



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGIA

PRESENCIA DE COLAGENA, VITRONECTINA Y LAMININA
EN PROCESOS INFLAMATORIOS DEL LIGAMENTO
PERIODONTAL ORIGINADOS POR FUERZAS
ORTODÓNCICAS

T E S I S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A :

VICTOR MANUEL SEGURA GARCIA

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Francisco Marichi'.

DIRECTOR: DR. FRANCISCO JAVIER MARICHI RODRIGUEZ

ASESOR: DR. JOSE ANTONIO MORALES GONZALEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



El presente trabajo se realizo en el laboratorio de Bioquímica Medica, Carrera de Medico cirujano- FES Iztacala UNAM bajo el asesoramiento del Dr. José Antonio Morales González.

El cual fue apoyado parcialmente por el donativo IN211402 DEL PAPIIT-DGAPA, UNAM.



AGRADECIMIENTOS.

Doy gracias a Dios por haberme dado una hermosa familia a la cual le brindo este trabajo.

A Mama Lupita: Gracias por todas las enseñanzas que me dejaste, se que estas orgullosa de mi y me cuidas desde el cielo siempre te recordare en mi corazón y llevare tu sonrisa en mi mente

A Julián Segura: Gracias por toda la inspiración que me das para seguir adelante.

A mis Papas: Gracias por toda la confianza y el apoyo que siempre me brindaron para lograr lo que tengo, por que sin ustedes, sin sus regaños y sin sus consejos no hubiera sido nada

A Julio Segura Garcia: Gracias por estar conmigo siempre y toda la ayuda que recibí de ti

A Marisela Segura Garcia: Gracias por demostrarme aferrarme a la vida y a las cosas que quiero

A Irma Segura Garcia: Gracias por toda la ayuda que me brindaste en mi carrera y sobre todo en mi vida

A Joel Heriberto Nava: Gracias por el apoyo que recibí siempre de ti

A mis sobrinos Jorge, Iván y Zah-il haa: Gracias por que ustedes son mi motivación de seguir adelante

A Gisela Fuentes Gonzáles: Gracias por estar conmigo y por toda la ayuda que recibí de ti y de toda tu familia te quiero

Gracias a todos por estar conmigo que Dios los bendiga y que me siga dando las satisfacciones que hasta ahora me da, gracias y los quiero a todos.

Un agradecimiento especial a mis directores de tesina Dr. FRANCISCO JAVIER MARICHI RODRÍGUEZ y Dr. JOSÉ ANTONIO MORALES GONZÁLEZ por todo el apoyo y la paciencia para la realización de este trabajo

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Victor Manuel Segura Garcia
FECHA: 16/04/04
FIRMA: [Firma manuscrita]



ÍNDICE:

introducción	VII
Antecedentes	1
Generalidades de Proteínas a nivel de procesos inflamatorios	5
Laminas basales.....	6
Matriz extracelular.....	8
Componentes de la matriz extracelular.....	9
Proteínas fibrilares.....	9
Glucoproteínas estructurales extracelulares.....	10
Membrana basal.....	10
Colágena	12
Estructura.....	13
Biosíntesis.....	15
Mecanismos de acción.....	16
Función	17
Laminina	19
Estructura.....	19
Biosíntesis.....	19
Mecanismos de acción.....	20
Función	21
Vitronectina	23
Estructura.....	23
Biosíntesis.....	23
Mecanismos de acción.....	24



Función	24
Reacción inflamatoria en el periodonto al aplicar movimientos ortodóncicos.....	25
Hueso alveolar.....	26
Reacción del periodonto ante una fuerza.....	27
Técnicas de obtención y determinación de proteínas.....	29
Técnica de Lowry.....	31
Electroforesis.....	32
Tipos de electroforesis.....	35
Colorantes.....	37
Métodos de transferencia a filtros.....	37
Planteamiento del problema.....	41
Justificación.....	42
Objetivos.....	43
Objetivo generales.....	43
Objetivos específicos.....	43
Hipótesis.....	44
Hipótesis Nula	44
Hipótesis de trabajo.....	44
Metodología.....	45
Conclusiones.....	50



Referencia Bibliográfica.....	51
--------------------------------------	-----------

Anexos.....	54
--------------------	-----------

Índice de imágenes y tablas

Figura 1 y 2 Macrofotografía electrónico aumentado al microscopio.....	6
Figura 3 y 4 estructuras de proteínas.....	7
Figura 5 Estructura de Laminina.....	19
Figura 6.- se observan 10 tubos con muestra.....	46
Figura 7 tamaños de las pipetas.....	46
Figura 8 espectrofotómetro.....	47
Figura 9 pozos para la electroforesis.....	48
Figura 10 cámara de electroforesis.....	48
Figura 11 cámara para transferencia electroforetica.....	49
Tabla 1 Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.....	33
Tabla 2 Condiciones de electroblotting más comunes.....	39
Tabla 3 Resultados y porcentajes de las muestras.....	47
Tabla 4. muestras al 80%.....	47



INTRODUCCIÓN

En la presente tesina se tratara sobre la presencia de proteína de adhesión celular en los procesos inflamatorios del ligamento periodontal cuando se aplican movimientos ortodóncicos al diente.

Primero me enfocare a la matriz extracelular asociada al sostén y sustento estructural al tejido donde se define gran parte de las características físicas de un tejido.

Las células de sostén y su matriz extracelular asociada se define como tejido conjuntivo.

Las células de sostén son los fibroblastos, condrocitos, osteoblastos, miofibroblastos y adipositos.

Los fibroblastos secretan los componentes de la matriz extracelular esta compuesta en la mayor parte de los tejidos. Ahora la matriz extracelular esta compuesta principalmente por proteínas fibrilares rodeadas de glucoaminoglucanos y pequeñas cantidades de glucoproteínas estructurales con función en adhesión celular donde juegan un papel muy importante la Colágena, la Laminina, y la Vitronectina.

Las colágenas son una familia de proteínas íntimamente emparentadas entre sí que poseen propiedades comunes. Contiene elementos helicoidales triples con una secuencia de aminoácidos repetitiva y son ricos en aminoácidos hidroxilados, hidroxipolina e hidroxilisina. La glicina en cada tercera porción imparte hacia la derecha una hélice de la cadena de la colágena.

La Vitronectina esta relacionada con proteínas en la fase terminal de ambos complementos y la cascada de coagulación y la inhibición citolitica



esta también interactúa con células a través de un número de receptores de integrina conteniendo principalmente alfa V beta 3. La Vitronectina participa en una variedad de eventos de protección incluyendo hemostasis, fagocitosis, reparación tisular y función inmune. Esto es sintetizado predominantemente en el hígado, pero plaquetas, macrófagos y células de músculo liso pueden producir una molécula similar. La localización inmunofluorescente sugiere que la Vitronectina es depositada en una forma fibrilar en un número de tejidos conectivos.

