

Efecto antiinflamatorio de apitoxina de *Apis mellifera* sobre prostaglandina E₂ del fluido crevicular gingival de pacientes con y sin enfermedad periodontal, sometidos a apiterapia: ensayo preliminar

Anti-inflammatory effect of apitoxin and *Apis mellifera* on prostaglandin E₂ in gingival crevicular fluid of patients with and without periodontal disease, submitted to apitherapy: preliminary test

Faúndez Poblete W¹, Narváez Carrasco CG², Burgos Arias A³

RESUMEN

Introducción: La apitoxina que es producida por la *Apis mellifera* posee efecto antiinflamatorio sobre una serie de marcadores biológicos. La prostaglandina E₂ forma parte de ellos, estando presente en el fluido gingival crevicular (FGC). La prostaglandina E₂ es evidenciada en la enfermedad periodontal. **Objetivo:** En este estudio se evaluó el efecto antiinflamatorio de la apitoxina sobre la concentración de prostaglandina E₂ del FGC de un paciente sin enfermedad periodontal (SEP) y otro con enfermedad periodontal (CEP). **Materiales y Método:** Se seleccionó un paciente SEP y otro CEP, que sometidos a apiterapia durante 28 días, se registraron 5 muestras por paciente de FGC, siendo almacenadas, centrifugadas y refrigeradas para su conservación. Posteriormente se midió la concentración de prostaglandina E₂ crevicular mediante inmunodifusión radial simple en placas petri con concentración de anticuerpo anti prostaglandina E₂ de 1:1000. Selladas a 4°C, se esperó 72 horas para permitir su difusión, tiñéndose con Azul brillante de Coomassie, determinándose la concentración de cada placa. **Resultados:** Paciente SEP inmediatamente antes de apiterapia presentó una concentración de 0.9636 ± 0.0055 (µg/µL), finalizando con una concentración de 0.9196 ± 0.0733 (µg/µL) al completar 28 días de tratamiento. El paciente CEP antes de recibir apiterapia presentó una concentración de 1.1866 ± 0.0867 (µg/µL), finalizando con una concentración de 0.9858 ± 0.0074 (µg/µL) al completar 28 días de tratamiento. **Discusión:** Los hallazgos de este estudio demuestran una disminución de la concentración de PGE₂ del FGC tanto para el paciente CEP y SEP sometidos a apiterapia durante 28 días, siendo esta disminución 3.7 veces mayor en el paciente CEP.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 4(2); 64-68, 2011.

Palabras clave: Enfermedad periodontal (EP), inmunodifusión radial simple (IDRS), apiterapia, apitoxina, fluido gingival crevicular (FGC), prostaglandina E₂ (PGE₂).

ABSTRACT

Introduction: Apitoxin, which is produced by *Apis mellifera*, has anti-inflammatory effect on a number of biomarkers. Prostaglandin E₂ is one of them, being present in gingival crevicular fluid (GCF). Prostaglandin E₂ is evidenced in periodontal disease. **Objective:** This study evaluated the anti-inflammatory effect of apitoxin on concentration of prostaglandin E₂ FGC in a patient with no periodontal disease (SEP) and other with periodontal disease (CEP). **Materials and Methods:** We selected both a SEP and CEP patient who were subjected to apitherapy for 28 days. There were 5 samples per patient of FGC, being stored, centrifuged and refrigerated for their preservation. Subsequently, the concentrations of crevicular prostaglandin E₂ were measured by simple radial immunodiffusion in petri dishes with antibody concentration of prostaglandin E₂ of 1:1000. Sealed at 4 °C, after 72 hours to allow diffusion, they were stained with Coomassie Brilliant Blue, determining the concentration of each plate. **Results:** SEP patient immediately before apitherapy presented a concentration of 0.9636 ± 0.0055 (g / mL), ending with a concentration of 0.9196 ± 0.0733 (g / mL) upon completion of 28 days of treatment. CEP patient before receiving apitherapy showed a concentration of 1.1866 ± 0.0867 (g/mL), ending with a concentration of 0.9858 ± 0.0074 (g/mL) upon completion of 28 days of treatment. **Discussion:** The findings of this study show a decrease in the concentration of PGE₂ of FGC both for the CEP and SEP patient subjected to apitherapy for 28 days, being this decrease 3.7 times higher in the CEP patient.

Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral Vol. 4(2); 64-68, 2011.

