----	-----	100
TS 5	15	100	8 pg/tub	-----	-----	100
TS 5	16	100	8 pg/tub	-----	-----	100
TS 6	17	100	4 pg/tub	-----	-----	100
TS 6	18	100	4 pg/tub	-----	-----	100
TS 7	19	100	2 pg/tub	-----	-----	100
TS 7	20	100	2 pg/tub	-----	-----	100
TS 8	21	100	1 pg/tub	-----	-----	100
TS 8	22	100	1 pg/tub	-----	-----	100
TM P.S 1	23	100	-----	50	50	100
TM P.S 1	24	100	-----	50	50	100
TM P.S 2	25	100	-----	50	50	100
TM P.S 2	26	100	-----	50	50	100
Hasta P.S 6	27	100	-----			100
TM P.Ind 1	28	100	-----	50	50	100
TM P.Ind 1	29	100	-----	50	50	100
TM P.Ind 2	30	100	-----	50	50	100
TM P.Ind 2	31	100	-----	50	50	100
Hasta 6	32	100	-----			100
TM P.Irrev 1	33	100	-----	50	50	100
TM P.Irrev 1	34	100	-----	50	50	100
TM P.Irrev 2	35	100	-----	50	50	100
TM P.Irrev 2	36	100	-----	50	50	100
Hasta 6	37	100	-----			100

3.5.3. Tiempo de primera incubación

El tiempo de primera incubación es el tiempo que transcurre entre la adición del primer grupo de reactivos (péptidos radiomarcados, primer anticuerpo , estándar o muestras) y la adición del sistema de separación de las fracciones libres y unidas en el RIA. Este debe ser un tiempo en el que se garantice la formación de los equilibrios entre los analitos y los sitios de unión específicos del primer anticuerpo.

En el presente estudio se experimentaron 3 tiempos de primera incubación: 12 horas, 18 horas y 24 horas.

3.5.4. Tiempo de segunda incubación – Separación de las fracciones libres y unidas

Una vez se completa el tiempo de primera incubación, se procede a separar las fracciones libres de las unidas dentro de los tubos de ensayo; esto se realiza por el método de precipitación del segundo antisuero, por medio del cual se forman complejos de alto peso molecular, que son más insolubles que las fracciones libres de los reactivos, y que se pueden separar fácilmente por centrifugación.

Este sistema de separación está compuesto por un suero obtenido de inmunización de cabras con inmunoglobulina G IgG de conejo (anti IgG de conejo en cabra) , Suero normal de conejo, y en algunos casos en los que los complejos son difíciles de precipitar por su baja masa molecular se utiliza suero fetal bovino.

Se centrifugaron los tubos para separar las fracciones libres de las unidas. En este paso se formó un pellet o precipitado. Esta centrifugación se realizó a 3000 r.p.m a 4°C.

Este pellet se separó del sobrenadante, y llevó finalmente al contador de radiación Gamma. Aquí se leyó la radioactividad presente en las

fracciones unidas, y se construyeron las curvas de calibración en las cuales se interpolaron los datos de las muestras (Chard, T. 1990) (Yallow, R.S. and Berson, S.A. 1960).

Basados en anteriores protocolos reportados en la literatura, las modificaciones que en este estudio se llevaron a cabo fueron:

En el sistema de separación fueron:

2 tiempos de segunda incubación: 30 minutos y 90 minutos.

Adición y no adición de suero fetal bovino.

2 tiempos de centrifugación: 20 minutos y 60 minutos.

Estas modificaciones buscan obtener el mejor sistema de separación de las fracciones libres y unidas, el cual es clave en el radioinmunoanálisis.

3.5.5. Recolección de los datos

Los datos de cuentas o desintegraciones por minuto (c.p.m) leídos en el contador de radiación gamma, se procesaron en el programa RIA STAR. Este programa procesa los datos de manera tal que, junto a los datos conocidos de las concentraciones utilizadas en la fabricación de la curva estándar, se puedan convertir estos datos en porcentaje de unión. El programa entregó datos para poder construir las curvas de calibración en un sistema llamado LOGIT-LOG; estas son representaciones lineales, las cuales permiten interpolar con facilidad los datos de unión arrojados por los tubos donde se encuentran las muestras a analizar.

3.6. Procesamiento de los resultados

Las modificaciones en procedimiento que se realizan en los radioinmunoanálisis, conducen a que los promedios de los resultados obtenidos presenten entre sí mínimas desviaciones, lo cual se verifica dentro

del mismo software RIA-STAR, el cual realiza una estadística descriptiva que incluye frecuencias, promedios y desviaciones estándar.

Para ver diferencias estadísticamente significativas o no entre los niveles de neuropéptidos expresados en los tres tipos de tejidos pulpares (pulpas sanas, pulpitis irreversible aguda y pulpitis inducida), se utilizaron pruebas de contrastes no paramétricos como el U-test de Mann-Whitney.

Esta es una prueba que independiente de las distribuciones de la población, permite evaluar si hay diferencias significativas o no, entre datos provenientes de una misma población o de dos poblaciones diferentes. Es una prueba de estadística descriptiva que maneja un error de 0.5% con una $p < 0.05$, para poder discriminar entre sí, los tres tipos de muestras son significativas.

Otro análisis estadístico realizado para ver diferencias significativas o no entre los niveles de los neuropéptidos presentes en los tres tipos de tejido pulpar, es el estadístico F o razón o cociente de varianzas. Esta prueba involucra una estimación de varianzas con base en la variación entre los datos; y una estimación de varianzas con base en la variación de las muestras.

3.6.1. U-test de Mann Withney

La prueba U, prueba de Wilcoxon o prueba de Mann Withney, cuyo nombre se debe a los estadistas que contribuyeron a su desarrollo. Los tres nombres distintos se refieren a los diversos métodos de organización de los cálculos, pero los procedimientos son equivalentes desde una perspectiva lógica. Podemos probar la hipótesis nula de que las dos muestras provienen de poblaciones idénticas sin tener que suponer que las poblaciones de las que se efectúa el muestreo tienen distribuciones normales; de hecho, la prueba implica sólo que las poblaciones de las que se efectúa el muestreo sean continuas para evitar empates y en la práctica no importa si se satisface esta suposición. Para la prueba U, primero se ordenan los datos

conjuntamente, como si comprendieran una muestra, en un orden creciente de magnitud, asignando a los datos, en este orden 1,2,3,...n. Posteriormente se separan los datos provenientes de los dos grupos, y se hace la sumatoria de los rangos que les fueron asignados. Ahora, si hay una diferencia considerable entre las medias de las dos poblaciones, es probable que la mayoría de los rangos inferiores vaya con los valores de una muestra, mientras que es probable que la mayor parte de los rangos superiores vaya con los valores de la otra muestra. La prueba de la hipótesis nula de que dos muestras provienen de poblaciones idénticas debe basarse entonces en R_1 , la suma de los rangos de los valores de la primera muestra, o en R_2 , la suma de los rangos de los valores de la segunda muestra.

Si los tamaños de las muestras son N_1 y N_2 , la suma de R_1 y R_2 , es simplemente la suma de los primeros N_1+N_2 enteros positivos. Luego se calcula el valor de U , μ_v y σ_v por medio de las siguientes fórmulas:

$$U = N_1 \times N_2 + \frac{N_1(N_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$\mu_v = \frac{N_1 \times N_2}{2}$$

$$\sigma_v^2 = \sqrt{\frac{N_1 \times N_2 (N_1 + N_2 + 1)}{12}}$$

$$z = \frac{U - \mu_v}{\sigma_v}$$

Finalmente, si no se cumple que $-1,96 \leq z \leq 1,96$; entonces se dice que no hay diferencia significativa entre los dos grupos de datos; y de lo contrario se concluye que no hay diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos de datos (Freund, J., and Simon, G. 1994).

3.6.2. Estadístico F – Cociente de varianzas

El cociente de varianzas es un método utilizado para comparar si dos grupos de datos son significativamente diferentes o si por el contrario

proviene de la misma población. En este método se calcula la media de los dos grupos de datos a comparar, y luego se calcula la varianza en cada uno de los grupos. Esta es una primera estimación, que se basa en la variación entre las medias muestrales, y se debe comparar con una segunda estimación, la cual se basa en la variación de las muestras y por tanto, mide la variación debida al azar. Para establecer esta comparación sobre una base rigurosa, usamos el estadístico que se conoce como estadístico de F.

$$F = \frac{\text{Estimación de } \sigma^2 \text{ con base en la variación entre las } X}{\text{Estimación de } \sigma^2 \text{ con base en la variación de las muestras}}$$

Dado que se rechazará la hipótesis nula sólo cuando F es grande (esto es cuando la variación entre las medias es muy alta para atribuirse al azar), basamos nuestra decisión, tomando como criterio los valores de F_α de las tablas, con un límite de confianza de $\alpha = 0,05$, comparando con las medias de k muestras aleatorias de tamaño n, para tener k-1 grados de libertad para el numerador, y k(n-1) grados de libertad para el denominador (Freund, J., and Simon, G. 1994).

3.7. Aspectos éticos

Esta investigación será regida por las disposiciones legales de acuerdo al Ministerio De Salud en su resolución N° 008434 de 1993, donde estipula en el TITULO II, Numeral 1: De la investigación en seres humanos.

Capítulo 1: “ De los aspectos éticos de la investigación en seres humanos.

Artículo 6, Numeral d ; que dice: Deberá prevalecer la seguridad de los beneficios y expresar claramente los riesgos mínimos, los cuales no deben en ningún momento contradecir el artículo 10 de esta resolución.

Numeral d: Contará con el consentimiento informado y por escrito del sujeto de investigación o su representante legal, con las excepciones que este reglamento señale.

Numeral g: Se llevará a cabo la autorización del representante legal de la institución investigadora y de la institución donde se realiza la investigación; el consentimiento informado de los participantes; y la aprobación del proyecto por parte del comité de ética hospitalaria o del comité de ética de investigación de la institución.

El formato a utilizar, en el cual se expresa el consentimiento del paciente para formar parte del estudio se presenta a continuación:

CONSENTIMIENTO INFORMADO
PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
UNIDAD DE POSTGRADOS
CONSENTIMIENTO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

Le invitamos a participar en un estudio investigativo, propuesto por la unidad de postgrados de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana, en la Ciudad de Santa Fe de Bogotá, Colombia. Su participación en este estudio es totalmente voluntaria. Este proyecto nos permite investigar conceptos acerca de la liberación de sustancias que producen inflamación y dolor en diferentes estados de la pulpa del diente. Si tiene alguna pregunta, por favor no dude en realizarla a alguno de los investigadores, quien con mucho gusto, le aclararan sus inquietudes.

Explicación del proyecto de investigación:

Propósito:

El presente estudio se diseña para medir la cantidad de sustancia P (SP), neurokinina A (NKA), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), neuropéptido Y (NPY) y péptido vasoactivo intestinal (VIP), las cuales son sustancias mediadoras de la inflamación y del dolor, y que se liberan en la pulpa de dientes humanos sanos o enfermos. Este estudio permitirá poder correlacionar la liberación de estas sustancias en los casos de diagnóstico clínico de pulpitis y posteriormente a los procedimientos de operatoria clínicos, en busca del desarrollo

de terapias analgésicas y sistemas de regeneración de los diferentes tejidos afectados.

Beneficios:

Los pacientes se verán beneficiados ya que se podrá disponer en un futuro de medicamentos que reduzcan o eviten el dolor postoperatorio, y disminuyan la prevalencia de una de las complicaciones postratamiento de los procedimientos odontológicos, como es la necrosis pulpar y la subsecuente patología periapical.

Confidencialidad:

Cuando los resultados de este estudio sean reportados en revistas médicas, científicas o en congresos científicos, los nombres de todos aquellos que tomaron parte en el estudio serán omitidos. Los registros médicos de cada individuo, permanecerán archivados en la entidad. Las historias médicas, resultados de exámenes y la información que usted nos ha dado es absolutamente confidencial. De manera que solamente usted y el investigador tendrán acceso a estos datos. Por ningún motivo se divulgará esta información sin su consentimiento.

Luego de haber leído este documento y de haber conversado con los encargados del estudio, sobre el propósito del procedimiento, la posibilidad de que puedan surgir o desarrollarse complicaciones, los riesgos previsibles que puedan estar involucrados y los posibles métodos alternativos de tratamiento,

Yo _____, con cédula de ciudadanía No. _____, en pleno uso de mis facultades mentales, libre y conscientemente, declaro que autorizo a los investigadores a realizar los procedimientos necesarios, los cuales han sido previamente explicados.

He leído cuidadosamente este formulario antes de firmarlo y he tenido oportunidad de interrogar a los investigadores acerca del procedimiento al cual me someteré, y que me encuentro en capacidad de manifestar mi libre consentimiento.

Firma y cédula del paciente, o persona responsable en caso de menor de edad.

Firma y cédula del investigador

Fecha: Bogotá, a los ____ días del mes de _____ de 2003.

4. RESULTADOS

4.1. Sistema de extracción de neuropéptidos

De los tres sistemas ensayados para extraer los neuropéptidos de las muestras de tejido pulpar, el método elegido fue el método de ebullición en ácido acético del tejido completo.