La Laminina participa en un número de interacciones ligada con diversos receptores celulares. La Laminina contiene sitios ligados para otros componentes de la matriz como es la colágena, la heparina, entactina y proteoglicanos interacciones que juegan un papel importante en el ensamblado y el mantenimiento de las matrices extracelulares. El lugar de algunos de estos enlaces a sido determinado, principalmente por estudio de las propiedades ligados a los fragmentos proteolíticos.

El fin de esta tesina es determinar la presencia de las proteínas de adhesión específicamente Laminina, Vitronectina y Colágena en el ligamento periodontal en dientes que se les a sometido a fuerzas ortodóncicas mediante técnica como la de lowry, electroforesis y anfígenos.

La presencia de estas proteínas sirve para orientarnos y saber cuando ocurren estos procesos inflamatorios en el ligamento periodontal y si estas proteínas están presentes al realizar trabajos de tensión y compresión a el diente



ANTECEDENTES

1977 Binderman y Cols., aplicaron fuerzas mecánicas en la corrección de la mala oclusión.¹

1979 R. C Shore y cols., desarrollan el modelo que explica el aparente movimiento oclusal de las proteínas del ligamento periodontal en incisivos de ratones. Siendo los mecanismos por los cuales ocurren estos movimientos pobremente entendido, durante la remodelación.¹

1975 Beertsen y cols., demostró que al aplicar una fuerza en las piezas dentales se incrementada la cantidad de prolina que es importante para la síntesis de la colágena. Siendo este incremento importante a las 2, 4, 6 y 8 días después de la aplicación de la fuerza.²

1986 Melcher y cols, mencionan que el área del ligamento periodontal contiene células pluripotenciales y factores moleculares que controlan los eventos que ocurren en el ligamento periodontal.²

1988 Davidovitch y cols, en un estudio en vitro de la estimulación mecánica de las células óseas observa la secuencia por medio de inmunohistoquímica la tensión que se ocasiona en el ligamento periodontal en animales usando una relación de tiempo y neurotransmisores. Recientes investigaciones sugieren que la presencia de citocinas son activadas rápidamente en respuestas a fuerzas ortodóncicas.³

1989 M. Somerman y cols, reportan que el ligamento periodontal y los fibroblastos gingivales responden de manera diferente al ligarlos. Encontrando que uno de los eventos iniciales requeridos para la regeneración periodontal como respuesta a la pérdida de ligamento periodontal debida a enfermedad periodontal es el establecimiento de



tejido conectivo en la superficie radicular, este estudio es la evaluación de los diferentes procedimientos para la nueva formación de tejido conectivo. La fibronectina es considerada una proteína de unión de las células del ligamento periodontal y de los fibroblastos gingivales.⁴

1992 Ngan empleó un sistema dinámico para estudiar los efectos hidrostáticos del ligamento periodontal en humanos en vitro. Demostrando que la fibronectina, en lugar de la laminina o la colágena, es el sustrato de preferencia de ciertos queratinocitos humanos, además que la laminina inhibe su migración, por tanto, cuando las células pierden su asociación con la membrana basal y entran en contacto con la fibronectina o el colágeno tipo I, su comportamiento de adhesión y migración puede ser cambiado.⁴

1992 Se sugiere que las proteínas de adhesión del cemento de la raíz dental pueden influenciar la formación celular selectiva en las superficies radiculares mediante células del ligamento periodontal. En ese mismo año algunos estudios comprobaron que algunas formas de fibronectina se expresan en el ligamento periodontal, pulpa dental, zona de cementogénesis y en las superficies periósticas y del endostio del hueso alveolar, lo que implica una función más generalizada de las glucoproteínas en la formación del tejido duro, específicamente en la remodelación ósea.³

1995 Louis A y cols, reporta los cambios en la forma de las células orales con un estímulo de tensión ortodóncica, simulando el movimiento dental, se calibraron las fuerzas y se aplicaron a células del ligamento periodontal y a fibroblastos de la mucosa bucal humana. Produciendo tensión a células vitales en crecimiento en membranas politetrafluoretileno. Adicionaron una nueva célula adhesiva Célula Tak, para verificar los efectos del sustrato adhesivo en respuesta a dos tensiones conocidas, los cambios se evaluaron en un lapso de tiempo



con el telemicroscópio, dependiendo del área alterada. Las respuestas fueron aparentemente independientes del tipo de célula, la tensión empleada y la presencia de células de adhesión, el telemicroscópio demostró el tipo de célula no respectiva, que las células producidas en el área de estrés producen un efecto súbito en cuanto al número, en comparación con el relativo grupo de control que consistió en los fibroblastos de la mucosa bucal.⁵

1998 Metzger Z. Estudia los diferentes efectos quimiotácticos del cemento con la unión de proteínas en las células del ligamento periodontal. Aislado proteínas de unión (CAP) en las uniones con los fibroblastos estudiando su atracción selectiva a las células del ligamento periodontal en un estudio en vitro en un sistema de micro-quimiotaxis. Las células del ligamento periodontal y los fibroblastos gingivales se compararon con la respuesta quimiotáctica de las proteínas de adhesión a la fibronectina. Usando como control fibroblastos de piel de murino.⁵

La respuesta quimiotáctica de las células del ligamento periodontal a la fibronectina fue de 10^{-8} M, siendo similar a la magnitud de los fibroblastos gingivales (16 \pm 5 y 11 \pm 3 respectivamente) Pero ambas fueron significativamente más bajas al grupo control (14 \pm 2 y 16 \pm 2 respectivamente). La respuesta quimiotáctica de las células del ligamento periodontal a la unión de las proteínas del cemento es de 10^{-7} M fue más alta (36 \pm 5) que las de los fibroblastos gingivales o los fibroblastos de piel (14 \pm 2 y 16 \pm 2). Estos resultados sugieren que la unión a proteínas del cemento puede influenciar la selectividad de las células a la repoblación celular de las áreas del ligamento periodontal.⁶

1998 Se demostró que la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1), una molécula importante que promueve adhesión en reacciones inmunológicas y antiinflamatorias, puede inducir la expresión de citocinas pro-inflamatorias que regulan la expresión de moléculas de adhesión



mediante las células vasculares endoteliales, la producción de factores quimiotácticos y el subsecuente reclutamiento de leucocitos (las citocinas se involucran en la iniciación y progreso de las enfermedades inflamatorias crónicas).⁶



GENERALIDADES DE PROTEÍNAS A NIVEL DE PROCESOS INFLAMATORIOS

Proteínas.

Glucoproteínas estructurales tienen la función de difusión de oxígeno y nutrientes hacia las células, eliminación de desechos de la célula hacia la sangre o linfáticos, transmisión de información nerviosa y sistema de defensa inespecífica básica.