Key words: Periodontal disease, simple radial immunodiffusion, apitherapy, apitoxin, gingival crevicular fluid, prostaglandin E₂.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad periodontal (EP) corresponde a un grupo de desórdenes localizados que afectan los tejidos que soportan y rodean los dientes, conocido como periodonto⁽¹⁾. Según Armitage⁽²⁾ este grupo de desórdenes, conocido como la gingivitis y periodontitis, son condiciones o estados inflamatorios.

De acuerdo a los datos reunidos por Organización Mundial de la Salud, en más de 35 países, revelan que la prevalencia de las enfermedades periodontales es superior al 75% entre las personas de 35 a 44 años. En la región metropolitana en Chile, la prevalencia de EP en

los individuos de 35-44 años es de 98.78%, y de 100% en los individuos de 65-74 años⁽³⁾.

La gingivitis y la periodontitis según Van Dyke y cols⁽⁴⁾, serían enfermedades de origen bacteriano específico, que desencadenan una reacción local inflamatoria sobre los tejidos circundantes al diente⁽⁵⁾.

La PGE₂ corresponde a un metabolito del ácido araquidónico, producto de la estimulación del eje monócito-macrófago el que desencadena una liberación local de PGE₂⁽⁶⁾. Su función es mediar la respuesta inflamatoria, contribuyendo positivamente, ya que mantiene el foco infeccioso localizado e incrementa el arribo de células de defensa del huésped. Sin embargo posee efectos adversos, en caso de

1. Licenciado en Odontología. Facultad de Odontología, Universidad del Desarrollo. Concepción, Chile.

2. Tutor de Tesis. Bioquímico. Magíster en Educación Superior. Académica de la Facultad de Odontología, Universidad del Desarrollo. Concepción, Chile.

3. Tutor de Tesis. Biólogo Marino. Magíster en Ciencias. Master en Estudio Biológico-Naturista y Homeopatía. Académico de la Facultad de Odontología, Universidad del Desarrollo. Concepción, Chile.

encontrarse en concentraciones exageradas elevadas, desencadenando una elevación de la destrucción tisular⁽⁷⁾. Este biomarcador, la PGE₂, ha sido encontrado en el FGC. Dicho fluido ha sido postulado por diversas investigaciones como una herramienta de estudio para la EP⁽⁸⁾. El FGC es un líquido obtenido del flujo de la filtración capilar de los vasos sanguíneos y linfáticos subyacentes al epitelio de unión y surcular principalmente^(6,9).

Los antiinflamatorios pueden ser clasificados de acuerdo a su origen: natural y sintéticos o farmacológico. Uno de estos agentes de origen natural es el veneno de abejas o también denominado apitoxina, sustancia producida por el complejo sistema endocrino ubicado en el abdomen de la abeja en un par de glándulas que generan secreciones.

De acuerdo a Salamanca y cols⁽¹⁰⁾, la aplicación a bajas concentraciones de veneno, explican el comportamiento antiinflamatorio de esta sustancia.

De acuerdo a Brochetto-Braga y cols⁽¹¹⁾, el veneno de *Apis mellifera* está compuesto por péptidos como la melitina, apamina, MCD, péptido 401, entre otros; y enzimas como la fosfolipasa A₂ y hialuronidasa, causantes de la acción antiinflamatoria⁽¹²⁾.

Actualmente no existe un consenso general sobre un responsable específico de la acción antiinflamatoria. Sin embargo, el pool de componentes serían los responsables de inhibir la inflamación.

En este estudio se pretende estudiar el efecto antiinflamatorio de la apitoxina de *Apis mellifera* a nivel bioquímico, utilizando para ello como modelo la enfermedad periodontal y como marcador antiinflamatorio la prostaglandina E₂ que se encuentra en el FGC.

El objetivo de este estudio es evaluar el efecto de Apitoxina de *Apis mellifera* sobre la concentración de PGE₂ del FGC de un paciente periodontalmente sano y otro con enfermedad periodontal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Según el enfoque de investigación el estudio que se realizó fue de tipo cuantitativo de diseño cuasi experimental.

Los materiales utilizados para este estudio fueron: perforador artesanal de 4.5 mm de diámetro, micro pipetas (Brand, 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1.000 µL), placas petri de vidrio 9 cm de diámetro (Petri), pie de metro 150 x 0.02 mm (Uyustools, Lot No. MT-00851), tubos Eppendorf de 1.5 ml (Eppendorf), pesa digital Chyo JK-180 sensibilidad de 1.000 µg (Schott), Orbital Shaker OS-20 (Boeco), termómetro digital sensibilidad de un decimal (VWR, Lot No. 61220-416), sonda Carolina del norte (Hu-Friedy), material de examen odontológico.