En este método, se colocó el tejido pulpar en un volumen de ácido acético 0,5 M, en proporción 8mL de ácido por cada gramo de tejido. El ácido acético contenía un cocktail de inhibidores de proteasas compuesto por: EDTA 1,3 mM; Pepstatina 1uM y Leupeptina 1uM.

Se introdujo el tejido sumergido en la mezcla de ácido acético e inhibidores de proteasas en tubos Eppendorf, y posteriormente se sellaron con cinta adhesiva, y se sumergieron en un baño de agua en ebullición durante 10 minutos.

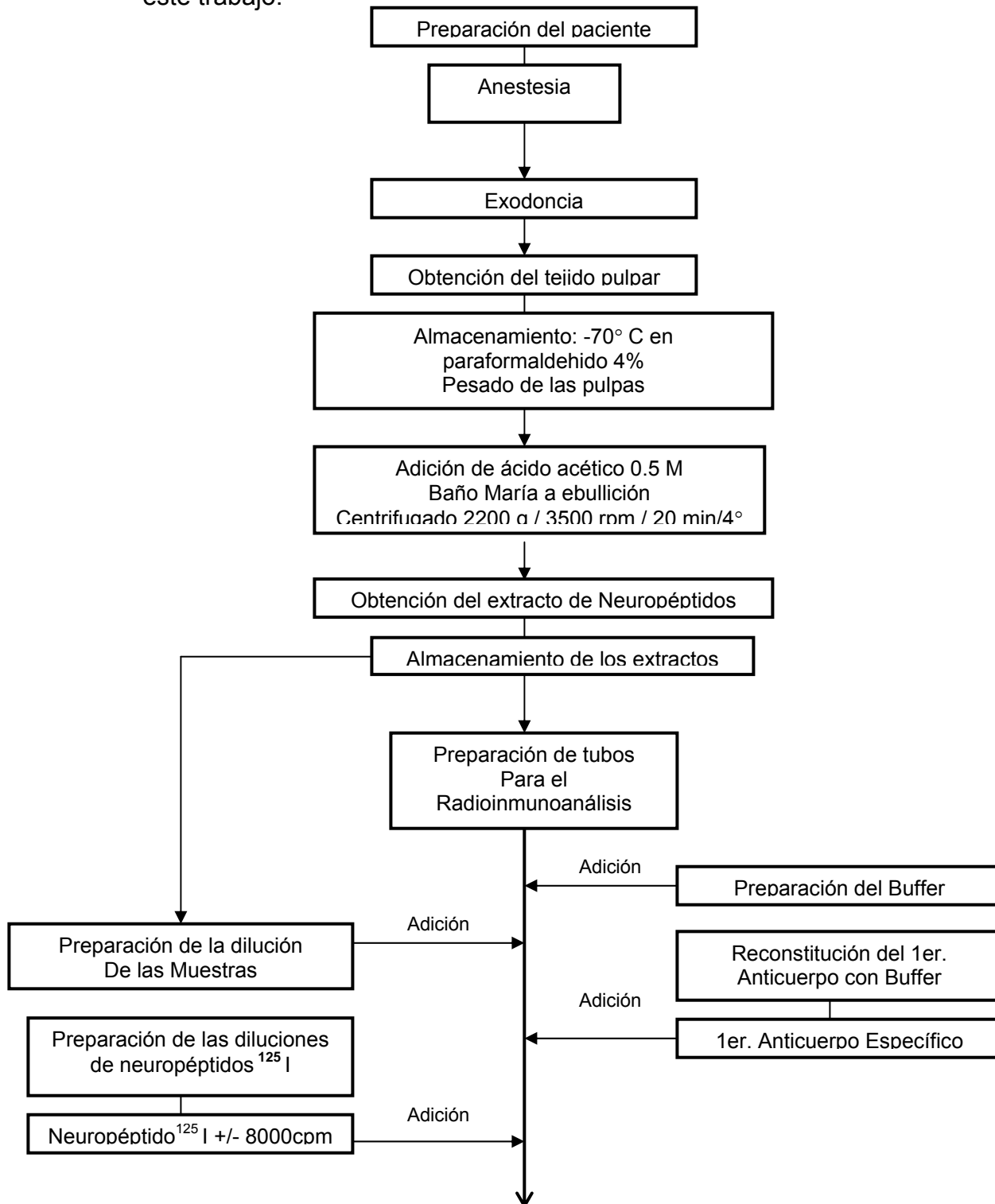
Las muestras se centrifugaron a 3500 r.p.m / 4°C / 20 minutos, y el sobrenadante que contenía los neuropéptidos se almacenó a -70°C.

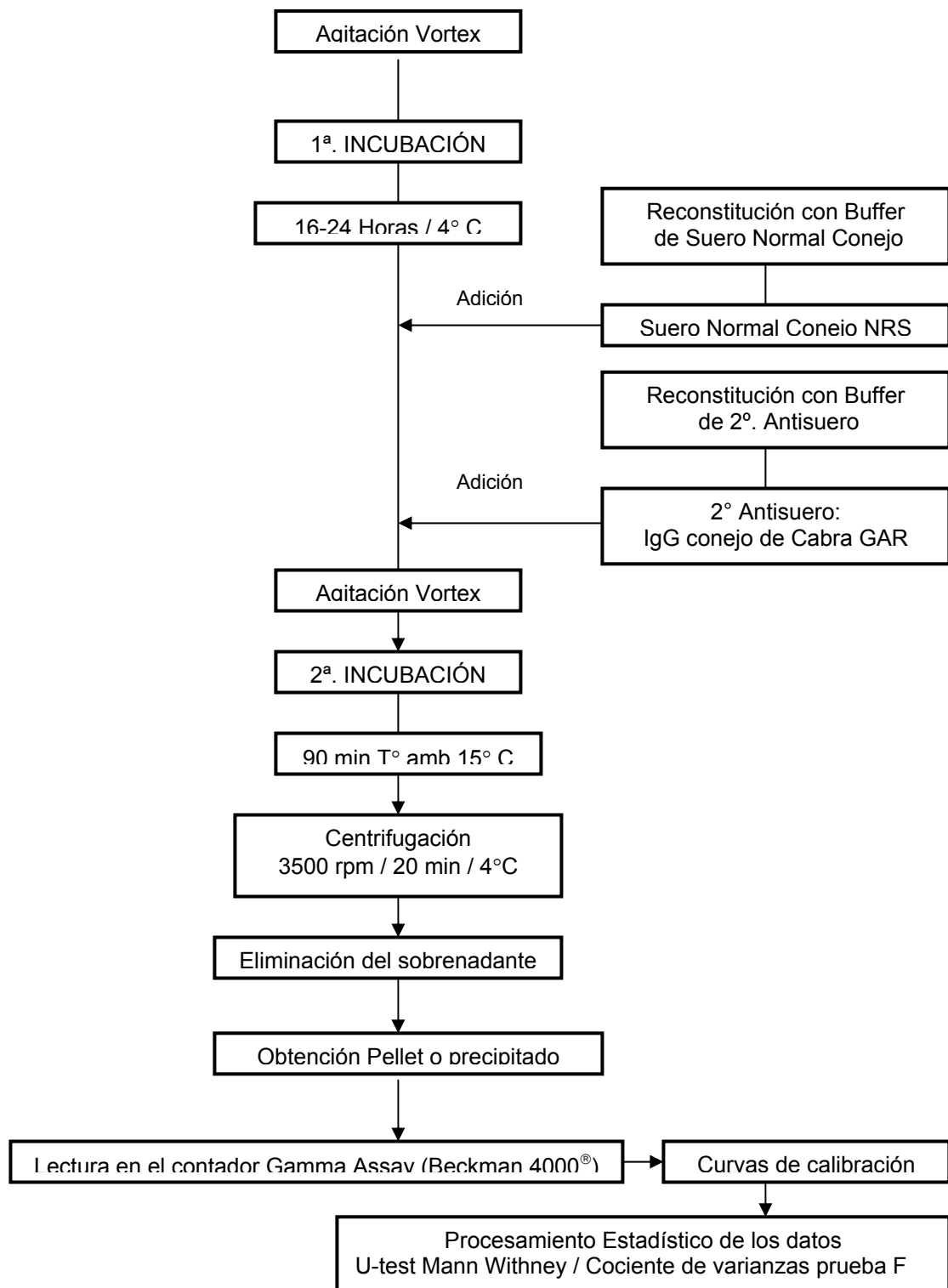
Este método fue escogido al verificar una recuperación de SP y VIP por radioinmunoanálisis alrededor de un 80% mayor que los otros dos métodos ensayados.

Estos dos métodos están de acuerdo a los resultados publicados por El-Karim y colaboradores en el año 2003, y por Awawdeh y colaboradores en el año 1999 (El-Karim, I., et al. 2002) (Awaedeh, L., et al. 1999)

4.2. Radioinmunoanálisis de los neuropéptidos

A continuación se presenta un esquema general del procedimiento en este trabajo:





Las condiciones del radioinmunoanálisis se lograron establecer luego de realizar varios ensayos variando algunas de las condiciones en el procedimiento principalmente en los puntos de concentración del estándar en la fabricación de la curva de calibración, en el sistema de separación de fracciones libres y unidas, y en los tiempos y velocidades de centrifugación.

Las cantidades de los diferentes reactivos utilizados se pueden observar en la tabla número 1.

4.2.1. Curva de calibración Péptido intestinal vasoactivo (VIP)

Los valores en la curva de calibración para el ensayo de cuantificación del péptido intestinal vasoactivo fueron:

Unión total (Bo)	78,69%
Unión no específica (NSB)	14,87%
Número de estándares	8
Puntos de la curva	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128
Ecuación de la recta Logit-Log	$y = -1,114x + 1,287$
Coefficiente de correlación	-0,993

4.2.2. Curva de calibración de Sustancia P (SP)

Los valores en la curva de calibración para el ensayo de cuantificación de la sustancia P fueron:

Unión total (Bo)	18,05%
Unión no específica (NSB)	2,00%
Número de estándares	5
Puntos de la curva	1, 8, 16, 32 y 64
Ecuación de la recta Logit-Log	$y = -0,547x - 0,435$
Coefficiente de correlación	-0,998

4.2.3. Curva de calibración de Neurokinina A (NKA)

Los valores en la curva de calibración para el ensayo de cuantificación de la neurokinina A fueron:

Unión total (Bo)	36,37%
Unión no específica (NSB)	6,13%
Número de estándares	7
Puntos de la curva	2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128
Ecuación de la recta Logit-Log	$y = -1,152x + 1,251$
Coefficiente de correlación	-0,981

4.2.4. Curva de calibración de Neuropeptido Y (NPY)

Los valores en la curva de calibración para el ensayo de cuantificación del neuropeptido Y fueron:

Unión total (Bo)	42,48%
Unión no específica (NSB)	6,56%
Número de estándares	8
Puntos de la curva	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 y 128
Ecuación de la recta Logit-Log	$y = -0,683x + 1,055$
Coefficiente de correlación	-0,986

4.2.5. Curva de calibración de Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP)

Los valores en la curva de calibración para el ensayo de cuantificación del péptido relacionado con el gen de la calcitonina fueron:

Unión total (Bo)	47,59%
Unión no específica (NSB)	9,33%
Número de estándares	6
Puntos de la curva	1, 4, 8, 16, 32 y 64
Ecuación de la recta Logit-Log	$y = -0,600x + 1,266$
Coefficiente de correlación	-0,997

4.3. Niveles de Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

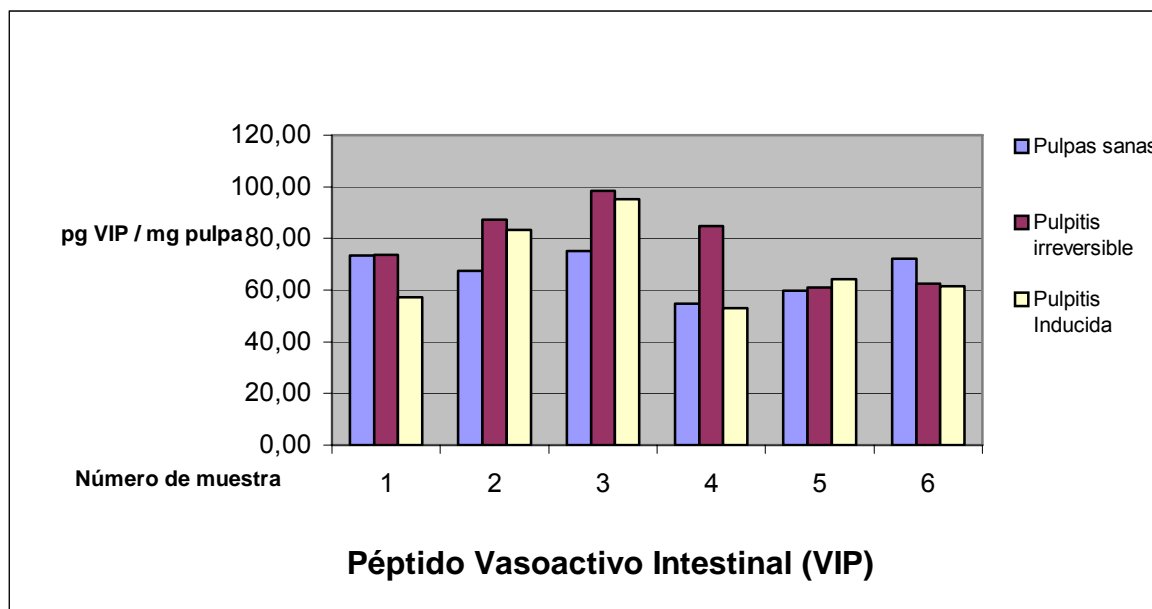
Tabla 2. Niveles de Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

Pulpa Sana pg / mg pulpa	Pulpitis Irreversible pg / mg pulpa	Pulpitis Inducida pg / mg pulpa
73,47	73,76	57,17
67,54	87,23	83,20
75,06	98,46	95,27
54,71	84,80	53,14
59,82	61,00	64,25
72,10	62,52	61,45

Media $\chi = 67,12$
Desv. estándar $\sigma = 7,48$

$\chi = 77,96$
 $\sigma = 13,52$

$\chi = 69,08$
 $\sigma = 15,07$



Gráfica 1. Niveles de Péptido Intestinal Vasoactivo (VIP)

4.3.1. Prueba de contraste U-Test Mann Withney (VIP)

La hipótesis Ho:

El nivel de VIP en pulpas sanas es diferente a pulpas con inflamación ?