Constituye una bicapa lipoproteica con glicoproteínas que funcionan como receptores de los agonistas fisiológicos de las plaquetas (ADP, TXA₂, trombina), proteínas adhesivas (fibrinógeno, fibronectina, Laminina, trombospondina, Vitronectina, factor de Von Willebrand [vWF]) y para ligamentos fibrosos como el colágeno, además, posee enzimas importantes para el funcionamiento celular y fosfolípidos^{3,4} Es responsable de la interacción de la célula con el medio circundante a través de receptores entre las que figuran las integrinas las cuales se caracterizan por enlazarse a proteínas que tienen la secuencia arginina-glicina-aspartato (RGD): fibrinógeno, fibronectina, vitronectina, factor de Von Willebrand, colágena¹¹



Láminas basales

Son estructuras laminares que corresponden a una forma especializada de la matriz extracelular, que actúan como interfase entre las células de los tejidos epiteliales, musculares y nerviosos en los sitios en que ellas se asocian al tejido conjuntivo.

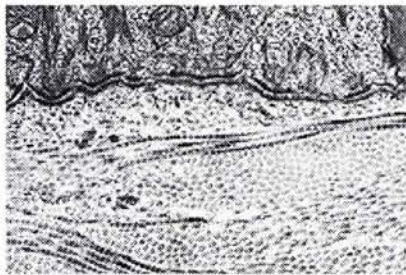


Figura 1

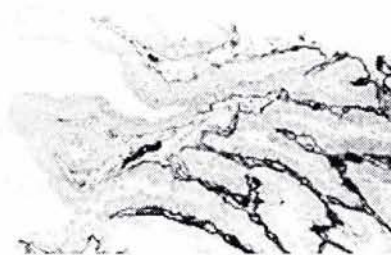


Figura 2

Figura 1 y 2 Macrofotografía electrónico aumentado al microscopio
(<http://escuela.med.puc.cl/fotosBig/fig26.html>)

Al microscopio electrónico aparece formada por 2 capas laminares: la que está vecina a la célula es poco densa a los electrones y se denomina lamina rara (o lúcida), la segunda capa es densa a los electrones y se denomina lamina densa, a ella se asocia una tercera capa que contiene fibrillas colágenas llamada lamina fibroreticular y que es continua con la matriz conjuntiva adyacente (Figs.1 y 2).

Entre las funciones que desempeña la lámina basal se destacará en este momento sólo que ella constituye una interfase de adhesión de modo que las células poseen mecanismos de adhesión para fijarse a la membrana basal y ella a su vez está anclada en la matriz extracelular conjuntiva a las fibrillas colágenas.⁷



Las membranas basales están formadas por 4 tipos de moléculas predominantes: colágeno tipo IV, perlecan (proteoglicano de heparan-sulfato), Laminina y entactina (Fig.3), además de la fibronectina y de la colágena VII que la asocia a las fibrillas de colágeno III de la lámina fibroreticular.^{9,11}

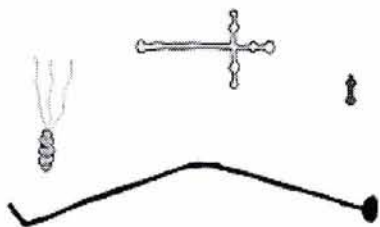


Figura 3

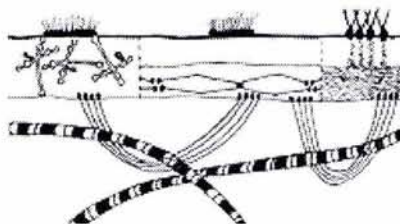


Figura 4

Figura 3 y 4 estructuras de proteínas
(<http://escuela.med.puc.cl/fotosBig/.html>)

Las moléculas de colágeno tipo IV forman la lámina densa. Ellas difieren de las moléculas de colágeno I, II y III que forman las fibrillas colágenas. Las moléculas de colágeno IV se asocian entre primero entre sí por sus extremos carboxi terminales formando dímeros (Fig.4) los cuales a su vez se asocian entre sí lateralmente formando una lámina desde la cual se proyectan perpendicularmente los extremos aminoterminal de las moléculas, los que al interactuar entre sí permiten la unión de láminas sucesivas de las redes planas formadas por los dímeros del colágeno IV.

El perlecan es un proteoglicano de heparansulfato, formado por una proteína central de unos 600.000 de PM asociada a entre 2 y 15 cadenas de heparansulfato, el cuál puede interactúa directamente con colágeno IV y con Laminina.⁷

La entactina, que es una glicoproteína pequeña se asocia a las moléculas de laminina entre sí y con colágeno IV contribuyendo a estabilizar la estructura y la asociación de las láminas rara y densa.



Matriz extracelular.

Anteriormente se pensaba que los componentes de matriz extracelular tenían como función estructural dar soporte a los tejidos. Sin embargo, ahora se sabe que tiene un papel mucho más activo y que sus componentes se comportan de manera compleja.

Las proteínas que forman parte de la familia de las moléculas de matriz extracelular se clasifican en: glicosaminoglicanos, las proteínas estructurales y proteínas de adhesión celular. Los glicosaminoglicanos son cadenas de polisacáridos no ramificados compuestos de unidades de azúcar (disacáridos) principalmente de N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina. Los principales grupos de glicosaminoglicanos en el sistema nervioso central son los sulfatos de heparano, condroitino, keretano y dermatano. Estos, al unirse a las proteínas, forman los proteoglicanos que también son componentes de MEC relacionados con el almacenaje de factores tróficos que las neuronas emplean durante el desarrollo.

Dentro de las proteínas de carácter estructural están las colágenas y la elastina. Ambas permiten fortalecer y dar flexibilidad a los diferentes tejidos en el sistema nervioso. Dentro de las moléculas de adhesión celular y reconocimiento intercelular se incluyen a la laminina y fibronectina. Existe una gran variedad de proteínas de MEC que están relacionadas con los procesos del desarrollo de las CGC.



Componentes de la matriz extracelular.

Algunos de los elementos que mayormente constituyen a las membranas basales tienen una función dual. Los componentes de esta matriz son entre otros, colágena tipó IV y sus variantes genéticas como laminina, entactina/nidogénica, fibronectina, osteonectina. Las membranas basales se localizan entre la capa epitelial celular y el tejido conjuntivo.

Existen diferencias estructurales y funcionales entre las membranas basales en diferentes estadios del desarrollo, en diferentes tejidos y en diferentes tipos celulares. La gran diversidad de componentes presentes en las membranas basales parecería estar generada por variaciones en sus elementos como resultado de situaciones de isoformas genéticas de laminina y colágeno. Dentro de la organización supramolecular se tiene a laminina como unos de los mayores constituyentes de las membranas basales.

La matriz extracelular es un componente de los tejidos básicos , y es toda la sustancia que se encuentra rodeando las células en los tejidos. La misma es producida por la mayor parte de las células de sostén.