Los reactivos utilizados para este estudio fueron: hidróxido de Sodio (NaOH) 0.1 N (Scharlau, Lot No. SO0425), ácido clorhídrico (HCl) 0.1 N (Merck, Lot No. 109973), tampón barbital-HCl 0.1 M pH 8.6, azul brillante de Coomassie (Merck, Lot No. 1154440025), Prostaglandina E₂ PGE₂ (Calbiochem, Lot No. D00086082), agarosa para electroforesis al 2.5% (Merck, Lot No. 1012360100), polietilenglicol 6000 PGE6000 (Merck, Lot No. 54743891704), anticuerpo anti prostaglandina E₂ de conejo AcaPGE₂ (Sigma, Lot No. 063K4817), agua bidestilada esteril (Vimaroni, Lot No. O02022010), Azida Sódica (Winkler, Lot No. WE31616), Albumina Suero Bovina (BSA) (Loba Chemie PVT. LTD, Lot No. G199207).

Se seleccionaron 2 pacientes adultos interesados en comenzar un tratamiento apiterapeuta, que cumpliendo con los criterios de inclusión y exclusión, aceptaron participar en el estudio. Se citó a estos pacientes a un examen clínico oral en la clínica odontológica de la Universidad del Desarrollo de Concepción, donde se registraron sus datos en la primera página de la ficha clínica del ramo de rehabilitación oral adultos y se procedió a llenar la primera página de la ficha clínica periodontal de la asignatura de periodoncia, por medio de la información arrojada por el sondaje periodontal, en donde se utilizó la sonda periodontal Carolina del Norte. Se estableció en una medición ≥ 4 mm de profundidad de sondaje para definir saco periodontal. De esta manera se logró seleccionar un paciente en estadio avanzado de la enfermedad y a un paciente sano, utilizado como control, que clínicamente no presentaba indicios de inflamación gingival ni pérdida de inserción periodontal. Se les explicó el propósito de la investigación, y los procedimientos que se realizarían y se les solicitó la firma del consentimiento informado de acuerdo con las normas éticas de la Declaración de Helsinki de 2000.

Los criterios de inclusión utilizados fueron: pacientes adultos, sistémicamente sanos, no fumadores, sin presencia de embarazo, ni consumo de medicamentos de ningún grupo farmacológico antes

y durante la toma de muestras y que presentaran EP. Los criterios de exclusión: pacientes que hayan recibido tratamiento periodontal anteriormente o tratamiento de apiterapia en los últimos 4 meses.

A los pacientes seleccionados para el estudio se les tomaron muestras de 10 µL de FGC con una micropipeta directamente desde el surco o saco periodontal, antes de comenzar con el tratamiento apiterapeuta (t_0) y luego una vez comenzado el tratamiento 1 vez cada 7 días hasta completar un total de 28 días. Las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf esterilizados, centrifugados a 100 RPM por 5 minutos y posteriormente refrigerados a -22°C.

El tratamiento apiterapeuta consta de 4 aplicaciones, 1 vez por semana, que comenzaron inmediatamente después de tomada la muestra de FGC, en las cuales se aplicó la apitoxina desde una *Apis mellifera* directamente en la región pósterocervical y/o escapular (Figura 1).



Figura 1. Sesión de apiterapia en paciente. * Aguijón de *Apis mellifera* junto a sistema glandular secretor de apitoxina.

Posteriormente utilizando la técnica IDRS, basándose en el método de Mancini⁽¹³⁾ se determinó la concentración óptima de AcaPGE₂ de conejo para cuantificación de PGE₂ crevicular mediante IDRS. Para esto se reconstituyó el AcaPGE₂ de conejo liofilizado añadiendo 0.5 mL de Tampón Fosfato Salino 0.01M (PBS) pH 7.4, que contiene 0.1% de BSA y 0.1% de azida sódica, distribuyéndose en 100 alícuotas en tubos eppendorf almacenados a -22°C. Se utilizó el AcaPGE₂ de conejo en 6 diluciones seriadas -1(1:10), -2(1:100), -3(1:1.000), -4(1:10.000), -5(1:100.000) y -6(1:1.000.000). El estándar comercial de PGE₂ se reconstituyó con 2 mL de PBS pH 7.4 y se realizaron 5 diluciones seriadas de las siguientes concentraciones: 0.5-0.05-0.005-0.0005-0.00005 (µg/µL), las que fueron refrigeradas en tubos eppendorf a 4°C.