El nivel de VIP en pulpitis inducida es diferente que en pulpitis irreversible?

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversibles

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 27$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 18$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 6,24$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 1,44$$

Si cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ No hay diferencia significativa

Pulpitis Inducida vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 11$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 18$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 6,24$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = -1,12$$

Si cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ No hay diferencia significativa

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 17$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 18$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 6,24$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = -0,16$$

Si cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ No hay diferencia significativa

4.3.2. Prueba de contraste – Análisis de varianzas (VIP)

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y \\ N-k = 12 - 1 = 11$$

Si $F \geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversibles

Datos Pulpas sanas = 73,47; 67,54; 75,06; 54,71; 59,82; 72,10.

Media = 67,12

Datos Pulpitis Irreversibles = 73,76; 87,23; 98,46; 84,80; 61,00; 62,52

Media = 77,96

Media de las 2 medias = 72,54

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S_x^2 = \frac{(67,12 - 72,54)^2 + (77,96 - 72,54)^2}{k-1} = 58,75$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S_x^2 = 6 \times 58,75 = 352,5$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S_1^2 + S_2^2}{2} =$$

$$\frac{(73,47 - 67,12)^2 + (67,54 - 67,12)^2 + (75,06 - 67,12)^2 + (54,71 - 67,12)^2 + (59,82 - 67,12)^2 + (72,10 - 67,12)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(73,76 - 77,96)^2 + (87,23 - 77,96)^2 + (98,46 - 77,96)^2 + (84,80 - 77,96)^2 + (61,00 - 77,96)^2 + (62,52 - 77,96)^2}{6 - 1} +$$

$$67,128 + 219,328 = \frac{286,46}{2} = 143,23$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{352,5}{143,23} = 2,46$$

2,46 es $\leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula

NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y \\ N-k = 12 - 1 = 11$$

Si $F \geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

Datos Pulpas sanas = 73,47; 67,54; 75,06; 54,71; 59,82; 72,10.
Media = 67,12

Datos Pulpitis Inducida = 57,17; 83,20; 95,27; 53,14; 64,25; 61,45
Media = 69,08

Media de las 2 medias = 68,10

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S_x^2 = \frac{(67,12 - 68,10)^2 + (69,08 - 68,10)^2}{k-1} = 1,92$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S_x^2 = 6 \times 1,92 = 11,52$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S_1^2 + S_2^2}{2} =$$

$$\frac{(73,47 - 67,12)^2 + (67,54 - 67,12)^2 + (75,06 - 67,12)^2 + (54,71 - 67,12)^2 + (59,82 - 67,12)^2 + (72,10 - 67,12)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(57,17 - 69,08)^2 + (83,20 - 69,08)^2 + (95,27 - 69,08)^2 + (53,14 - 69,08)^2 + (64,25 - 69,08)^2 + (61,45 - 69,08)^2}{6 - 1} +$$

$$67,128 + 272,55 = \frac{339,62}{2} = 169,84$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en X}}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{11,52}{169,84} = 0,068$$

0,068 es $\leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula

NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y$$

$$N - k = 12 - 1 = 11$$

Si $F \geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas Inducida vs. Pulpitis Irreversible

Datos Pulpitis Inducida = 57,17; 83,20; 95,27; 53,14; 64,25; 61,45
Media = 69,08

Datos Pulpitis Irreversibles = 73,76; 87,23; 98,46; 84,80; 61,00; 62,52
Media = 77,96

Media de las 2 medias = 73,52

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(69,08 - 73,52)^2 + (77,96 - 73,52)^2}{k-1} = 39,43$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 6 \times 39,43 = 236,58$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(57,17 - 69,08)^2 + (83,20 - 69,08)^2 + (95,27 - 69,08)^2 + (53,14 - 69,08)^2 + (64,25 - 69,08)^2 + (61,45 - 69,08)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(73,76 - 77,96)^2 + (87,23 - 77,96)^2 + (98,46 - 77,96)^2 + (84,80 - 77,96)^2 + (61,00 - 77,96)^2 + (62,52 - 77,96)^2}{6 - 1} +$$

$$272,55 + 219,33 = \frac{491,88}{2} = 245,94$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{236,58}{245,94} = 0,96$$

0,96 es $\leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula

NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

4.4. Niveles de Sustancia P (SP)

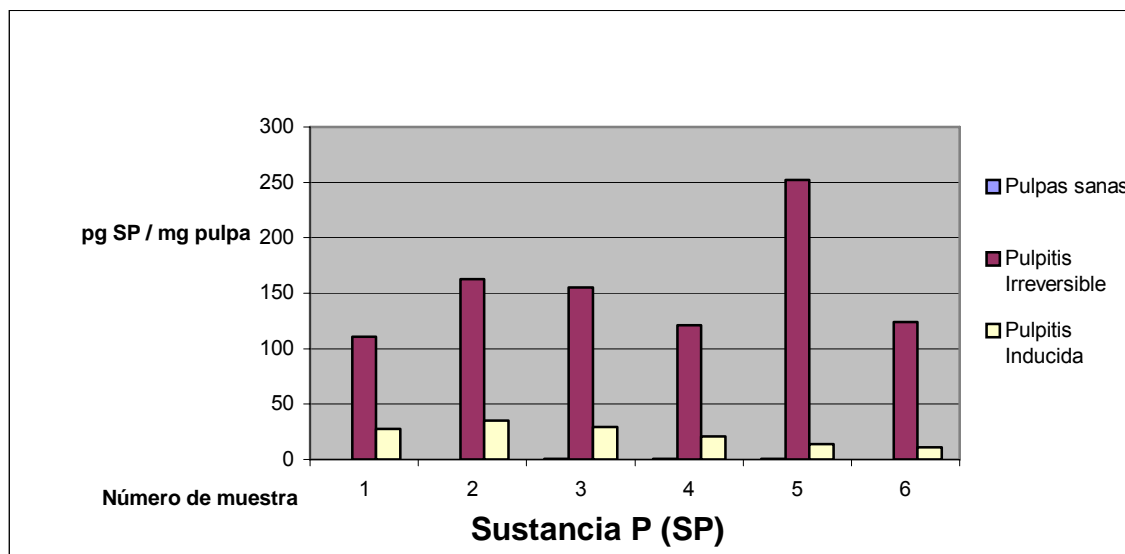
Tabla 3. Niveles de Sustancia P (SP)

Pulpa Sana pg / mg pulpa	Pulpitis Irreversible pg / mg pulpa	Pulpitis Inducida pg / mg pulpa
0,28	110,68	27,50
0,15	162,78	35,48
0,72	155,17	29,17
0,30	121,20	20,97
0,35	252,26	13,95
0,17	124,14	10,84

Media $\chi = 0,33$
Desv. Estándar $\sigma = 0,18$

$\chi = 154,37$
 $\sigma = 47,57$

$\chi = 22,98$
 $\sigma = 8,64$



Gráfica 2. Niveles de Sustancia P (SP)

4.4.1. Prueba de contraste U-Test Mann Withney (SP)

La hipótesis Ho:

El nivel de SP en pulpas sanas es diferente a pulpas con inflamación ?

El nivel de SP en pulpitis inducida es diferente que en pulpitis irreversible?

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 36$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 18$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 6,24$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,88$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ **Si hay diferencia significativa**

Pulpitis Inducida vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 0$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 18$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 6,24$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = -2,88$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ **Si hay diferencia significativa**

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 36$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 18$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 6,24$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,88$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ **Si hay diferencia significativa**

4.4.2. Prueba de contraste – Análisis de varianzas (SP)

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y \\ N-k = 12 - 1 = 11$$

Si $F \geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversibles

Datos Pulpas sanas = 0,28; 0,15; 0,72; 0,30; 0,35; 0,17.

Media = 0,33

Datos Pulpitis Irreversibles = 110,68; 162,78; 155,17; 121,20; 252,26; 124,14

Media = 154,37

Media de las 2 medias = 77,35

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(0,33 - 77,35)^2 + (154,37 - 77,35)^2}{k-1} = 11864,16$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 6 \times 11864,16 = 71184,96$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(0,28 - 0,33)^2 + (0,15 - 0,33)^2 + (0,72 - 0,33)^2 + (0,30 - 0,33)^2 + (0,35 - 0,33)^2 + (0,17 - 0,33)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(110,68 - 154,37)^2 + (162,78 - 154,37)^2 + (155,17 - 154,37)^2 + (121,20 - 154,37)^2 + (252,26 - 154,37)^2 + (124,14 - 154,37)^2}{6 - 1} +$$

$$0,0428 + 2715,35 = \frac{2715,39}{2} = 1357,70$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{71184,96}{1357,70} = 52,43$$

52,43 es $\geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y \\ N-k = 12 - 1 = 11$$

Si $F \geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

Datos Pulpas sanas = 0,28; 0,15; 0,72; 0,30; 0,35; 0,17.

Media = 0,33

Datos Pulpitis Inducida = 27,50; 35,48; 29,17; 20,97; 13,95; 10,84

Media = 22,98

Media de las 2 medias = 11,66

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(0,33 - 11,66)^2 + (22,98 - 11,66)^2}{k-1} = 256,51$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 6 \times 256,51 = 1539,06$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(0,28 - 0,33)^2 + (0,15 - 0,33)^2 + (0,72 - 0,33)^2}{6 - 1} + \frac{(0,30 - 0,33)^2 + (0,35 - 0,33)^2 + (0,17 - 0,33)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(27,50 - 22,98)^2 + (35,48 - 22,98)^2 + (29,17 - 22,98)^2}{6 - 1} + \frac{(20,97 - 22,98)^2 + (13,95 - 22,98)^2 + (10,84 - 22,98)^2}{6 - 1} +$$

$$0,0428 + 89,59 = \frac{89,63}{2} = 44,82$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{1539,06}{44,82} = 34,34$$

34,34 es $\geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y$$

$$N - k = 12 - 1 = 11$$

Si $F \geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 4,84$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpitis Inducida vs. Pulpitis Irreversible

Datos Pulpitis Inducida = 27,50; 35,48; 29,17; 20,97; 13,95; 10,84
Media = 22,98

Datos Pulpitis Irreversibles = 110,68; 162,78; 155,17; 121,20; 252,26; 124,14
Media = 154,37

Media de las 2 medias = 88,68

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S_x^2 = \frac{(22,98 - 88,68)^2 + (154,37 - 88,68)^2}{k-1} = 8631,67$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S_x^2 = 6 \times 8631,67 = 51790,02$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S_1^2 + S_2^2}{2} =$$

$$\frac{(27,50 - 22,98)^2 + (35,48 - 22,98)^2 + (29,17 - 22,98)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(20,97 - 22,98)^2 + (13,95 - 22,98)^2 + (10,84 - 22,98)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(110,68 - 154,37)^2 + (162,78 - 154,37)^2 + (155,17 - 154,37)^2}{6 - 1} +$$

$$\frac{(121,20 - 154,37)^2 + (252,26 - 154,37)^2 + (124,14 - 154,37)^2}{6 - 1} +$$

$$89,59 + 2715,35 = \frac{2804,94}{2} = 1402,47$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{51790,02}{1402,47} = 36,93$$