Sus componentes fundamentales son: Glucosaminoglucanos, proteínas fibrilares y glucoproteínas

La estructura general del Tejido Conectivo presenta Una red dispersa de células de sostén que producen: Un entramado organizado y abundante de proteínas fibrilares organizadas en un gel hidratado de GAG.

Las proteínas fibrilares

Hay 4 proteínas que forman fibrillas en la matriz Extracelular que son colágeno, fibrilina, elastina y fibronectina



Al microscopio óptico y electrónico, se observan estructuradas en 3 tipos de fibras, que se le denominan fibras de tejido conectivo y son: Fibras colágenas, Fibras reticulares y Fibras elásticas.

La función de estas proteínas que forman fibras es ofrecer diferentes propiedades tensiles y elásticas a los tejidos de sostén y dar anclaje a otros elementos celulares de los tejidos.^{7,9}

Glucoproteínas estructurales extracelulares

Son proteínas no filamentosas que intervienen en la interacción célula-matriz extracelular e interaccionan con receptores específicos de la superficie celular.

Las proteínas mejor caracterizadas son: la laminina, la tenascina, la entactina y Laminina:

Es componente de las membranas basales. La produce las células epiteliales y endoteliales. Tiene lugares de unión para receptores celulares específicos (integrinas), heparán sulfato, colágeno tipo IV y entactina.

La entactina: (glucoproteína) Componente de todas las membranas basales. Se une a la laminina y se piensa que une la laminina al colágeno tipo IV.^{8,9}

Membrana basal.

Son proteínas y Glucosaminoglucanos GAG de la matriz extracelular, que se organizan a modos de capas y que intervienen como una interfase entre las células parenquimatosas y los tejidos de sostén.

Se asocian a: células de Schwann y también forman una membrana limitante alrededor del SNC.

Componentes:

Colágeno tipo IV, Laminina, heparán sulfato, entactina y fibronectina.



Al microscopio electrónico se observan varias capas.

A partir de las células se observan lámina lúcida, lámina densa y lámina fibrorreticular (que se funde con las proteínas fibrosas de la matriz extracelular)

Con técnicas de H/E no permiten diferenciar la membrana basal, la técnica de PAS es positiva por el gran contenido en glucoproteínas y la técnica plata, también es positiva.

Hoy día se usa indistintamente los términos de lámina basal (que se debiera solamente referir al la lámina densa) y de membrana basal.

Las funciones principales de la membrana basal son Adhesión celular, barrera de difusión y regulación del crecimiento celular.

Muchos de estos receptores pertenecen a una larga familia de proteínas estructurales llamadas integrinas. Las integrinas se componen de dos subunidades; alfa y beta. Aproximadamente se han identificado tres docenas de moléculas de superficie como las proteínas de adhesión, Hay tres familias principales de moléculas de adhesión: selectinas, integrinas y la superfamilia de inmunoglobulinas, éstas últimas son glicoproteínas de superficie que promueven la adhesión en reacciones inmunológicas y antiinflamatorias mediante el reclutamiento de leucocitos. Es sabido que las reacciones antiinflamatorias crónicas se caracterizan regularmente por la acumulación de células de la inflamación en el tejido conectivo extravascular; cabe mencionar que los linfocitos infiltrados localmente, tienen la oportunidad de interactuar directamente con los fibroblastos del tejido conectivo.⁹



COLÁGENA.

La colágena es una de las proteínas más abundantes del organismo. Junto con los otros componentes de la matriz extracelular (glucoproteínas, colagenasas, proteoglicanos, lamininas, fibronectinas, tromboespondinas, enactina y tenascina), las cuales promueven la adhesión celular, activan vías de señales intracelulares, y regulan las actividades de varios factores de crecimiento, así como de otras proteínas.¹⁰

Durante los últimos 20 años se han identificado por lo menos 19 tipos de colágenas genéticamente diferentes, codificadas por más de 30 genes. El reclutamiento de células es un aspecto crucial en el desarrollo de la respuesta inflamatoria aguda y crónica, incluidas las reacciones de hipersensibilidad aguda y tardía. De la acción combinada de moléculas de adhesión, citocinas y sus receptores, entre otros factores, los leucocitos obtienen la información que les indica la dirección de migración a los diferentes sitios en donde son requeridos.^{10,11}

Los colágenos son una familia de proteínas íntimamente emparentadas entre sí que poseen propiedades comunes. Contienen elementos helicoidales triples con una secuencia de aminoácidos repetitiva (tripletes Gly-X-Y) y son ricos en aminoácidos hidroxilados, hidroxiprolina e hidroxilisina. La glicina en cada tercera posición imparte hacia la derecha una helicidad a la cadena colágena.

La molécula de colágeno se forma mediante tres cadenas de polipéptidos que se entrelazan en un superenrollamiento hacia la izquierda para formar una especie de cuerda helicoidal triple. Las cadenas de polipéptidos individuales se designan con la letra griega alfa y un número arábigo después de ésta, que caracteriza a las cadenas constituyentes del trímero. Por ejemplo el colágeno tipo I consiste en dos cadenas alfa 1 y una cadena alfa 2. Los distintos trímeros se designan con números romanos y representan los tipos de colágeno. Las cadenas de los



distintos colágenos se distinguen poniendo el número romano del respectivo tipo entre paréntesis después del número arábigo, como alfa 1(I) y alfa 1(III).¹²

Estructura

La estructura de la colágeno tipo I es un heteropolímero que se compone de dos cadenas alfa 1(I) y una cadena alfa 2(I) [alfa 1(I)]₂ alfa 2(I). *Éste es el colágeno principal del hueso, piel y tendón y el que predomina en las cicatrices maduras.* Por medio de la microscopia electrónica el colágeno tipo I aparece en la forma de fibras con bandas transversales de una periodicidad de 67-nm. En algunas patologías inflamatorias crónicas se encuentra un polímero de este tipo de colágeno [alfa 1(I)]⁹.

Colágeno tipo II

Éste colágeno contiene tres cadenas alfa idénticas [alfa 1(I)]₃. Las fibras de colágeno tipo II son más finas que las de tipo I y exhiben una periodicidad apenas discernible. *Este es el colágeno principal del cartílago* y también existe en el humor vítreo y el núcleo pulposo de los discos vertebrales.

Colágeno tipo III.

El colágeno tipo III también es homopolímero [alfa 1(III)]₃ y abunda en los tejidos embrionarios. *En el adulto predomina en órganos y estructuras plegables como vasos sanguíneos, útero y tubo digestivo.* El colágeno tipo III se presenta como unos finos filamentos arrosariados que a menudo se asocian con fibras tipo I. El tipo III es el primer colágeno que se deposita en el proceso de reparación de las heridas.