Para la preparación del gel de agarosa para electroforesis al 2.5%, se pesaron 207.9 mg de agarosa y 267.9 mg de polietilenglicol (PEG). A esto se le adicionaron 12 mL de Tampón Barbital-HCl 0.1 M pH 8.6. Se agitó y calentó al microondas por lapsos de 5 segundos a potencia alta, hasta conseguir un aspecto homogéneo y translúcido. Se midió la temperatura de la preparación con un termómetro digital y al alcanzar una temperatura entre 50 y 60°C se le agregaron 30 µL del AcaPGE₂ -1. Posteriormente fue distribuido en una placa petri de vidrio.

Se repitió el mismo procedimiento anterior 5 veces, adicionando las distintas diluciones seriadas del AcaPGE₂ de conejo al gel de agarosa.

Las placas fueron selladas con parafilm y refrigeradas a 4°C hasta conseguir su gelificación.

Se efectuaron 2 perforaciones en cada uno de las placas con agarosa con un perforador de 4.5 mm de diámetro.

Para estandarizar la dilución seriada del AcaPGE₂ de conejo se utilizaron solamente 2 concentraciones de PGE₂: 0.5 y 0.00005 (µg/µL). En cada perforación se colocó 25 µL de cada concentración de PGE₂. Las placas con los estándares de PGE₂ fueron refrigerados a 4°C por 72 horas para permitir la difusión.

Las placas de agarosa fueron lavadas en agua bidestilada 3 veces por 3 minutos en Orbital Shaker OS-20 a 80 rpm para eliminar las sales presentes en el gel de agarosa. Posterior a esto se tiñeron las placas con azul brillante de Coomassie (1 mL de azul brillante con 3 mL de agua bidestilada), 1 vez por 5 minutos en Orbital Shaker a 100 rpm. El azul brillante de Coomassie se preparó previamente pesando 0.5 g del reactivo al que se le adicionarán 100 mL de agua bidestilada esteril, 45 mL de ácido acético y 9 mL de metanol.

Luego se enjuagaron las placas con una solución de lavado, 3

veces por 3 minutos en Orbital Shaker a 100 rpm. La solución de lavado se realizó previamente con 100 mL de agua bidestilada estéril, 45 mL de ácido acético y 9 mL de metanol.

Finalmente se midieron los radios de los halos de precipitación con un pie de metro.

Con lo anteriormente descrito se determinó la dilución seriada óptima del A α PGE₂ de conejo que permitirá la cuantificación de PGE₂ crevicular, mediante la medición de los halos de precipitación.

Para la confección de la curva de calibración para cuantificación de PGE₂ crevicular mediante IDRS, se procedió a confeccionar 5 placas con gel de agarosa con 4 perforaciones (cuadruplicado) para realizar la curva de calibración utilizando A α PGE₂ de conejo en la dilución 1:1000. Se colocó en cada una de las perforaciones 25 μ L de cada dilución del estándar de PGE₂.

Se realizó el mismo procedimiento explicado anteriormente: refrigeración, difusión radial por 72 hrs, lavado, tinción, enjuague y medición del radio de halos de precipitación, que permitirá reunir datos para confeccionar la curva de calibración y por tanto la ecuación de regresión lineal.

Finalmente para la cuantificación de la PGE₂ crevicular de los pacientes con periodontal (CEP) y sin enfermedad periodontal (SEP) sometidos a apiterapia, se procedió a confeccionar 10 placas con gel de agarosa, realizando 2 perforaciones (duplicado) en cada una de ellas. Se distribuyeron 4 placas para el paciente con enfermedad periodontal con apiterapia y 4 placas para el paciente sin enfermedad periodontal con apiterapia, junto con 1 placa para el paciente con enfermedad periodontal previo a apiterapia y 1 placa para el paciente sin enfermedad periodontal previo a apiterapia. Se aplicó 5 μ L PGE₂ crevicular en cada una de las perforaciones esperando por 72 hrs la difusión al interior de la placa sellada a 4°C. Se realizó nuevamente el procedimiento anteriormente descrito de lavado, tinción, enjuague y medición del radio de los halos, registraron los datos en una tabla excel 2010.