36,93 es $\geq 4,84$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

4.5. Niveles de Neurokinina A (NKA)

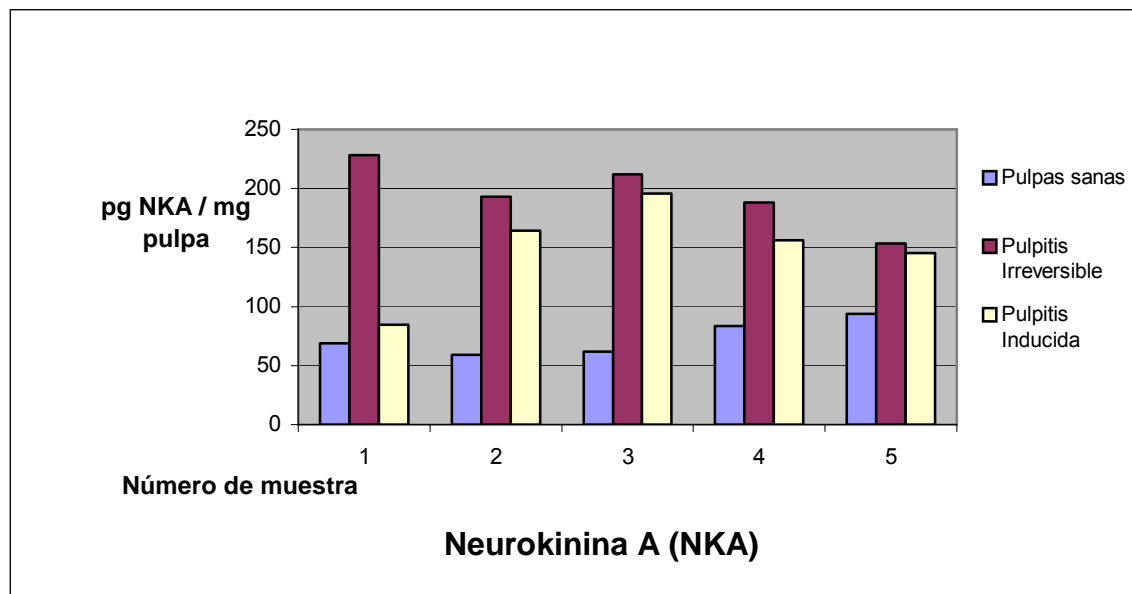
Tabla 4. Niveles de Neurokinina A (NKA)

Pulpa Sana	Pulpitis Irreversible	Pulpitis Inducida
pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa
68,66	228,15	84,55
59,04	192,87	164,08
61,61	212,26	195,62
83,65	188,01	156,02
93,69	153,59	145,30

Media $\chi = 73,33$
Desv. Estándar $\sigma = 13,30$

$\chi = 194,98$
 $\sigma = 25,16$

$\chi = 149,11$
 $\sigma = 36,38$



Gráfica 3. Niveles de Neurokinina A (NKA)

4.5.1. Prueba de contraste U-Test Mann Withney (NKA)

La hipótesis Ho:

El nivel de NKA en pulpas sanas es diferente a pulpas con inflamación ?

El nivel de NKA en pulpitis inducida es diferente que en pulpitis irreversible?

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 25$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,61$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ **Si hay diferencia significativa**

Pulpitis Inducida vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 5$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = -1,56$$

Si cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ **No hay diferencia significativa**

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 24$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,40$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ **Si hay diferencia significativa**

4.5.2. Prueba de contraste – Análisis de varianzas (NKA)

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversibles

Datos Pulpas sanas = 68,66; 59,04; 61,61; 83,65; 93,69.

Media = 73,33

Datos Pulpitis Irreversibles = 228,15; 192,87; 212,26; 188,01; 153,59.

Media = 194,98

Media de las 2 medias = 134,15

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(73,33 - 134,15)^2 + (194,98 - 134,15)^2}{k-1} = 7399,36$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 5 \times 7399,36 = 36996,8$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(68,66 - 73,33)^2 + (59,04 - 73,33)^2 + (61,61 - 73,33)^2 + (83,65 - 73,33)^2 + (93,69 - 73,33)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(228,15 - 194,98)^2 + (192,87 - 194,98)^2 + (212,26 - 194,98)^2 + (188,01 - 194,98)^2 + (153,59 - 194,98)^2}{5 - 1} +$$

$$221,10 + 791,25 = \frac{1012,35}{2} = 506,18$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{36996,8}{506,18} = 73,09$$

73,09 es $\geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y$$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

Datos Pulpas sanas = 68,66; 59,04; 61,61; 83,65; 93,69.

Media = 73,33

Datos Pulpitis Inducida = 84,55; 164,08; 195,62; 156,02; 145,30.

Media = 149,11

Media de las 2 medias = 111,22

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(73,33 - 111,22)^2 + (149,11 - 111,22)^2}{k-1} = 2871,3$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 5 \times 2871,3 = 14356,5$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(68,66 - 73,33)^2 + (59,04 - 73,33)^2 + (61,61 - 73,33)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(83,65 - 73,33)^2 + (93,69 - 73,33)^2}{5 - 1}$$

$$\frac{(84,55 - 149,11)^2 + (164,08 - 149,11)^2 + (195,62 - 149,11)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(156,02 - 149,11)^2 + (145,30 - 149,11)^2}{5 - 1}$$

$$221,10 + 1654,38 = \frac{1875,48}{2} = 937,74$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{14356,5}{937,74} = 15,31$$

15,31 es $\geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula H_0 :

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y \\ N-k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpitis Inducida vs. Pulpitis Irreversible

Datos Pulpitis Inducida = 84,55; 164,08; 195,62; 156,02; 145,30.
Media = 149,11

Datos Pulpitis Irreversibles = 228,15; 192,87; 212,26; 188,01; 153,59.
Media = 194,98

Media de las 2 medias = 172,05

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S_x^2 = \frac{(149,11 - 172,05)^2 + (194,98 - 172,05)^2}{k-1} = 1052,03$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S_x^2 = 5 \times 1052,03 = 5260,15$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S_1^2 + S_2^2}{2} =$$

$$\frac{(84,55 - 149,11)^2 + (164,08 - 149,11)^2 + (195,62 - 149,11)^2 + (156,02 - 149,11)^2 + (145,30 - 149,11)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(228,15 - 194,98)^2 + (192,87 - 194,98)^2 + (212,26 - 194,98)^2 + (188,01 - 194,98)^2 + (153,59 - 194,98)^2}{5 - 1} +$$

$$1654,38 + 791,25 = \frac{2445,63}{2} = 1222,82$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{5260,15}{1222,82} = 4,30$$

4,30 es $\leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula

NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

4.6. Niveles de Neuropeptido Y (NPY)

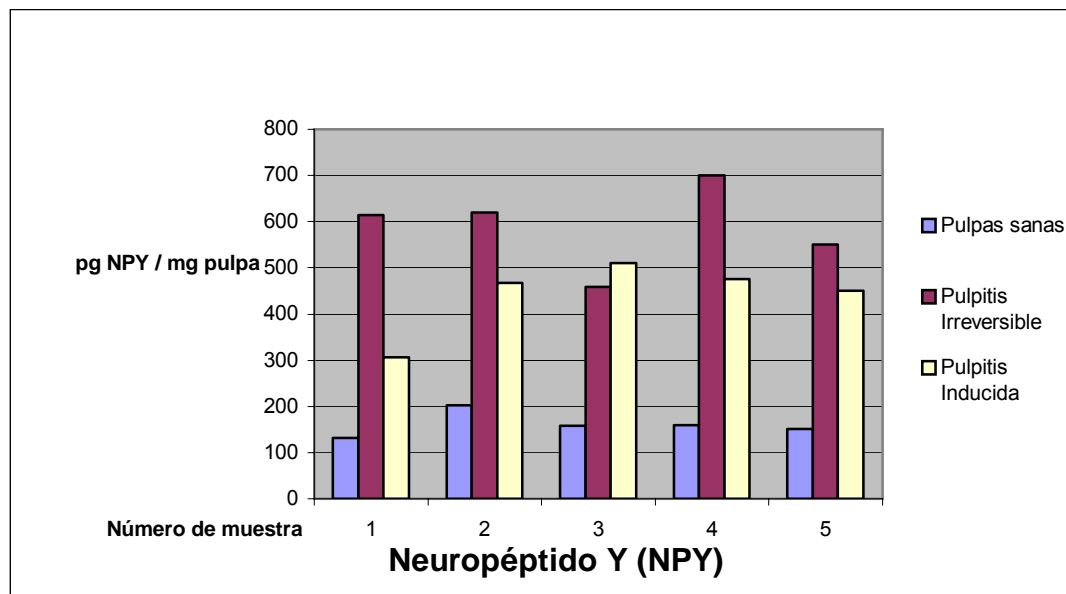
Tabla 5. Niveles de Neuropeptido Y (NPY)

Pulpa Sana pg / mg pulpa	Pulpitis Irreversible pg / mg pulpa	Pulpitis Inducida pg / mg pulpa
131,59	613,70	305,87
202,28	620,15	466,69
157,57	459,21	510,74
159,63	700,00	475,54
150,87	550,11	450,23

Media $\chi = 160,39$
Desv. estándar $\sigma = 23,17$

$\chi = 588,63$
 $\sigma = 80,32$

$\chi = 441,81$
 $\sigma = 70,79$



Gráfica 4. Niveles de Neuropeptido Y (NPY)

4.6.1. Prueba de contraste U-Test Mann Withney (NPY)

La hipótesis Ho:

El nivel de NPY en pulpas sanas es diferente a pulpas con inflamación ?

El nivel de NPY en pulpitis inducida es diferente que en pulpitis irreversible?

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 25$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,61$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ Si hay diferencia significativa

Pulpitis Inducida vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 3$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = -1,98$$

Si cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ Si hay diferencia significativa

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 25$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,60$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ Si hay diferencia significativa

4.6.2. Prueba de contraste – Análisis de varianzas (NPY)

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversibles

Datos Pulpas sanas = 131,59; 202,28; 157,57; 159,63; 150,87.

Media = 160,39

Datos Pulpitis Irreversibles = 613,70; 620,15; 459,21; 700,00; 550,11.

Media = 588,63

Media de las 2 medias = 374,51

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(160,39 - 374,51)^2 + (588,63 - 374,51)^2}{k-1} = 91694,75$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 5 \times 91694,75 = 458473,75$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(131,59 - 160,39)^2 + (202,28 - 160,39)^2 + (157,57 - 160,39)^2 + (159,63 - 160,39)^2 + (150,87 - 160,39)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(613,70 - 588,63)^2 + (620,15 - 588,63)^2 + (459,21 - 588,63)^2 + (700,00 - 588,63)^2 + (550,11 - 588,63)^2}{5 - 1} +$$

$$670,84 + 8064,65 = \frac{8735,49}{2} = 4367,74$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{458473,75}{4367,74} = 104,97$$

104,97 es $\geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y$$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

Datos Pulpas sanas = 131,59; 202,28; 157,57; 159,63; 150,87.
Media = 160,39

Datos Pulpitis Inducida = 305,87; 466,69; 510,74; 475,54; 450,23.
Media = 441,81

Media de las 2 medias = 301,10

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S_x^2 = \frac{(160,39 - 301,10)^2 + (441,81 - 301,10)^2}{k-1} = 39598,61$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S_x^2 = 5 \times 39598,61 = 197993,05$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S_1^2 + S_2^2}{2} =$$

$$\frac{(131,59 - 160,39)^2 + (202,28 - 160,39)^2 + (157,57 - 160,39)^2 + (159,63 - 160,39)^2 + (150,87 - 160,39)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(305,87 - 441,81)^2 + (466,69 - 441,81)^2 + (510,74 - 441,81)^2 + (475,54 - 441,81)^2 + (450,23 - 441,81)^2}{5 - 1} +$$

$$670,84 + 6264,66 = \frac{6935,5}{2} = 3467,75$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{197993,05}{3467,75} = 57,09$$

57,09 es $\geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y$$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulпитis Inducida vs. Pulпитis Irreversibles

Datos Pulпитis Inducida = 305,87; 466,69; 510,74; 475,54; 450,23.
Media = 441,81

Datos Pulпитis Irreversibles = 613,70; 620,15; 459,21; 700,00; 550,11.
Media = 588,63

Media de las 2 medias = 515,22

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(441,81 - 515,22)^2 + (588,63 - 515,22)^2}{k-1} = 10778,06$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 5 \times 10778,06 = 53890,3$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(305,87 - 441,81)^2 + (466,69 - 441,81)^2 + (510,74 - 441,81)^2 + (475,54 - 441,81)^2 + (450,23 - 441,81)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(613,70 - 588,63)^2 + (620,15 - 588,63)^2 + (459,21 - 588,63)^2 + (700,00 - 588,63)^2 + (550,11 - 588,63)^2}{5 - 1} +$$

$$6264,66 + 8064,65 = \frac{14329,31}{2} = 7164,66$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{53890,3}{7164,66} = 7,52$$

7,52 es $\geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

4.7. Niveles de Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)

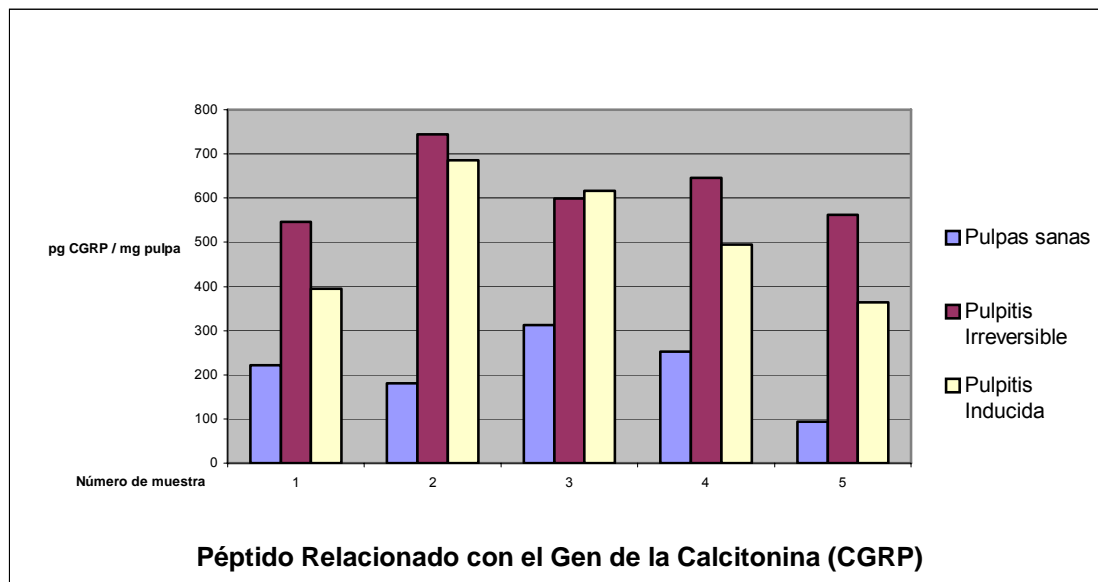
Tabla 6. Niveles de Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)

Pulpa Sana	Pulpitis Irreversible	Pulpitis Inducida
pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa
222,04	545,71	394,38
180,88	744,70	685,06
313,11	598,49	615,83
253,17	645,25	494,36
94,33	562,88	363,54

Media $\chi = 212,71$
Desv. estándar $\sigma = 73,25$

$\chi = 619,41$
 $\sigma = 71,32$

$\chi = 510,63$
 $\sigma = 124,02$



Gráfica 5. Niveles de Péptido Relacionado con el Gen de la Calcitonina (CGRP)

4.7.1. Prueba de contraste U-Test Mann Withney (CGRP)

La hipótesis Ho:

El nivel de CGRP en pulpas sanas es diferente a pulpas con inflamación ?