Los colágenos tipos I, II y III son ricos en alanina, contienen menos residuos hidroxilados que los otros tipos de colágenos, son resistentes a las proteasas inespecíficas y constituyen los colágenos que mejor han sido caracterizados.



Colágeno tipo IV

El colágeno tipo IV aparece con exclusividad en las membranas basales. En él se identifican dos cadenas, alfa 1(IV) y alfa 2(IV). Aunque no se ha establecido con exactitud su proporción en ninguna membrana basal es probable que existan homopolímeros y heteropolímeros. El colágeno tipo IV posee varios rasgos distintivos. Se incorpora en agregados definitivos sin separación de los péptidos y la tripe hélice colágena se ve interrumpida en varios sitios por dominios globulares susceptibles a las proteasas inespecíficas. El colágeno tipo IV no forma fibras separadas, pero junto con la laminina y otros componentes forman las membranas basales.¹¹

Colágeno tipo V

En este colágeno se identificaron tres cadenas constituyentes: alfa 1(V), alfa 2(V) y alfa 3 (V). Se describieron varios homopolímeros y heteropolímeros. El colágeno tipo V se halla ampliamente distribuido en la mayoría de los tejidos, pero nunca como componente principal. Forma unos delicados filamentos sin periodicidad que a menudo conectan a las fibras tipo I entre sí con otras estructuras.

Colágeno tipo VI

El dominio Helicoidal triple representa sólo la tercera parte de la cadena polipeptídica de este tipo de colágeno, en tanto que el resto está formado por los dominios globulares de ambos extremos. El colágeno tipo IV se representa como delicados filamentos que se semejan los del colágeno tipo V. A diferencia de lo que ocurre con el colágeno tipo V prevalece en la mayoría de los tejidos conectivos.¹²



Biosíntesis del colágeno.

Las cadenas polipeptídicas individuales se sintetizan en ribosomas unidos a la membrana y, al igual que otras proteínas la exportación, estas cadenas de preprocolágeno contienen en el extremo aminoterminal una secuencia de señal que son separadas poco después de la traducción. Las cadenas de procolágeno resultantes presentan péptidos de extensión (propéptidos) en ambos extremos de la molécula.

Por lo tanto, las cadenas pro- alfa tienen tres dominios principales: La cadena alfa, el péptido aminoterminal y el péptido carboxiterminal. En las cisternas del retículo endoplasmático rugoso tres cadenas pro-alfa interactúan para formar una molécula de procolágeno. Antes de la secreción tiene lugar la hidroxilación de los residuos prolina y lisina, La glucosilación, la asociación de las cadenas, el establecimiento de puentes disulfuro y la formación de la triple hélice. La hidroxilación requiere vitamina C, necesidad que explica la cicatrización inadecuada que es característica de la carencia de ésta vitamina (escorbuto).

Todos los colágenos son glucoproteínas, pero su grado de glucosilación varía según los distintos tipos genéticos. Las moléculas de procolágeno modificado son transportados al complejo de golgi, se envasan en gránulos y son secretadas hacia el espacio extracelular.^{9,10}

Para que se puedan armar las estructuras definitivas se requiere el procesamiento extracelular de los colágenos tipo I, II, III y V. Los péptidos de extensión son separados por aminoproteasas y carboxiproteasas. Estas enzimas actúan de forma independiente y se han identificado formas de colágeno con procesamiento parcial. Las fallas de la aminoproteasa causan la retención del propéptido N terminal y formación defectuosa de las fibras, como en la enfermedad hereditaria de EHLER-DANLOS tipo VII. Después de la eliminación de los propéptidos de extensión, las moléculas de colágeno interactúan seguidamente y se unen para formar fibras colágenas; pero las fibras no alcanzan su fuerza máxima a la tensión



hasta que se establece una serie de enlaces intra e intermoleculares. Alguno de éstos se debe a la acción de enzimas específicas como la lisil oxidasa. Este es una metaloenzima que requiere cobre como cofactor.

La quelación del cobre por los nitrilos, trastorno tóxico llamado latirismo, o las enfermedades hereditarias del metabolismo del cobre reducen la actividad de la lisil oxidasa y conducen a la formación de fibras colágenas con enlaces cruzados defectuosos que carecen de fuerza tensil.

El contenido de colágeno de los órganos normales se mantiene constante para toda la vida adulta. La regulación de la síntesis, secreción y eventual depósito de fibras colágenas es uno de los aspectos menos dilucidados de la biología del colágeno.¹³

Mecanismos de acción

El colágeno experimenta un recambio lento en los tejidos del adulto. De hecho por mucho tiempo se pensó que el colágeno era una proteína inerte que quedaba en los tejidos para toda la vida del individuo. El colágeno nativo es resistente a la mayoría de las proteasas inespecíficas. La colagenasas son enzimas que dirigen al colágeno triple helicoidal nativo a temperatura, concentración iónica y pH fisiológicos.

La colagenasas son una familia de enzimas de diversos orígenes celulares y especificidades para distintos sustratos. La mayoría de las colagenasas de los vertebrados rompen un solo enlace peptídico en el mismo locus de las tres cadenas constituyentes, a una cuarta parte de la distancia respecto del extremo C terminal. En general, la misma colagenasa actúa sobre los colágenos de los tipos I, II, y III, aunque la celeridad de la fragmentación es distinta para cada tipo. Los colágenos tipo IV y V no son degradados por las mismas colagenasas que actúan sobre los tipos I, II, y III, sino que son degradados por otra familia de



colagenasas. Todas las colagenasas de los vertebrados son enzimas que contienen zinc y requieren iones de calcio para entrar en actividad. Las colagenasas liberan dos grandes fragmentos consistentes en las tres cuartas partes y una cuarta parte, respectivamente, de la molécula de colágeno; no ejercen ninguna acción adicional sobre éstos fragmentos y la degradación final está a cargo de proteasas extracelulares inespecíficas o de enzimas lisosómicas después de la fagocitosis de los fragmentos.^{9,13}

Función

Los fibroblastos son la fuente principal de colagenasas aunque otras células, entre ellas los macrófagos, las células epiteliales y las células del endotelio vascular las producen.

Los colágenos: Es una familia de proteína estrechamente relacionadas que pueden agregarse y generar filamentos o fibrillas. Hay 20 tipos de cadenas polipéptidas de colágeno que se combinan y producen distintos tipos desde el punto de vista morfológico. De acuerdo a la estructura que forman se dividen en:

- 1.colágenos fibrilares tipo I,II,III,Vy XI.
- 2,colágenos facit tipos IX,XII,XIV.
- 3.colágenos de cadena corta tipo VIII, X
4. colágeno de la membrana basal tipo IV
5. otros colágenos tipo VI,VII y XIII

Las fibras de colágeno que aparecen teñidas en las coloraciones son del tipo I, II, III y tienen la función de dar fuerza de tensión a los tejidos.