RESULTADOS

Determinación de la Concentración Óptima de A α PGE₂ de Conejo para Cuantificación de PGE₂ Crevicular Mediante IDRS

Se realizaron diluciones seriadas desde -1 a -6, para concentraciones de 0.5-0.00005 (μ g/ μ L). La dilución de A α PGE₂ de conejo que presentó la mayor uniformidad en la difusión de halo fue 1:1000 (-3).

Confección de la Curva de Calibración para Cuantificación de PGE₂ Crevicular Mediante IDRS

Se utilizó la dilución del A α PGE₂ de conejo -3 (1:1000) y las respectivas concentraciones de PGE₂ de: 0.05-0.005-0.0005-0.00005 (μ g/ μ L) por cuadruplicado (Tabla 1).

Tabla 1. Radios halos (mm) según concentraciones de PGE₂.

Radios (mm)						
Concentración (μ g/ μ L)	Halo A	Halo B	Halo C	Halo D	X	DE
0.5	1.35	1.35	1.20	1.20	1.2750	0.0866
0.05	1.05	1.40	1.25	1.35	1.2625	0.1548
0.005	0.83	1.01	1.00	0.85	0.9225	0.0957
0.0005	1.04	0.81	1.02	0.78	0.9125	0.1365
0.00005	0.85	0.85	0.74	0.95	0.8475	0.0858

* Promedio de 4 repeticiones.

** Desviación estándar.

Para la confección de la curva de calibración se utilizaron los promedios (X) de los diámetros de los halos para cada concentración de PGE₂ medida y las desviaciones estándares (DS), los cuales fueron pteados y se obtuvo la ecuación de regresión lineal (Figura 2).

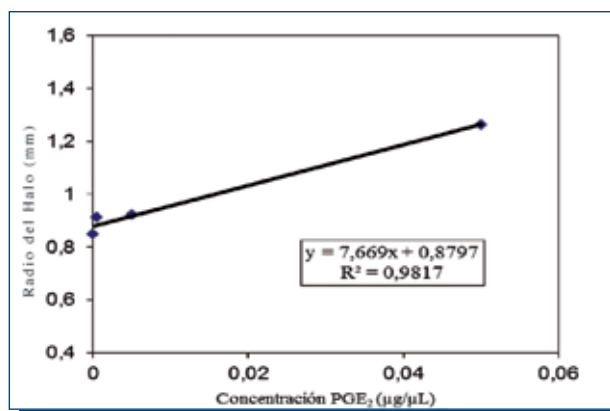


Figura 2. Curva de calibración IDRS para cuantificación de PGE₂ crevicular con estándar comercial de PGE₂.

Se eliminó de la curva la concentración 0.5 (μ g/ μ L), ya que gráficamente se alejaba mucho de la recta en la curva.

Los resultados obtenidos respecto a la curva de calibración fueron $R^2 = 0.9817$ y la ecuación lineal fue $Y = 7.669x + 0.8797$.

Cuantificación de la PGE₂ Crevicular de los Pacientes CEP y SEP Sometidos a Apiterapia

Se seleccionó una paciente de sexo femenino, 21 años de edad, sin antecedentes mórbidos, sin presencia de hábitos tabaquismo y que cumpliera con los criterios de inclusión y exclusión. Al sondaje periodontal no presento sacos periodontales. Al examen clínico, se observan encías de textura firme, color rosa coral, con presencia de patrón puntiforme, en filo de cuchillo y con ausencia de sangrado. Con todos estos antecedentes se catalogó a la paciente como sana periodontalmente. Posteriormente se procedió a la toma de muestra de FGC del paciente SEF, sometido a apiterapia, cuantificándose sus valores de PGE₂, utilizando la ecuación lineal mediante la curva de calibración (Tablas 2 y 3).

Tabla 2. Radios halos (mm) de PGE₂ crevicular de paciente SEP sometido a apiterapia.

Radios (mm)						
		t ₀	t ₇	t ₁₄	t ₂₁	t ₂₈
Halo A	medida 1	8.14	8.50	8.84	8.54	8.23
	medida 2	8.34	8.24	7.04	7.22	6.84
Halo B	medida 1	8.16	8.08	9.14	8.44	8.14
	medida 2	8.44	8.06	7.46	7.82	8.52
xA*		8.24	8.37	7.94	7.88	7.54
xB**		8.30	8.07	8.30	8.13	8.33
X***		8.270	8.220	8.120	8.001	7.933
DE****		0.042	0.212	0.255	0.177	0.562

* Promedio medidas radio 1 y 2 halo A.