El nivel de CGRP en pulpitis inducida es diferente que en pulpitis irreversible?

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 25$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,61$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ Si hay diferencia significativa

Pulpitis Inducida vs. Pulpitis Irreversible

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 7$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = -1,15$$

Si cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ No hay diferencia significativa

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

$$U = N1 \times N2 + \frac{N1(N1+1)}{2} - R1 = 25$$

$$\mu v = \frac{N1 \times N2}{2} = 12,5$$

$$\sigma v^2 = \sqrt{\frac{N1 \times N2 (N1 + N2 + 1)}{12}} = 4,79$$

$$z = \frac{U - \mu v}{\sigma v} = 2,61$$

No cumple $-1,96 \leq z \leq 1,96$ Si hay diferencia significativa

4.7.2. Prueba de contraste – Análisis de varianzas (CGRP)

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Irreversibles

Datos Pulpas sanas = 222,04; 180,88; 313,11; 253,17; 94,33.

Media = 212,71

Datos Pulpitis Irreversibles = 545,71; 744,70; 598,49; 645,25; 562,88.

Media = 619,41

Media de las 2 medias = 416,06

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(212,71 - 416,06)^2 + (619,41 - 416,06)^2}{k-1} = 82702,45$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 5 \times 82702,42 = 413512,1$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(222,04 - 212,71)^2 + (180,88 - 212,71)^2 + (313,11 - 212,71)^2 + (253,17 - 212,71)^2 + (94,33 - 212,71)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(545,71 - 619,41)^2 + (744,70 - 619,41)^2 + (598,49 - 619,41)^2 + (645,25 - 619,41)^2 + (562,88 - 619,41)^2}{5 - 1} +$$

$$6707,80 + 6357,57 = \frac{13065,37}{2} = 6532,68$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{413512,1}{6532,68} = 63,29$$

63,29 es $\geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y$$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulpas sanas vs. Pulpitis Inducida

Datos Pulpas sanas = 222,04; 180,88; 313,11; 253,17; 94,33.
Media = 212,71

Datos Pulpitis Inducida = 394,38; 685,06; 615,83; 494,36; 363,54.
Media = 510,63

Media de las 2 medias = 361,67

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(212,71 - 361,67)^2 + (510,63 - 361,67)^2}{k-1} = 44378,16$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 5 \times 44378,16 = 221890,8$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(222,04 - 212,71)^2 + (180,88 - 212,71)^2 + (313,11 - 212,71)^2 + (253,17 - 212,71)^2 + (94,33 - 212,71)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(394,38 - 510,63)^2 + (685,06 - 510,63)^2 + (615,83 - 510,63)^2 + (494,36 - 510,63)^2 + (363,54 - 510,63)^2}{5 - 1} +$$

$$6707,80 + 19226,78 = \frac{25934,58}{2} = 12967,29$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{221890,8}{12967,29} = 17,11$$

17,11 es $\geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula

SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

La hipótesis Nula Ho:

No hay diferencia significativa entre los 2 grupos de datos.

F al nivel 0,05 para $k - 1 = 2 - 1 = 1$

$$y$$

$$N - k = 10 - 1 = 9$$

Si $F \geq 5,12$ Entonces se rechaza la hipótesis nula, quiere decir que SI HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Si $F \leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula, quiere decir que NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA.

Pulпитis Inducida vs. Pulпитis Irreversibles

Datos Pulпитis Inducida = 394,38; 685,06; 615,83; 494,36; 363,54.
Media = 510,63

Datos Pulпитis Irreversibles = 545,71; 744,70; 598,49; 645,25; 562,88.
Media = 619,41

Media de las 2 medias = 565,02

$$1 \text{ Paso. Estimación de } S^2_x = \frac{(510,63 - 565,02)^2 + (619,41 - 565,02)^2}{k-1} = 5916,54$$

$$2 \text{ Paso. Estimación de } \sigma^2 = n \times S^2_x = 5 \times 5916,54 = 29582,7$$

$$3 \text{ Paso. Estimación de } \frac{S^2_1 + S^2_2}{2} =$$

$$\frac{(394,38 - 510,63)^2 + (685,06 - 510,63)^2 + (615,83 - 510,63)^2 + (494,36 - 510,63)^2 + (363,54 - 510,63)^2}{5 - 1} +$$

$$\frac{(545,71 - 619,41)^2 + (744,70 - 619,41)^2 + (598,49 - 619,41)^2 + (645,25 - 619,41)^2 + (562,88 - 619,41)^2}{5 - 1} +$$

$$19226,78 + 6357,57 = \frac{25584,35}{2} = 12792,18$$

$$4 \text{ Paso. } F = \frac{\sigma^2 \text{ con base en } X}{\sigma^2 \text{ con base en varianzas}} = \frac{29582,7}{12792,18} = 2,31$$

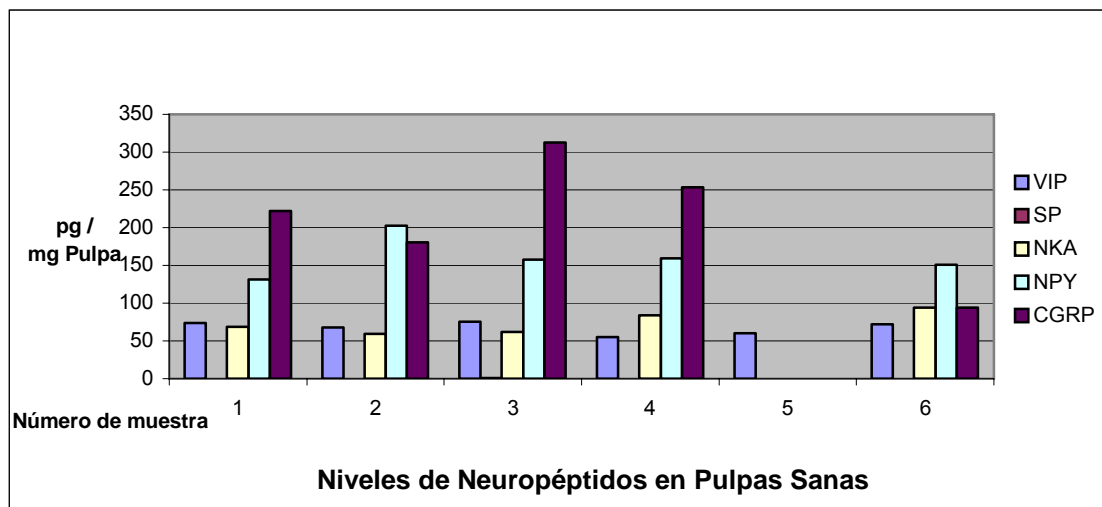
2,31 es $\leq 5,12$ Entonces se valida la hipótesis nula

NO HAY DIFERENCIA SIGNIFICATIVA

4.8. Niveles de Neuropeptidos en pulpas sanas

Tabla 7. Niveles de Neuropeptidos en pulpas sanas

VIP	SP	NKA	NPY	CGRP
pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa
73,47	0,28	68,66	131,59	222,04
67,54	0,15	59,04	202,28	180,88
75,06	0,72	61,61	157,57	313,11
54,71	0,30	83,65	159,63	253,17
59,82	0,35			
72,10	0,17	93,69	150,87	94,33



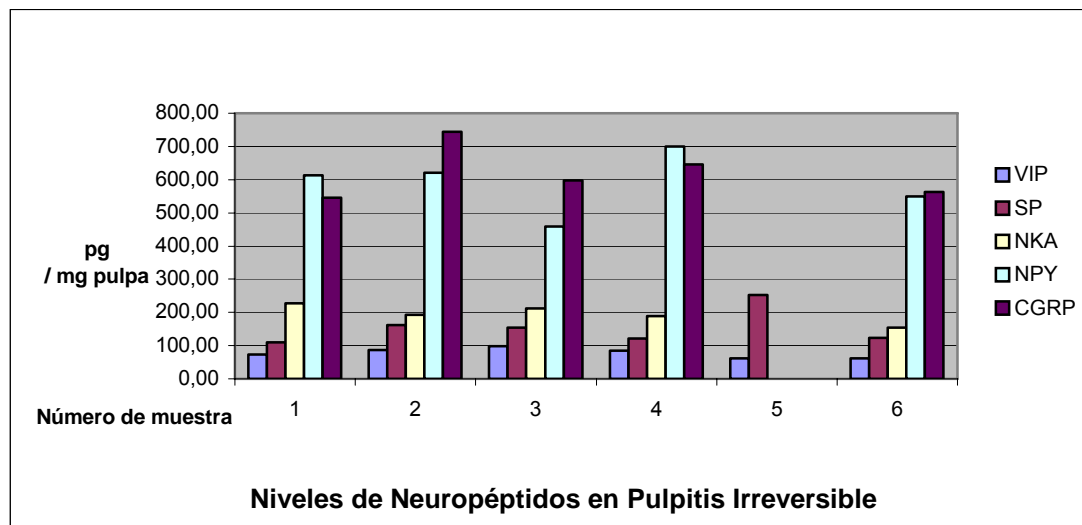
Gráfica 6. Niveles de Neuropeptidos en pulpas sanas

En esta gráfica se pueden observar en forma simultánea y comparativa los niveles de los 5 neuropeptidos cuantificados: Péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P (SP), Neurokinina A (NKA), Neuropeptido Y (NPY) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP); en las 6 muestras de tejido pulpar sano humano.

4.9. Niveles de Neuropeptidos en pulpitis irreversible

Tabla 8. Niveles de Neuropeptidos en pulpitis irreversible

VIP	SP	NKA	NPY	CGRP
Pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa
73,76	110,68	228,15	613,7	545,71
87,23	162,78	192,87	620,15	744,7
98,46	155,17	212,26	459,21	598,49
84,80	121,20	188,01	700,00	645,25
61,00	252,26			
62,52	124,14	153,59	550,11	562,88



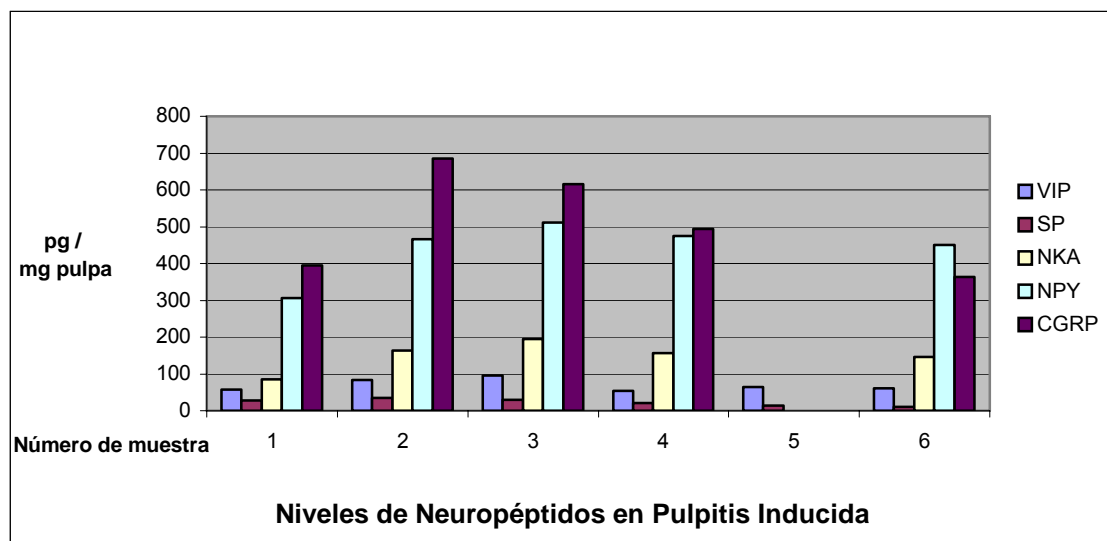
Gráfica 7. Niveles de Neuropeptidos en pulpitis irreversible

En esta gráfica se pueden observar en forma simultánea y comparativa los niveles de los 5 neuropeptidos cuantificados: Péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P (SP), Neurokinina A (NKA), Neuropeptido Y (NPY) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP); en las 6 muestras de tejido pulpar humano, sometidas a inflamación (inflamación inducida).