Las fibras reticulares : que también se observan en el tejido conectivo, son fibrillas de colágeno III que forman una malla laxa en los tejidos y por debajo de la membrana basal. Y tienen la función: de Armazón que sostiene los componentes especializados de la matriz extracelular. En



los órganos linfoides forman las principales fibras de la matriz. En otros órganos (hígado-riñón) forman la red de soporte de sus células especializadas. Las membranas basales están formadas por colágeno IV.

Los fibroblastos producen el colágeno fundamentalmente, aunque pueden sintetizarse en otras células derivadas del mesénquima, también diversas células epiteliales y endoteliales producen colágeno tipo IV o las membranas basales.^{11,13}



LAMININA.

Estructura

La laminina es una glicoproteína de gran tamaño (850kDa) que presenta dominios funcionales que le permiten interactuar con: receptores para laminina de la membrana plasmática de la célula, heparansulfato, colágeno IV y entactina. Puede además interactuar con otras moléculas de laminina por los extremos de sus 4 brazo formando una estructura laminar. Se concentra hacia la lámina basal.^{11,12}

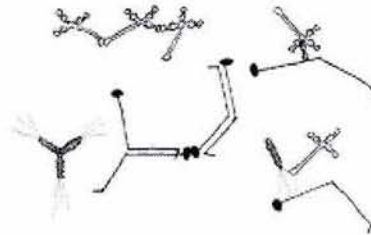


Fig.5 Estructura de Laminina
(<http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/histologiaweb/dibujos.htm>)

Biosíntesis

Fue la primera aislada del tumor de murina Engelbroth-Holm-Swarm (EHS), y del carcinoma parietal de murina. La Laminina es un componente clave de la membrana basal en organismos adultos y en embriogenesis muy tempranas.

Análisis estructurales de este complejo molecular se han usado en combinación con estudios bioquímicos de la glicoproteína intacta, estos fragmentos obtenidos por proteólisis parcial.^{9,15}



Mecanismos de acción

Se ha demostrado que la Laminina participa en un número de interacciones ligadas con diversos receptores celulares. La laminina contiene sitios ligados para otros componentes de la matriz como es el colágeno, la heparina, entactina y proteoglicanos interacciones que juegan un papel importante en el ensamblado y el mantenimiento de las matrices extracelulares. El lugar de algunos de estos enlaces ha sido determinado, principalmente por estudio de las propiedades ligadas a los fragmentos proteolíticos

La laminina es una molécula altamente glicosilada. Laminina EHS tiene un potencial de 46 sitios N-glicosilación en la cadena A y catorce en la cadena B1 y B2. Estudios en la biosíntesis de laminina en cultivos celulares en presencia de tunicamicina demostraron cambios no glicosilados de 300, 205 y 185 kDa para subunidades A, B1 y B2 respectivamente en un acuerdo razonable con los valores esperados (336, 194 y 174 kDa) de secuencias a través de análisis de DNA cíclico. Estos resultados indican contenido carbohidratado cerca del 25%, 10% y 115% por las cadenas A, B1 y B2 del tumor de murina laminina. Análisis estructurales de los glicanos presentan en cada subunidad laminina una formidable tarea dada por el largo número de potencial de los glicanos y muy lejos solo de algunas estructuras disponibles.¹⁵

En adición de interacciones con otros componentes de la matriz, varios sitios son involucrados en la interacción con los receptores celulares, incluyendo los componentes de las integrinas y no integrinas. Muchas células pueden unir y esparcir en la superficie de la capa de Laminina.

La Laminina es el principal componente no colágeno de la membrana basal. En adición de esta asociación con otros componentes de la membrana basal, esto también juega papeles importantes en la unión



celular, crecimiento celular, desarrollo tisular, y diferenciación. La Laminina ha sido difícilmente aislada de la membrana basal normal y tejidos debido a su pobre solubilidad y debido a que únicamente se presenta en estudios de extractos de tejido neoplásico. Mientras que estudios reciente de Laminina aislada de tejidos intactos han demostrado interesante diferencias de los materiales derivados del tumor.¹¹

Función

Como fue indicado anteriormente la mayor parte del conocimiento acerca de la biosíntesis es derivado del estudio de células tumorales. La síntesis de las cadenas de Laminina A y B fue estudiada en células de carcinoma embrionario en Murina F9. Esta diferenciación celular es responsable del ácido retinoico y del AMP cíclico. Esto fue encontrado en células indiferenciadas incorporadas en pequeñas cantidades. Después de 6 días de inducción la síntesis de Laminina fue incrementada por 15 a 20 pliegues por lo que se observaron células indiferenciadas.

Estudios recientes ha indicado que en células F9, solo el complejo AB1B2 siguieron la senda de la glicosilación intracelular esta glicosilación no apareció para ser necesaria por el ensamblado de la subunidad. Esto sugirió que el primer procedimiento de ensamblado por la interacción por parte de dos cadenas B de B1B2 y finalmente de la estructura de AB1 B2. en la línea celular coriocarcinómica fue demostrado que durante la glucosilación post-trancional de cadena A y B, la combinación de subunidades de laminina que se une rápidamente a un disulfuro cuando las subunidades tenían alto contenido de oligosacáridos de manosa pero antes del proceso final de alfa-manosidasa 1. la producción de laminina apareció para ser limitada por la disponibilidad de cadenas A y algunos excesos de B acumulados cada uno en sin combinación de B o de di-disulfuro. Finalmente el ensamblado molecular total sufre mas allá del procesado de



oligosacaridos y translocación de la célula. La molécula de la Laminina madura o adulta no se acumula dentro de la célula pero es rápidamente procesada. La no combinación con cadenas B monómeros no es procesada y no es secretada ¹³



VITRONECTINA.

Estructura

La Vitronectina es una glicoproteína con una masa de 70kDa que participa con las células de adhesión y dispersión. Estructura molecular.

En el plasma la Vitronectina existe en dos formas, en cadena simple y en dos cadenas sostenidas por la unión disulfuro (peso molecular aproximadamente de 65000 y 10000). La Vitronectina es una molécula de forma asimétrica con un largo contenido de estructura beta-laminal. La transición conformacional debe conducir a la activación de los sitios aglutinantes. El dominio de NH₂- terminal B es independientemente del modulo de la estructura plegada la cual precede el dominio de las células aglutinante o adhesivas conteniendo RGD y un altamente dominio ácido homólogo a la hemopexina ^{10,14}

El porcentaje en plasma es de cerca de 200 a 300 mg/ml. La Vitronectina contiene tres sitios potenciales N-glicosilación las estructuras de la unión N de los oligosacáridos presentes en el plasma de Vitronectina en humanos ha sido determinado.¹⁴