** Promedio medidas radio 1 y 2 halo B.

*** Promedio halo A más B.

**** Desviación estándar.

Tabla 3. Concentraciones (μ g/ μ L) de PGE₂ crevicular de paciente SEP sometido a apiterapia.

Concentraciones (μ g/ μ L)					
	t ₀	t ₇	t ₁₄	t ₂₁	t ₂₈
[xA]*	0.9597	0.9766	0.9206	0.9128	0.8678
[xB]**	0.9675	0.9375	0.9675	0.9454	0.9714
[X]***	0.9636	0.9571	0.9440	0.9291	0.9196
DE****	0.0055	0.0276	0.0332	0.0231	0.0733

* Promedio concentraciones halo A.

** Promedio concentraciones halo B.

*** Promedio halo A más B.

**** Desviación estándar.

De los datos obtenidos posterior a la realización de la técnica de IDRS para la prostaglandina E₂, se obtuvo que el paciente SEP inmediatamente antes de recibir apiterapia (t₀) presentó una concentración de PGE₂ crevicular de 0.9636 ± 0.0055 (μg/μL), finalizando con una concentración de 0.9196 ± 0.0733 (μg/μL) al completar 28 días (t₂₈) de tratamiento con apitoxina, encontrándose una diferencia de 0.0440 (μg/μL) (Figura 3).

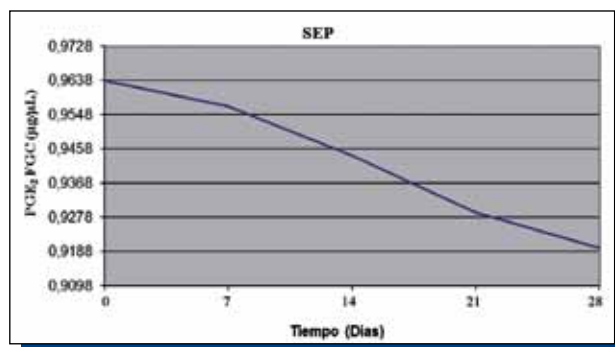


Figura 3. Concentraciones (μg/μL) de PGE₂ de FGC de paciente SEP sometido a apiterapia en 28 días.

Se seleccionó un paciente de sexo masculino, 25 años de edad, sin antecedentes mórbidos, sin presencia de hábitos como tabaquismo y que cumpliera con los criterios de inclusión y exclusión. Al sondaje periodontal presenta sacos periodontales de 4 a 7 mm y tártaro en sector V. Al examen clínico la encía se observó de características edematosa, con pérdida del patrón puntiforme, color rojo intenso, con ausencia de filo de cuchillo y sangramiento en la mayoría de los sitios, característico de una encía inflamada. Con todos estos antecedentes se diagnosticó una periodontitis crónica generalizada severa.

Así mismo se procedió a la toma de muestra de FGC del paciente CEP sometido a apiterapia, cuantificándose sus valores de PGE₂, utilizando la ecuación lineal mediante la curva de calibración (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Radios halos (mm) de PGE₂ crevicular de paciente CEP sometido a apiterapia.

		Radios (mm)				
		t ₀	t ₇	t ₁₄	t ₂₁	t ₂₈
Halo A	medida 1	9.66	9.16	8.44	8.40	8.22
	medida 2	9.36	9.66	9.12	8.80	8.58
Halo B	medida 1	10.58	9.48	9.12	8.78	8.76
	medida 2	10.32	9.92	9.06	8.78	8.20
xA*		9.51	9.41	8.78	8.60	8.40
xB**		10.45	9.70	9.09	8.78	8.48
X***		9.980	9.555	8.935	8.690	8.440
DE****		0.665	0.205	0.219	0.127	0.057

* Promedio medidas radio 1 y 2 halo A.

** Promedio medidas radio 1 y 2 halo B.

*** Promedio halo A más B.

**** Desviación estándar.

Tabla 5. Concentraciones (μg/μL) de PGE₂ crevicular de paciente CEP sometido a apiterapia.

		Concentraciones (μg/μL)				
		t ₀	t ₇	t ₁₄	t ₂₁	t ₂₈
[xA]*		1.1253	1.1123	1.0300	1.0066	0.9806
[xB]**		1.2479	1.1501	1.0705	1.0301	0.9910
[X]***		1.1866	1.1312	1.0503	1.0184	0.9858
DE****		0.0867	0.0267	0.0286	0.0166	0.0074

* Promedio concentraciones halo A.