4.10. Niveles de Neuropeptidos en pulpitis inducida

Tabla 9. Niveles de Neuropeptidos en pulpitis inducida

VIP	SP	NKA	NPY	CGRP
pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa	pg / mg pulpa
57,17	27,50	84,55	305,87	394,38
83,2	35,48	164,08	466,69	685,06
95,27	29,17	195,62	510,74	615,83
53,14	20,97	156,02	475,54	494,36
64,25	13,95			
61,45	10,84	145,3	450,23	363,54



Gráfica 8. Niveles de Neuropeptidos en pulpitis inducida

En esta gráfica se pueden observar en forma simultánea y comparativa los niveles de los 5 neuropeptidos cuantificados: Péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P (SP), Neurokinina A (NKA), Neuropeptido Y (NPY) y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP); en las 6 muestras de tejido pulpar humano, con diagnóstico clínico de pulpitis irreversible aguda.

5. Discusión de resultados

En el numeral 4.1 se observa el protocolo final escogido como el óptimo para la extracción de los neuropéptidos a partir de tejido pulpar. Este método fue elegido a partir de datos bibliográficos y experimentación en el laboratorio, mostrando porcentajes de recuperación muy superiores a los otros dos métodos propuestos. Este método ofrece alta recuperación de los neuropéptidos, ya que comparándolo con los otros procedimientos, es el que protege de la degradación enzimática los péptidos con el uso de inhibidores de proteasas, y además, es un método en el que no se destruye mecánicamente el tejido, sino que en este método se realiza una extracción partiendo del tejido pulpar entero.

Los resultados obtenidos para las curvas de calibración de los radioinmunoanálisis de los 5 neuropéptidos, se pueden observar en el numeral 4.2

Estos resultados fueron obtenidos luego de efectuar variaciones en las cantidades de reactivos para el ensayo, pero fundamentalmente luego de varios experimentos que nos permitieron seleccionar el mejor sistema de precipitación, con el cual separamos las fracciones libres de las unidas en el radioinmunoanálisis.

Observando estos resultados se puede asegurar que se dispone de una excelente técnica analítica cuantitativa para evaluar los niveles de los neuropéptidos en los tejidos pulpares, ya que se alcanzaron unos valores relativamente altos de unión máxima para todos los radioinmunoensayos; con bajos valores de unión no específica; y curvas de calibración, que dentro de las dosis utilizadas de los diferentes estándares, presentaron altos coeficientes de correlación en el sistema Logit-Log, lo que asegura una precisa interpolación de los datos en ellas. Además, en cada ensayo realizado se colocaron por duplicado todos los tubos, y una vez elegido el

sistema de precipitación, se montaron nuevamente 2 curvas de calibración más para cada neuropéptido. Todo esto permite presentar la técnica utilizada, como una técnica de alta precisión y reproducibilidad intra-análisis, alta precisión y reproducibilidad inter-análisis y de alta sensibilidad, característica fundamental de los ensayos radioinmunométricos.

En la tabla número 2 y en la gráfica número 1, se pueden observar los valores de los niveles del péptido vasoactivo intestinal (VIP) presente en los tres tipos de tejido pulpar analizado. Estos resultados muestran al tejido pulpar sano con valores de VIP de 67,12 pg/mg de tejido (desviación estándar 7,48); y el análisis revela que el VIP está ligeramente aumentado en los tejidos con inflamación inducida (69,08 pg/mg pulpa con desviación 15,07), y en los tejidos con diagnóstico de pulpitis irreversible (77,96 pg/mg de pulpa con desviación de 13,52). Sin embargo, realizando los análisis de contraste no paramétrico por medio de la prueba U-test Mann-Whitney, se puede observar que la cantidad de péptido vasoactivo intestinal (VIP) liberada en los tejidos con inflamación inducida e irreversible, es mayor que el contenido en las pulpas sanas, pero no es una diferencia estadísticamente representativa. Realizando la misma prueba estadística entre los grupos de datos obtenidos por las pulpas con inflamación inducida y las pulpas con inflamación irreversible aguda, se observa que tampoco existe una diferencia estadísticamente representativa.

Los resultados del U-test de Mann-Whitney se verificaron por medio de otra prueba estadística, la cual consiste en un análisis de contraste de varianzas, observándose de igual forma que no hay diferencias significativas ni entre pulpas sanas y tejidos con inflamación, ni entre tejidos con pulpitis irreversible aguda y pulpitis inducida.

Esto puede indicar, que el péptido vasoactivo intestinal (VIP), aunque está presente en las terminales nerviosas del tejido pulpar, y aunque es una sustancia que se libera cuando el tejido presenta algún tipo de agresión mecánica o cuando presenta algún tipo de patología, el VIP no es el

neuropéptido que lidere los procesos inflamatorios, debido a que las cantidades que se liberan allí no son significativas con respecto a las cantidades libres de VIP en los tejidos pulpaes sanos (tabla 2).

Además, otra razón que explique la liberación no significativa del VIP, es que de los 5 neuropéptidos analizados, este es el único de origen parasimpático, y aunque está involucrado directamente en procesos de vasodilatación en varios tejidos de distintos organos del cuerpo, a nivel de la pulpa dental el VIP se distribuye en las fibras nerviosas alrededor de los vasos sanguíneos sin penetrar en la dentina (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989). Por esta razón se puede esperar que no exista una gran liberación de este péptido en una pulpa ligeramente agredida mecánicamente, o en una pulpitis irreversible aguda.

La tabla de datos número 3 y la gráfica número 2, muestran la variación en los niveles de la sustancia P (SP) en pulpas humanas sanas, comparándolos con los niveles del péptido en pulpas inducidas a inflamación, y con los niveles alcanzados en pulpas con inflamación aguda irreversible. Es claro en estos resultados, que los niveles de sustancia P son mucho mas bajos en pulpas sanas que en pulpas inflamadas, observándose que las pulpas sanas registran unos niveles de 0,33 pg de SP por miligramo de tejido; mientras que para la pulpitis inducida y la pulpitis irreversible aguda, los valores fueron de 22,98 pg/mg de pulpa y 154,37 pg/mg de pulpa respectivamente. Esto revela que la sustancia P (SP) es un péptido que juega un papel muy importante en la inflamación neurogénica del tejido pulpar humano, puesto que son apreciables las diferencias entre los niveles de pulpas sanas y pulpas inflamadas. Además, según los análisis de contraste U-test de Mann Withney, y análisis de varianzas, se observa que existen diferencias estadísticamente significativas entre los niveles de SP en pulpas sanas contra los niveles en pulpitis inducida, y contra los niveles en pulpitis irreversible. También se observa que existe un aumento

estadísticamente significativo en la pulpitis irreversible aguda con respecto a la pulpitis inducida.

Estos resultados indican claramente que el tejido pulpar ante una agresión reacciona con la liberación de relativamente altas cantidades de SP por parte de las terminales nerviosas; sin embargo, la liberación del neuropéptido no es tan marcada como en la pulpitis irreversible aguda.

Esto puede ser debido a que una pulpitis irreversible aguda del tejido puede posiblemente afectar el sistema de almacenamiento vesicular del neuropéptido, y puede generar algún daño a nivel de membrana celular, lo cual afecta el control sobre los mecanismos de liberación de la sustancia P, obteniéndose grandes cantidades de este neuropéptido, a diferencia de la liberación que se presenta en una pulpitis inducida, donde el tejido y por tanto las terminales nerviosas, las membranas celulares y los sistemas vesiculares de almacenamiento conservan su integridad durante la agresión, produciéndose aumentos controlados de la sustancia P.

Los datos de los valores de la neurokinina A (NKA) se pueden observar en la tabla número 4 y en la gráfica número 3. Estos resultados muestran que los niveles de este neuropéptido se incrementan en un 103,34% (de 73,33 a 149,11 pg/mg de tejido) en la pulpitis inducida con respecto a las pulpas sanas, y en un 165,89% (de 73,33 a 194,98 pg/mg de tejido) en la pulpitis irreversibles con respecto a las pulpas sanas.

Luego de realizar la prueba de contraste U-test de Mann Whitney, se observa que existe diferencia significativa en la liberación de NKA entre las pulpas sanas y las pulpas con inflamación inducida, y también existe esta diferencia entre las pulpas sanas y las pulpas con diagnóstico de inflamación irreversible aguda.

Por otra parte, la prueba reveló, que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades de NKA liberados por las pulpas con inflamación inducida y las liberadas por las pulpas con

inflamación irreversible; aunque la cantidad de NKA liberada en pulpitis irreversible aguda fue un 30,76% mayor que la liberada en pulpitis inducida.

Para confirmar lo anteriormente expuesto, estos datos fueron procesados en un análisis de contraste de varianzas, mostrando los mismos resultados que la prueba U-test de mann Withney.

La tabla número 4 y gráfica número 4 muestran los resultados de los niveles del neuropéptido Y (NPY) . La cantidad del neuropéptido liberado se incrementa en un 175,46% (de 160,39 a 441,81 pg/mg de tejido) en la pulpitis inducida con respecto a las pulpas sanas, y en un 266,99% (de 160,39 a 588,63 pg/mg de tejido) en la pulpitis irreversible aguda con respecto a las pulpas sanas.

Luego de realizar la prueba de contraste U-test de Mann Whitney, y el contraste estafístico a partir del análisis de varianzas, se observa que existe diferencia significativa en la liberación de NPY entre las pulpas sanas y las pulpas con inflamación inducida; también existe esta diferencia entre las pulpas sanas y las pulpas con diagnostico de inflamación irreversible aguda.

Por otra parte, las pruebas revelaron que existe una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades de NPY liberados por las pulpas con inflamación inducida y las liberadas por las pulpas con inflamación irreversible aguda; aunque la cantidad de NPY liberada en pulpitis irreversible aguda fue un 33,23% mayor que la liberada en pulpitis inducida.

La tabla número 6 y la gráfica número 5, muestran los resultados de los niveles del péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) . La cantidad del neuropéptido liberado se incrementa en un 140,06% (de 212,71 a 510,63 pg/mg de tejido) en la pulpitis inducida con respecto a las pulpas sanas, y en un 191,20% (de 212,71 a 619,41 pg/mg de tejido) en la pulpitis irreversibles con respecto a las pulpas sanas.

Luego de realizar la prueba estadística de contraste no paramétrica U-test de Mann Whitney, y la prueba de contraste por análisis de varianzas, se observa que existe diferencia significativa en la liberación de CGRP entre las pulpas sanas y las pulpas con inflamación inducida, y también existe esta diferencia entre las pulpas sanas y las pulpas con diagnóstico de inflamación irreversible aguda.

Por otra parte, las pruebas revelaron, que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las cantidades de CGRP liberados por las pulpas con inflamación inducida y las liberadas por las pulpas con inflamación irreversible; aunque la cantidad de CGRP liberada en pulpitis irreversible aguda fue un 21,30% mayor que la liberada en pulpitis inducida.

De los 5 péptidos analizados en los tejidos pulpares, tres de estos son sensoriales de origen trigeminal: Sustancia P (SP), Péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y Neurokinina A (NKA) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999).

La sustancia P interactúa con los vasos sanguíneos, causando vasodilatación y extravasación de plasma (Olgart, L., et al. 1977) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Byers, M.R. and Narhi, M.V. 1999).

El péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) está relacionado únicamente con los procesos de vasodilatación (Wakisaka, S., et al. 1987) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S., et al. 1985) (Ohkubo, T., et al. 1993) (Gazelius, B., et al. 1987), lo cual se observa claramente con el patrón de liberación en las pulpitis irreversibles agudas y en las pulpitis inducidas con respecto a las pulpas sanas.

La neurokinina A (NKA), es el otro péptido identificado en el tejido pulpar, que presenta efectos similares a los producidos por la sustancia P (SP) (Wakisaka, S., et al. 1988) (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and

Akai, M. 1989) (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999), por esta razón es claro el aumento producido para este neuropéptido en los tejidos pulpaes con inflamación inducida e irreversible aguda analizados; comportamiento en liberación similar al observado para la sustancia P.

Estos tres neuropéptidos están ubicados en las porciones terminales de las fibras nerviosas amielínicas tipo C, las cuales entran y se distribuyen en la pulpa en una estrecha relación con los vasos sanguíneos. Esta razón explica el comportamiento en la liberación por parte de ellos. Para los tres péptidos: CGRP, NKA y SP, se encontraron niveles significativamente superiores en pulpitis irreversible aguda e inducida sobre las pulpas sanas.