Biosíntesis

Los oligosacáridos fueron relacionados con la Vitronectina por la digestión de PNGasa F y añadido con 2-aminopiridina. La piridilamino-oligosacáridos fueron entonces fraccionadas por cambio de anión y fase reversa HPLC. Diez de los principales piridilamino-oligosacáridos fueron aislados. Las uniones y locaciones de residuos del ácido sialico fueron determinadas por desialización con *Salmonella* sialidasa en combinación con ácido. Fue analizado en dos dimensiones en un mapa



carbohidratado , análisis de componentes monosacáridos y espectroscopia de 400 MHz ¹H-NMR. El principal oligosacarido de la Vitronectina humana fue de tipo N-acetilactosamina, con menos.^{13,14}

Mecanismos de acción

La molécula esta relacionada con proteínas en la fase terminal de ambos complementos y la cascada de coagulación y la inhibición citolítica esta también interactúa con células a través de un numero de receptores de integrina conteniendo la subunidad alfa V, principalmente alfa V beta 3. La Vitronectina participa en una variedad de eventos de protección incluyendo homeostasis, fagocitosis, reparación tisular y función inmune. Esto es sintetizado predominantemente en el hígado, pero plaquetas, macrófagos y células de músculo liso pueden producir una molécula similar . la localización inmunofluorescente sugiere que la Vitronectina es depositada en una forma fibrilar en un numero de tejidos conectivos.¹¹

Función

La vitronectina es rápidamente absorbida en una variedad de superficies y puede ser extraída convenientemente en una columna de cuentas de vidrio o por afinidad cromatografica con antivitronectina anticuerpo o agarosa-heparina. Las dificultades principales se relacionan hacia la sensibilidad de las proteasas y de naturalización y las tendencia a la unión de disulfuro o ligomeros. Las moléculas aisladas por cada procedimiento pueden existir en diferentes estados conformacionales.^{11,13,14}

Estructura genética :El gen de la vitronectina humana es de 4.5-5 kb de largo, comprende ocho exones y genera 1.7 kb de RNA mensajero transcriptor. Esto es localizado en la región centromérica del cromosoma humano 17 q.



REACCIÓN INFLAMATORIA EN EL PERIODONTO AL APLICAR MOVIMIENTOS ORTODÓNCICOS

FUERZAS EN ORTODONCIA

La biomecánica es la ciencia que trata la acción de las fuerzas sobre los cuerpos. La ortodoncia se define como la ciencia que se encarga del movimiento dentario cuando se ejerce una fuerza dirigida sobre los dientes (fuerzas ortodóncicas).

Las fuerzas se pueden producir en la cavidad bucal por contracciones musculares, cuando los dientes ocluyen, con aparatología ortodóncica.

Al aplicar una fuerza a la estructura del diente se genera ciertas reacciones como son:

Tensión: Es un cambio en la forma o en el tamaño de un cuerpo en el sentido de estiramiento que responde a una fuerza aplicada. Es la fuerza de tracción por unidad de superficie.

Presión: Es un cambio en la forma o en el tamaño de un cuerpo en el sentido de apretarse que responde a una fuerza aplicada. Es la fuerza de compresión por unidad de superficie.

Fuerza: toda causa que actúa sobre un cuerpo y tiende a modificar su estado de movimiento o de reposo. Es toda causa capaz de poner en movimiento o de cambiar la forma de un cuerpo.

Intensidad: es la magnitud de la fuerza. Es la cantidad de fuerza que se aplica.

Punto de aplicación: donde actúa la fuerza, punto de origen del vector: donde comienza la fuerza.



Dirección: recta sobre la que actúa. Sentido: hacia donde se desplaza la fuerza

Los componentes de las fuerzas pueden ser Intensidad, Punto de aplicación, punto de origen del vector sentido y dirección.³

Las fuerzas pueden ser continuas, disipantes, intermitentes y funcionales

Continuas: Estas actúan por un tiempo definido, mantienen la misma intensidad sobre resortes o muelles.

Disipantes. Son de intensidad decreciente, más frecuentes en ortodoncia presentes en arcos de ligaduras para brackets.

Intermitentes. Actúa en los periodos que lleva puestos el aparato, los periodos de descanso sirven para recobrar la estructura ósea y de los ligamentos.

Funcionales. Cuando se transmiten por fuerza muscular.

Hueso alveolar.

El hueso alveolar está formado por dos fracciones, Fracción celular compuesta por osteocitos y osteoblastos y Fracción extracelular: compuesta a su vez por materia orgánica que están constituida por Colágeno (70 %), Proteínas (5 %) y Agua y materia inorgánica constituida en un 70% de Hidroxiapatita

El hueso alveolar es mucho más inmaduro que resto del hueso del organismo debido a su continuo sometimiento a fuerzas. Es mas esponjoso y menos calcificado que el hueso basal. Es deformable y posee fibras más irregulares. Es también transformable según las fuerzas que se apliquen.⁶



Raíz.

Al igual que el hueso alveolar lo podemos distinguir en dos fracciones: Fracción celular: compuesta por cementoblastos y cementocitos. Fracción extracelular que esta compuesta por materia orgánica (colágeno en forma de fibrillas) 23 % materia inorgánica 65 % y Agua 12 %

Los osteoclastos y los cementoclastos son los encargados de la reabsorción del huesos y del cemento respectivamente. Son células gigantes multinucleadas derivadas de los monocitos de la sangre. No derivan de células locales.⁶

El ligamento periodontal está formado por una red de fibras colágenas. Posee distintos componentes en el se encuentran elementos celulares células mesenquimales indiferenciadas fibroblastos y fibroclastos, cementoblastos y osteoblastos que contienen elementos vasculares, Terminaciones nerviosas amielínicas, Presorreceptores y Propioceptores.

En el fluido intersticial, con las fuerzas de oclusión este se mueve y se escapa por los poros del hueso si la fuerza es mayor de dos segundos.

Las funciones del ligamento periodontal son unir el diente al hueso, recibir, transmitir las fuerzas de masticación y los movimientos eruptivos, estabilizar los movimientos dentarios, por esto tiene un potencial dinámico para modificar la posición del diente.^{6,23}

Reacciones del periodonto ante una fuerza

Se generan dos tipos de presiones: Una que se enfrenta al movimiento. Zona donde el diente se comprime contra el hueso, también llamada zona de presión.