** Promedio concentraciones halo B.

*** Promedio halo A más B.

**** Desviación estándar.

De los datos obtenidos posterior a la realización de la técnica de IDRS para la Prostaglandina E₂, se obtuvo que el paciente CEP inmediatamente antes de recibir apiterapia (t₀) presentó una concentración de PGE₂ crevicular de 1.1866 ± 0.0867 (μg/μL), finalizando con una concentración de 0.9858 ± 0.0074 (μg/μL) al completar 28 días (t₂₈) de tratamiento con apitoxina, encontrándose una diferencia de 0.2008 (μg/μL) (Figura 4).

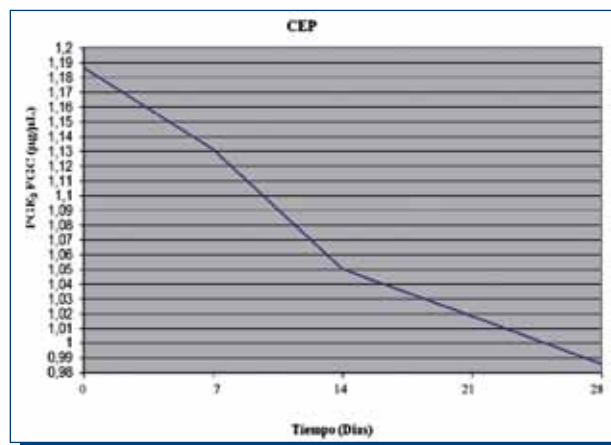


Figura 4. Concentraciones (μg/μL) de PGE₂ de FGC de paciente CEP sometido a apiterapia en 28 días.

DISCUSIÓN

La concentración de PGE₂ crevicular obtenida previo al tratamiento apiterapeuta (t₀), y las mediciones obtenidas a los 7 días (t₇) de iniciada la apiterapia, permiten observar ya una disminución de un 0.67% para el paciente SEP y de un 4.67% para el paciente CEP sometido a apiterapia. Esto demuestra que con la aplicación de microdosis de apitoxina de *Apis mellifera*, es posible observar tan solo a 7 días de iniciado el tratamiento disminución de PGE₂ crevicular. Así mismo a través de las semanas siguientes de apiterapia los datos revelan descensos muy graduales para el paciente SEP, hallándose bajas de 2.03% hasta los 14 días y de 4.59% hasta alcanzar los 21 días. Por su parte, en los pacientes con CEP es posible evidenciar esta disminución notoriamente para t₁₄ con 11.49% y t₂₁ con 14.17%. Se destaca la caída entre t₇ y t₁₄ de 6.82 puntos porcentuales comparado los tan solo 1.56% presentes en ese mismo intervalo para el paciente SEP. Dicha tendencia se mantiene al evaluar porcentualmente la diferencia entre las concentraciones de PGE₂ obtenidas desde t₀ hasta t₂₈, obteniéndose disminuciones de 4.57% para el paciente SEP y de 16.92% para el paciente CEP, siendo esta disminución 3.7 veces mayor en el paciente CEP sometido a tratamiento con apitoxina.

Este hallazgo es de suma importancia, ya que en caso de encontrarse en concentraciones elevadas este biomarcador de la EP, se podrían mermar elevaciones en la destrucción tisular periodontal a través de la aplicación de microdosis de veneno de *Apis mellifera*, ya que estas concentraciones exageradamente elevadas fomentan la destrucción de tejidos blandos y duros, como la degradación del colágeno y reabsorción ósea, respectivamente.

Cabe destacar que por tratarse de un paciente CEP con altas concentraciones iniciales de PGE₂, las disminuciones resultantes son mayores con respecto al paciente SEP, por ello es posible observar que para el paciente CEP entre t₀ y t₇ se produce una disminución porcentual de 4.67%, mientras que para el paciente SEP se produce una disminución semejante de 4.57%, pero en un tiempo significativamente mayor, correspondiente a 28 días.

CONCLUSIONES

La utilización de este tipo de terapias complementarias como lo es la apiterapia, comprende un acabado sustento científico a su favor, aun así no existen estudios previos que estudien la EP, y por tanto su relación con la PGE₂ del FGC.

Los resultados de este estudio son promisorios, esbozándose

a este tipo de terapia natural como un complemento a los tratamientos periodontales actualmente usados. De la misma manera la creación de protocolos de tratamiento permitirá la utilización de microdosis de apitoxina en aquellos casos de enfermedad periodontal de mayor severidad u complejidad.