De la misma manera se encontraron para los tres péptidos, niveles aumentados en pulpitis irreversible aguda comparados con la pulpitis inducida, donde únicamente para la sustancia P, esta diferencia fue estadísticamente significativa. Este comportamiento similar en liberación de los tres neuropéptidos es coherente, ya que todos se encuentran en los mismos tipos de fibras nerviosas, las cuales están íntimamente relacionadas con la vascularización del tejido pulpar.

En los nervios simpáticos, y proveniente del ganglio cervical superior, el neuropéptido Y (NPY) se distribuye en las fibras nerviosas que están alrededor de los vasos sanguíneos y en la capa odontoblástica y está relacionado con procesos de vasoconstricción (Wakisaka, S. 1990) (Wakisaka, S. and Akai, M. 1989) (Oddman., et al. 1983) (Olgart, L., et al. 1993) (Edwall, B., et al. 1985). De esta manera, aunque este neuropéptido tiene otra ruta de inervación, se explica el aumento en la liberación en ambos tipos de inflamación, precisamente porque las fibras nerviosas que contienen el NPY, alcanzan a tener contacto con los vasos sanguíneos de la pulpa, y tienen íntima relación con la capa odontoblástica; de manera similar a lo que ocurre con las fibras nerviosas tipo C.

En estudios realizados en 1995, el NPY y el VIP no mostraron tener relación dependiente de la concentración sobre la síntesis de DNA, pero se demostró el papel regulatorio en el crecimiento por parte de SP, CGRP y NKA in vitro, lo cual sugiere que estos neuropéptidos sensoriales pueden estar involucrados en el desarrollo pulpar y en la regeneración de un tejido pulpar injuriado (Bongenhielm, U., Haegerstrand, A., Theodorsson, E. and Fried, K. 1995). El comportamiento en la liberación de los neuropéptidos en los tejidos pulpares con inflamación, reveló que el VIP fue el péptido que no mostró aumentos significativos ni en pulpitis inducida, ni en pulpitis irreversible aguda; sin embargo, los mayores aumentos en la liberación se obtuvieron para Sustancia P (SP). Esto sugiere que tanto en pulpitis inducida como en pulpitis irreversible aguda, principalmente la SP, pero también NKA y CGRP, están involucrados en procesos de inflamación tisular, y podrían estar implicados en regeneración de estos tejidos injuriados.

Otros estudios, han demostrado la capacidad del CGRP a concentraciones nanomolares de aumentar en 1.8 veces la expresión de las proteínas BMP-2 (Bone Morphogenetic protein-2) in vitro en células pulpares, asociándolo con la capacidad de formar dentina y por lo tanto de regenerar tejidos duros en el diente (Calland, J.W., Harris, S.E. and Carnes, D.L. 1997). En el presente estudio, el CGRP fue uno de los neuropéptidos que presentó mayor liberación, tanto en inflamación inducida como en inflamación irreversible aguda. Estos resultados, junto con los obtenidos por Calland y colaboradores en 1997, nos permiten sugerir la posibilidad de regeneración de tejidos duros en el diente, principalmente en inflamaciones irreversibles agudas y necrosis pulpar, que son los casos donde se empieza a ver comprometido el tejido dentinal.

Por otra parte, estudios de 1999 demuestran que la pulpa dental es un tejido altamente innervado por neuronas que contienen CGRP y SP, cuyos

niveles son aumentados en los procesos inflamatorios (Buck, S., Reese, K. and Hargreaves, K.M. 1999) (Byers, M.R. and Narhi, M.V. 1999). Estos datos guardan gran similitud con el presente estudio, ya que precisamente SP fue el neuropéptido que presentó mayor liberación en los dos tipos de inflamación, y CGRP fue uno de los que presentó así mismo mayor liberación.

6. Conclusiones

1. El método de extracción con el que se obtuvo una mayor recuperación de los neuropéptidos a partir del tejido pulpar entero, es el que se basa en una extracción con ácido acético 0.5M en ebullición al baño maria por 10 minutos en presencia de un cocktail compuesto por EDTA 1.3mM, Pepstatina 1uM, Leupeptina 1uM como inhibidores de proteasas.; y aunque en algunos protocolos de extracción de neuropéptidos de pulpa dental no hacen uso de los inhibidores de proteasas, es necesaria su utilización, ya que la hidrólisis tanto química como enzimática de los péptidos se acelera en las condiciones de extracción, las cuales infieren un pH bajo y un aumento de temperatura al sistema.

2. Las curvas de calibración obtenidas para los 5 neuropéptidos presentaron porcentajes de unión máxima entre 18,05% (para SP) y 78,69% (para VIP), y porcentajes de unión no específica muy bajos entre 2,00% y 9,33%, a excepción del VIP que presentó una unión no específica de 14,87%; datos que junto a los excelentes coeficientes de correlación para cada una de las curvas de calibración, muestran que los reactivos utilizados en el radioinmunoanálisis conservaron su integridad estructural y funcional a lo largo de los ensayos, lo que indica que el radioinmunoanálisis es una excelente técnica analítica cuantitativa para este tipo de estudios.

3. Para los 5 neuropéptidos se encontraron los niveles mas bajos en pulpas sanas, y los niveles mas altos en los tejidos pulpares con diagnostico clínico de pulpitis irreversible aguda; resultados coherentes con trabajos anteriores y que están de acuerdo con el hecho de que en la pulpitis irreversible aguda, un daño en las terminaciones nerviosas altera los mecanismos de control de la liberación de los neuropéptidos, por lo que se

encuentran en estos tejidos niveles mas altos de ellos, incluso por encima de los niveles presentados en la pulpitis inducida.

4. En los niveles de sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), neurokinina A (NKA) y neuropéptido Y (NPY), se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pulpas sanas y pulpitis inducida; y en ellos mismos se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre pulpas sanas y pulpitis irreversible aguda. Además, Solamente 2 de los neuropéptidos analizados, sustancia P (SP) y neuropéptido Y (NPY), presentaron diferencias significativas entre los tejidos pulpaes con inflamación inducida y los diagnosticados con pulpitis irreversible aguda. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) no presentó diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los tres tipos de tejido pulpar analizado, lo cual indica que de los neuropéptidos analizados en este estudio, es el VIP el que no influye en gran medida sobre la inflamación neurogénica del tejido pulpar.

7. Recomendaciones

Esta tesis “Cuantificación de neuropéptidos involucrados en la inflamación neurogénica del tejido pulpar humano”, es un trabajo de investigación más, en una línea de investigación que además de estar realizando investigación básica en la bioquímica y fisiología de los neuropéptidos, pretende hacer aportes importantes en el campo de la farmacología, para tener acceso al uso de herramientas terapéuticas con el fin de controlar la inflamación neurogénica del tejido pulpar humano.

Por esta razón, luego de estudiar el comportamiento de la liberación de los péptidos que participan en la inflamación del tejido pulpar en pulpitis inducida y en pulpitis irreversible aguda, es necesario hacer estudios bioquímicos y moleculares de los receptores específicos para estos neuropéptidos. Estas investigaciones pueden incluir: Estudios de afinidad de los neuropéptidos a los receptores específicos; Estudios de reactividad cruzada en receptor; Caracterización de los receptores específicos en las distintas células presentes en el tejido pulpar; Caracterización de los receptores en los diferentes estados de desarrollo del tejido pulpar; Estudios de antagonismo farmacológico en receptores; y Estudios farmacológicos de terapia anti-inflamatoria in vivo en modelos de experimentación animal.

8. Bibliografía

Ahmed, M., Bjurholm, A., Theodorsson, E., Schultzberg, M., and Kreicbergs, A. 1995. Neuropeptide Y- and vasoactive intestinal polypeptide-like immunoreactivity in adjuvant arthritis: effects of capsaicin treatment. *Neuropeptides*. Jul;29(1):33-43

Ahmed, M., Srinivasan, G.R., Theodorsson, E. Bjurholm, A., and Kreicbergs, A. 1994. Extraction and quantitation of neuropeptides in bone by radioimmunoassay. *Regul Pept*. May 26;51(3):179-88

Amara, S.G., and Kuhan, M.J. (1993) Neurotransmitter transporters: Recent progress. *Annu Rev Neurosci*. 16:73-93

Anneroth, G., and Nordenberg, K. 1968. Adrenergic vasoconstrictor innervation in the human dental pulp. *Acta Odonto Scand*; 26: 89-93

Avery, J. (1971) Structural elements of the young normal human pulp. *Oral surg*; 32: 113-116

Avery, J., et al. (1980) Presence and location of adrenergic nerve endings in the dental pulps of mouse molars. *Anat Rec*; 59: 198

Awawdeh, L., Lundy, F.T., Shaw, C., Lamey, P.J., Linden, G.F., and Kennedy, J.G. 1999. A comparison of four extraction methods for substance P, neurokinin A and calcitonine gene-related peptide from human dental pulp tissue. *Arch Oral Biol*. Dec;44(12):999-1004

Awawdeh, L., Lundy, F.T., Linden, G.F., Shaw, C., Kennedy, J.G., and Lamey, P.J. 2002. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonine gene related peptide in gingival crevicular fluid associated with painful human teeth. *Eur J Oral Sci*. 110: 185-191

Awawdeh, L., Lundy, F.T., Shaw, C., Lamey, P.J., Linden, G.F., and Kennedy, J.G. 2002. Quantitative analysis of substance P, neurokinin A and calcitonine gene related peptide in pulp tissue from painful and healthy human teeth. *International Endodontic Journal*. 35: 30-36

Barinaga, M. (1993) Secrets of secretion revealed. *Science*. 260: 487-489

Baxter, J. and Adamik, R. 1983. Differences in requirements and actions of various histamine-releasing agents. *Biochem Pharmacol*. 27: 497-503

- Byers., et al. 1988. Inflammation of the rat molar pulp and periodontium causes increased calcitonine gene related peptide and axonal sproting. *The anatomical Record*. 22: 289-300
- Bender,I. (1978) Pulp biology conference: A discussion. *J of Endod*; 4: 37-74
- Bhoola, K.D., Figueroa, C.D., and Worthy K. 1992. Bioregulation of kinins: Kallikreins, kininogens and kininases. *Pharmacol. Rev.* 44: 1-80
- Bilotto, G., et al. (1987) Experimental procedureds to test the efficacy of chemical agents in altering intradental nerve activity. *J of Endod*; 13: 459-465
- Bolton, A.E. and Hunter, W.M. 1973. *Biochem J.* 133: 529
- Bongenhielm, U., Haegerstrand, A., Theodorsson, E., and Fried, K. 1995. Effects of neuropeptides on growth of cultivated rat molar pulp fibroblasts. *Regul Pept.* Dec 14;60(2-3):91-8
- Bradford, H. 1988. Fundamentos de neurobioquímica. Editorial Labor. Barcelona-España. Pg 259-263
- Brain, S.D. 1985. Calcitonine gene related peptide is a potent vasodilatator. *Nature.* 313: 54-56
- Bredkjoer, H.E., Palle, C., Ekblad, E., Fahrenkrug, J., and Ottesen, B. 1997. PreproVIP-derived peptides in human female genital tract: Expression an biological function. *Neuropeptides.* Jun;31(3):209-15
- Buck, S., Reese, K., and Hargreaves, K.M. 1999. Pulpar exposure alters neuropeptide levels in inflamed dental pulp and trigeminal ganglia: evaluation of axonal transport. *J Endod.* Nov; 25(11):718-21
- Byers, M. 1990. Effects on injury and inflammation on pulp and periapical nerves. *J. of Endod.* 16: 78-84
- Byers, M.R., and Narhi, M.V. 1999. Dental injury models: experimental tools for understanding neuroinflammatory interactions and polymodal nociceptor functions. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10(1):4-39
- Calixto, J., Cabrini, D., Ferreira, J., and Campos, M. 2000. Kinins in pain and inflammation. *Pain.* 87:1-5
- Calland, J.W., Harris, S.E., and Carnes, D.L. 1997. Human pulps cells respond to calcitonine gene-related peptide in vitro. *J. of Endod.* Aug;23(8):485-9

Cerda-Reverter, J.M. and Larhammar, D. 2000. Neuropeptide Y family of peptides: structure, anatomical expression, function and molecular evolution. *Biochem. Cell. Biol.* 78: 371-92

Chang, M., Leeman, S and Niall H.D. 1971. Amino-acid sequence of substance P. *Nature New Biol.* 232: 86-87

Chard, T. 1990. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology: an introduction to radioimmunoassay and related techniques. Elsevier, 4th edition. Amsterdam.