Por otra parte, la utilización de distintos vehículos o carriers de transporte para este veneno, que permitan su uso por vía tópica, sublingual u oral, facilitaran probablemente masificar el uso de este tipo de terapia que permita en parte precaver el progreso de la EP y limitar el daño a los tejidos periodontales.

Es importante destacar que no es posible determinar el comportamiento del veneno a través del tiempo de aplicación de la apitoxina, por tratarse de una población de estudio y tiempo de seguimiento del tratamiento, acotados. Sin embargo, es seguro determinar una disminución en las concentraciones de este mediador proinflamatorio (PGE_2 crevicular) y por cierto de inflamación.

En futuros estudios pudiera ser de importancia generar una correlación clínica y de laboratorio, que permita estandarizar niveles de concentraciones de PGE_2 crevicular junto a parámetros clínicos periodontales, estos permitirán conocer más acabadamente el comportamiento de este tipo de tratamientos complementarios a la medicina u odontología tradicional.

AGRADECIMIENTOS

Por su colaboración en los procedimientos de apiterapia se agradece a la Sra. Andrea Hernández Wimmer. Por su ayuda con los análisis estadísticos a la estadístico Verónica Bittner Schmidt, y por sus conocimientos metodológicos a la Dra. María Cristina Fellay Matic. El presente estudio científico, para su realización, conto con el total financiamiento por parte de la Facultad de odontología de la Universidad del Desarrollo, Concepción. Este trabajo formó parte de la tesis de investigación conducente al grado de licenciado en odontología de la Universidad del Desarrollo.

Adicionalmente no existe ningún tipo de relación comercial por parte de los autores con la Universidad del Desarrollo, ni entre estos mismos.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no presentar conflictos de interés de ningún tipo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carranza F, Ubios A. Las estructuras de soporte dentario. *Periodoncia Clínica*. 8ª ed. Mexico, 1998: McGrawHill Interamericana, 1, 33-35.
2. Armitage GC. Periodontal diagnoses and classification of periodontal diseases. *Periodontology* 2000, 2004; 34: 9-21.
3. Ministerio de Salud. Norma en prevención de enfermedades gingivales y periodontales. 1998. Disponible en: http://www.redsalud.gov.cl/archivos/norma_de_preencion_de_enfermedades_periodontales.pdf [2009, 29 de octubre].
4. Van Dyke TE, Serhan CN. Resolution of inflammation a new paradigm for the pathogenesis of periodontal diseases. *J Dent Res*, 2003; 82: 82-90.
5. Champagne CME, Buchanan W, Reddy MS, Preisser JS, Beck J, Offenbacher S. Potential for gingival crevice fluid measures as predictors of risk for periodontal disease. *Periodontol* 2000, 2003; 3: 167-180.
6. Arce RM. Terapia periodontal del futuro. *Colombia Médica*, 2004; 35: 40-47.
7. Kosnik M, Korosec P. Importance of basophil activation testing in insect venom allergy. *BioMed Central: Allergy, Asthma & Clinical Immunology*, 2009; 5(11): 1-4.
8. Armitage GC. Análisis del líquido crevicular gingival y riesgo de progresión de la periodontitis. *Periodontol* 2000, 2005; 9: 109-119.
9. Griffiths GS. Formación, acumulación e importancia del líquido crevicular gingival. *Periodontol* 2000, 2000; 6: 32-42.
10. Salamanca G, Rivera F, Salamanca J. Características y propiedades de la Apitoxina de *Apis mellifera* como potencial terapéutico usos y limitaciones, [en línea]. Santa Fé de Bogotá. Universidad de Tolima. Colombia. 2001. Disponible en: http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/apiterapia/35_apitoxina_colombia.pdf [2009, 3 de abril].
11. Brochetto-Braga M, De Lima P. *Hymenoptera venom* review focusing on *Apis mellifera*. [Número especial]. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 2003; 9(2).
12. Bacha A, Karray A, Bouchaala E, Gargouri Y, Yassine A. Purification and biochemical characterization of pancreatic phospholipase A2 from the common stingray *Dasyatis pastinaca*. *BioMed Central: Lipids in health and disease*, 2011; 10(32): 1-9.
13. Mancini GA, Carbonara AO, Heremans JF. Immunochemical quantitation of antigens by singleradial immunodiffusion. *Immunochemistry*, 1965; 2: 235-254.