Charlton, C.G., and Helke, J. 1985. Autoradiographic localization and characterization of spinal cord substance P binding sites: high densities in sensory, autonomic, phrenic, and Onuf's motor nuclei. *J. Neurosci.* 5: 1653-1661

Cohen, S., and Burns, R. 1994. Pathways of the pulp. Sixth edition. C.V. Mosby: 313-333

Couture, R. and Regoli, D. 1981. Inactivation of substance P and its C-terminal fragments in rat plasma and its inhibition by captopril. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 59: 621-625

Di-Bona, G. 2002. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* Mar, 282(3): R635-6

Ding, Y.Q., Shigemoto, R., Takada, M., Ohishi, H., Nakanishi, S., and Mizuno, N. 1996. Localization of the neuromedin K receptor (NK3) in the central nervous system of the rat. *J. Comp. Neurol.* 364: 290-310

Edwall, B. et al. 1985. Neuropeptide (NPY) and sympathetic control of the blood flow in oral mucosa and dental pulp in the cat. *Acta Physiol Scand.* 125:253-264

Eedy, D.J., Shaw, C., Johnston, C.F, and Buchanan, K.D. 1994. The regional distribution of neuropeptides in human skin as assessed by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography. *Clin Exp Dermatol.* Nov;19(6):463-72

El-Karim, F.T., Lundy, G.J., Linden, P.J., and Lamey, J. 2003. Extraction and radioimmunoassay quantitation of neuropeptide Y (NPY) and vasoactive intestinal polypeptide (VIP) from human dental pulp tissue. *Arch Oral Biol.* 48:249-254

Foreman, J. and Jordan, C. 1983. Histamine release and vascular change induced by neuropeptides. *Agents Action*. 13: 105-116

Freund, J. and Simon, G. 1994. Estadística elemental. Prentice-Hall. Mexico D.F, Mexico. pg. 384-402, 482-594.

Fristad, I., Jacobsen, E.B., and Kvinnsland, I.H. 1998. Coexpression of vasoactive intestinal polypeptide and substance P In reinnervating pulpal nerves and in trigeminal ganglion neurons after axotomy of the inferior alveolar nerve in the rat. *Arch Oral Biol*. Mar;43(3):183-9

Gazelius, J. 1981. Depletion of substance P-like immunoreactivity in the cat dental pulp after antidromic stimulation. *Acta Physiol Scand*. 111: 319-327

Gazelius, B. et al. 1987. Vasodilatory effects and coexistence of calcitonine gene related peptide (CGRP) and substance P in sensory nerves of the cat dental pulp. *Acta Physiol Scand*. 130:33-40

Geoffrey, A. and Araujo, O. 1993. Capsaicin: Identification, nomenclature and pharmacotherapy. *Ann. Pharmacother*. 27: 330-336

Geppeti, P. 1993. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul. Pept*. 47: 1-23

Grant, D.S. and Zukowska, Z. 2000. revascularization of ischemic tissues with SIKVAV and neuropeptide Y. *Ad. Exp. Med. Biol*. 476: 139-54

Guard, S. and Watson, S. 1991. Tachykinin receptor subtypes: classification and membrane signaling mechanisms. *Neurochem. Int*. 18: 149-165

Guyton. 1992. Tratado de fisiología médica. Ed. Interamericana-Mac graw Hill. Barcelona-España. pg 502-517

Gyorfi, A., Fazekas, A., Irmes, F., Jakab, G., Suto, T., and Rosivall, L. 1993. Role of substance P (SP) in the development of symptoms of neurogenic inflammation in the oral mucosa of the rat. *Journal of Periodontal Research*. 28: 191-6

Hall, J.M., and Morton, I.K.M. 1997. The pharmacology and immunopharmacology of kinin receptors. In: Farmer SG, editor. The handbook of immunopharmacology: the kinin system. London: Academic Press. pp. 9-43

Helke, C., Neil, J., Massari, J., and Loewy, D. 1990. Substance P neurons project from the ventral medulla to the intermediolateral cell column and ventral horn in the rat. *Brain Res.* 243: 147-152

Heyeraas, K.J., and Berggreen, E. 1999. Interstitial fluid pressure in normal and inflamed pulp. *Crit Rev Oral Biol Med.* 10(3):328-36

Hosoi, G.F. 1993. Regulation of Langerhans cell function by nerves containing calcitonine gene related peptide. *Nature.* May 13; 363: 159-162

Hunter, W.A. 1971. Radioimmunoassay Methods. p.3, Churchill Livingstone, Edimburgh-U.K

Kandel, R., Jessel, T., and Schwartz, J. (2000). Essentials of neural science and behavior Appleton and lange. Prentice Hall. Madrid.

Kim, S. (1985) Microcirculation of the dental pulp in health and disease. *J of Endod;* 11: 465-471

Kim, S., et al. Biphasic pulp blood flow rspnse to substance P in the dog as measured with a radiolabeled microsphere injection method. *Arch. Oral Biol.* 33: 305-309

Kim,S. 1990. Neurovascular interaction in the dental pulp in health and inflammation. *J of Endod;* 16: 48-53

Konttinen, Y. 1996. Neuropeptides and the puzzle of bone remodeling. *Acta Orthop. Scand.* 67(6): 632-639

Kupfermann, I. (1991) Functional studies of co-transmission. *Physiol Rev.* 71: 683-732

Lee,J.N.H (1991). Molecular approaches to drug abuse research. Neurotransmitter expression and molecular genetics. Research monograph 111. Rockville, Md., National Institute on Drug abuse.

Lundell, I., et al. 1995. Cloning of a human receptor of the NPY receptor family with high affinity for pancreatic polypeptide and peptide YY. *J. Biol. Chem. Dec 8;* 270(49): 29123-8

Luthman, J. et.al. 1992. Ocurrance and distribution of different neurochemical markers in the human dental pulp. *Arch Oral Biol.* 37:193-208

Macsai, M., Szabo, G., and Telegdy, G. 1998. Vasoactive intestinal polypeptide induces analgesia and impairs the antinociceptive effect of morphine in mice. *Neuropeptide*. Dec;32(6):557-62

Maggi, C.A. and Schwartz, T.W. 1997. The dual nature of the tachykinin NK₁ receptor. *Trends Pharmacol. Sci.* 18: 351-355

Maggi, C.A., Giachetti, A., Dey, R.D. and Said, S.I. 1995. Neuropeptides as regulators of airway function: vasoactive intestinal peptide and the tachykinins. *Physiol. Rev.* 75: 277-322

Manaker, S., and Zucchi, P.C. 1998. Autoradiographic localization of neurotransmitter binding sites in the hypoglossal and motor trigeminal nuclei of the rat. *Synapse*. 28: 44-59

Marceau, F., and Bachvarov, D.R. 1998. Kinin receptor. *Clin. Rev. Allergy. Inflamm.* 16: 385-401

Marceau, F., Hess, J.F., and Bachvarov, D.R. 1998. The B1 receptors of kinins. *Pharmacol. Rev.* 50: 357-386

Marini, M. and Roda, L.G. 2000. Neuropeptide enzyme hydrolysis in human saliva. *Arch. Oral Biol. Sep*; 45(9): 775-86

Markowitz, K., et al. 1988. Intradental nerves and pulpal blood flow measured by a laser doppler flowmeter. *J.Dent. Res.* 67: 215

Matthews, B. (1977) Responses of intradental nerves to electrical and thermal stimulation of teeth in dogs. *J Physiol*; 264: 641-664

Matthews., et al. 1980. The course of postganglionic sympathetic fibres distributed with the trigeminal nerve of the cat. *J Physiol*; 303: 391-401

Michel, M.C. and Rascher, W. 1995. Neuropeptide Y: a possible role in hypertension. *J. Hypertens.* Apr; 13(4): 385-395

Moos, A., Dalrymple, G.V. and Boyd, C.M. 1982. Radioinmunoensayo práctico, primera edición, Editorial Reverté, pp 1-46

Mukohyama, H., Ransjo, M., Taniguchi, H., Ohyama, T., and Lerner, U.H. 2000. The inhibitory effects of vasoactive intestinal peptide and Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide on Osteoclast formation are associated with upregulation of osteoprotegerin and downregulation of RANKL and RANK. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 29; 271(1):158-163

- Nakanishi, S. 1991. mammalian tachykinin receptors. *Annu. Rev. Neurosci.* 14: 123-136
- Norevall, L.I., Matsson, L., and Forsgren, S. 1998. Main sensory neuropeptides, but not VIP and NPY, are involved in bone remodeling during orthodontic tooth movement in the rat. *Ann NY Acad Sci.* Dec 11;865:353-9
- Norhi, M., et al. 1982. Conduction velocities of single pulp nerve units in the cat. *Acta Physiol. Scand.* 116: 209-213
- Oddman, et al. 1983. Neuropeptide Y: Occurrence and distribution in dental pulp. *Acta Odontol Scand.* 38:361-365
- Ohkubo, T. Et al. 1993. Role of substance P in neurogenic inflammation in the rat incisor pulp and the lower lip. *Arch Oral Biol.* 38: 151-158
- Olgart, L. 1974. Excitation of intradental sensory units by pharmacological agents. *Acta Physiol Scand*; 92: 48-55
- Olgart, L. et.al. 1977. Release of substance P-like immunoreactivity from the dental pulp. *Acta Physiol Scand.* 101:501-512
- Olgart, L., et al. 1989. Neurogenic mediators in control of pulp blood flow. *J. Endod.* 15: 409-412
- Olgart, L. et al. 1993. Cat dental pulp after denervation and subsequent re-innervation: changes in blood flow affinity regulation and distribution of neuropeptide. *Brain Res.* 625:109-119
- Olgart, L. 1994. Nerve pulp interaction. *Arch. Oral Biol.* 39(suppl): 47S-57S
- Patton, K. 1998. Anatomía y fisiología. Ed. Hacourt-Brace. Barcelona-España.
- Payan, D. 1984. Substance P recognition by a subset of human T lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 74: 1532-1539
- Payan, D. 1989. Neuropeptides and inflammation: the role of substance P. *Ann. Rev. Med.* 40: 341-352
- Pernow, B. Substance P. *Pharmacol. Rev.* 35: 85-141
- Pesquero, J.B., and Bader, M. 1998. Molecular biology of the kallikrein-kinin system: from structure to function. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 31: 1197-1203

Provenza, D. et al. (1958) The blood vascular supply of the dental pulp with emphasis on capillary circulation. *Circular Res*; 6: 213-218

Rapp, R., et al. 1977. Ultrastructure of fenestrated capillaries in human dental pulps. *Arch Oral Biol*; 22: 317-319

Regoli, D., and Barabé, J. 1980. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol. Rev.* 32:1-46

Reubi, J.C., Horisberger, U., Kappeler, A., and Laissue, J.A. 1998. Localization of receptors for vasoactive intestinal peptide, somatostatin and substance P in distinct compartments of human lymphoid organs. *Blood*. Jul 1;92(1):191-7

Rocha e Silva, M., Beraldo, W.T., and Rosenfeld, G. 1949. Bradykinin, a hypotensive and smooth muscle stimulating factor release from plasma globulin by snake venoms and by trypsin. *Am. J. Physiol.* 156: 261-273

Rossell, S. et al. 1981. Inhibition of anidromic and substance P induced vasodilatation by substance antagonist. *Acta Physiol Scand.* 111:381-382

Wakisaka, S., et al. 1985. The distribution and the origin of substance P-like immunoreactivity in rat molar pulp and periodontal tissues. *Arch Oral Biol.* 30:813-

Seltzer, S., and Bender, I. 1987. The dental pulp. Three edition. Ed Lippincott Company: 99-123-815

Steiner, D.F., Smeekens, S.P., Ohagi, S., and Chan, S.J. (1992) The new enzymology of precursor processing endoproteases. *J Biol Chem.* 267: 23435-23438

Ten, A. (1989) Oral histology: development, structure and function. 3^o ed. C.V. Mosby Company: 157-198

Tonder, K., et al. 1978. Nervous control of the blood flow in the dental pulp in dogs. *Acta Physiol Scand*; 104: 13-23

Trantor, I.R., Mecer, N.H., and Birner, R. 1995. The effects of neuropeptides calcitonine gene related peptide and substance P on cultures human pulp cells. *J Dent Res.* Apr; 74(4):1066-71

Uddman, R. 1999. Expression of calcitonine gene related peptide-1 receptor mRNA in human tooth pulp and trigeminal ganglion. *Arch. Oral Biol.* 44: 1-6

Wakisaka, S., et al. 1984. substance P-like immunoreactivity in the pulp dentine border zone of human molar teeth demonstrated by indirect immunofluorescence. *Arch. Oral Biol.* 24: 73-75

Wakisaka, S., et al. 1985. The distribution and the origin of substance P-like immunoreactivity in rat molar pulp and periodontal tissues. *Arch. Oral Biol.* 30: 813-815

Wakisaka, S. Et al. 1987. The distribution and origin of calcitonine gene related peptide containing nerve fibres in feline dental pulp: relationship with substance P containing nerve fibres. *Histochemistry.* 86:585-589

Wakisaka, S. et al. 1988. Neurokinine A-like immunoreactivity in feline dental pulp: Its distribution, origin and coexistence with substance P-like immunoreactivity. *Cell Tissue Res.* 251:565-569

Wakisaka, S., and Akai, M. 1989. Immunohistochemical observation on neuropeptides around the blood vessel in feline dental pulp. *J Endod.* 15:413

Wakisaka, S. 1990. Neuropeptides in the dental pulp: Their distribution, origins and correlation. *J of Endod;* 16: 167

Wettstein, J.C., Earley, B. and Junien, J.L. 1995. Central nervous system pharmacology of neuropeptide Y. *Pharmacol. Ther.* Mar; 65(3): 397-414

Yalow, R.S., Berson, S.A. 1960. Immunoassay of endogenous plasma insulin in man. *J Clin Invest.* 39: 1157

Zukowska-Grojec, Z. 1995. Neuropeptide Y: a novel sympathetic stress hormone and more. *Ann. N-Y. Acad. Sci.* Dec; 29: 771219-33