Y otra parte justo del lado contrario a la anterior en la cual se tracciona del hueso, también llamada zona de tensión.^{2,3}



En la zona de presión se produce reabsorción ósea y en la zona de tensión se produce aposición ósea. Una de las constantes del organismo es mantener el tamaño del alveolo.^{2, 23}



TÉCNICAS DE OBTENCIÓN Y DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

El procedimiento para la obtención de la muestra fue de la siguiente forma: Se realizó un raspado periodontal obteniendo los ligamentos periodontales, estos serán homogenizados en un buffer de Tris-Sacarosa-EGTA (Tris 0.01 M; Sacarosa 0.255 M; EGTA 0.3mM, pH 7.4). La cantidad de proteína se cuantificará en las muestras utilizando albúmina de suero bovino como estándar por la técnica de Lowry (1951).^{18,19}

Determinación de la presencia de las moléculas de adhesión celular (laminina, vitronectina, colágena I, III, IV) del ligamento periodontal por Western blot.²²

Una vez obtenidas las muestras del ligamento periodontal serán lavadas dos veces con PBS frío (pH 7.4) con centrifugaciones a 360 revoluciones por minuto (RPM) durante 10 minutos. Las muestras serán lisadas con un buffer de lisis que contenga (Tris-HCL 100 mmolas/L, KCL 5 mmolas/L, SDS 1%, NP-40 0.5%, e inhibidores de proteasas, RNAsa y DNAsa, pH 8). La mezcla se incubará por 10 minutos en hielo y se centrifuga a 680 RPM por 10 minutos. Se recuperará el sobrenadante el cual es considerado como extracto crudo de proteínas.²⁰

Las muestras (20 µg) del extracto crudo de proteína serán sometidas a una electroforesis vertical en geles de acrilamida a 8% y al 10%, de acuerdo a la técnica descrita por Cumming y cols. (1996). Aquí las muestras serán sometidas a una electroforesis de poliacrilamida con SDS al 10% y la corrida se llevará a cabo por 2 horas a 100 volts. Los geles resultantes serán preparados para inmunoblot. El inmunoblot se llevará a cabo en un medio de transferencia (Tris-metanol-glicina; 50/25/12 p/p) en cámara de transferencia, utilizando papel de nitrocelulosa como membrana receptora. La transferencia será realizada toda la noche. La



membrana de nitrocelulosa será lavada dos veces con PBS y bloqueada por 2 horas a temperatura ambiente con una solución de PBS que contenga 5% de leche en polvo descremada y 0.5% de tween-20. Al término del bloqueo, los anticuerpos monoclonales o policlonales dirigidos en contra de las proteínas específicas (anti-moléculas de adhesión) serán utilizados posteriormente para su detección con anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa o fosfatasa alcalina. La cantidad de proteína será determinada en cada muestra de acuerdo a la técnica ya descrita por Lowry y cols. (1951), utilizando albúmina bovina como estándar.^{17,19}

Extracción de RNA y análisis por Northern blot de las moléculas de adhesión celular adhesión (laminina, vitronectina, colágena I, III, IV) del ligamento periodontal.

La obtención del RNA total de las células del ligamento periodontal será llevado a cabo de acuerdo a la técnica de Chomczynski y Sacchi (1987)^{5, 20}. Una vez obtenidas las muestras en cuestión, estas serán inmediatamente homogenizadas en una solución de lisis que contenga tiocianato de guanidina (4 mol/L), SDS 0.5% y Tris-HCL (50 mmolas/L, pH 8) e inhibidores de proteasas y de RNAasa y DNAasa. Posteriormente se centrifugará a 2250 RPM por 10 minutos y se recuperará el sobrenadante al cual se le agregará un volumen de fenol saturado con agua, seguido de agitación (vórtex).

El resultado será centrifugado a 2250 RPM por 10 minutos y se recuperará la fase acuosa a la cual se le agregará acetato de sodio (5 mol/L), y una mezcla de cloroformo-alcohol isoamilico (24/1 v/v). El resultado se mezcla cuidadosamente y se centrifuga para recuperar la fase acuosa. El RNA total será precipitado de esta fase acuosa agregando 2 volúmenes de etanol absoluto e incubándose a -20 °C toda la noche. Al terminó de la precipitación el contenido será centrifugado a 4500 RPM por 10 minutos y el botón de RNA se lavará dos veces con



alcohol al 70%. El RNA total será resuspendido en una cantidad adecuada de un buffer que contenga Tris-ácido bórico-EDTA (TBE, esta base 89 mmoles/L, ácido bórico 89 mmoles/L, EDTA 2 mmoles/L, pH 7.6). El RNA (20 µg) resultante será sometido a técnicas de Northern blot de acuerdo a Kamimura y Tsukamoto (1995) para la detección de los RNAm que se requieran por medio de una electroforésis horizontal en geles de agarosa con formaldehído (agarosa 1%, formaldehído 12.3 mmoles/L, disueltos en buffer de TBE), de 2-3 horas a 75 volts.^{15,18,20,22}

Al término de la electroforésis los geles serán preparados para una transferencia a papel de nylon. Esta transferencia consiste en colocar encima del gel de agarosa una hoja de membrana de nylon en un medio altamente astringente para realizar la transferencia de nucleótidos del gel a la membrana por capilaridad. Al término de la transferencia las membranas serán incubadas con las sondas específicas para los RNAm de cada uno de nuestras moléculas de interés, haciendo la determinación por marcaje por fósforo radioactivo y placas radiográficas adecuadas.²²

Técnica de Lowry.

la técnica de lowry es un experimento que nos ayudo a cuantificar las proteínas presentes en el ligamento periodontal que se extrajo de los pacientes. Funciona dividiendo la mayoría de las sustancias. En esta técnica pueden quitarse precipitando las proteínas de mayor peso molecular.

Se tiene la ventaja de que la cuantificación es un dato confiable y la variación es mínima entre las diferentes proteínas. Pero también tiene sus desventajas que son: Mucha interferencia de las sustancias, proporción de la reacción lenta, inestabilidad de ciertos reactivos, proteína que se desnaturalizan irreversiblemente.¹⁷



El espectrofotómetro va a tener un rango de sensibilidad de 5mg/ml-100mg/ml.^{15,20}

Para llevar a cabo la técnica se necesito: Espectrofotómetro, Tubos de ensaye, Pipetas de 10ul, 200ul, 1ml, Puntas para las pipetas Gradilla para tubos de ensaye mezclador de espectrofotómetro, Reactivos: Solución A, solución B, solución C, solución D, folín y agua destilada.

Curva de proteínas: Con esta técnica cuantificaremos la cantidad de proteínas presentes en el ligamento periodontal que de ahora en adelante se le llamara muestra.

ELECTROFORESIS.

Aspectos Generales de los Geles

Los geles de 1D son el método clásico de separación de la 1D. Este método ha sido substituido por los SRTIPS por su fácil manejabilidad. Pero en casos concretos de muestras que se encuentran en tampones especiales (grandes cantidades de sal, etc) es necesario recurrir a ellos. También en la separación de las proteínas muy básicas este es el método que mejor funciona tabla 1.¹⁸



Preparación de los geles SDS-PAGE

En ml	7,5 %	10%	12,5%	15%
Acrilamida/Bis		215,1	269,7	
Tris HCl pH 8,8		160,3	160,3	
H₂O		266,5	211,0	
10% SDS		6,5	6,5	
TEMED		0,32	0,32	
APS		1,3	1,3	
TOTAL		650	650	

Tabla 1.-Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

<http://discover.bio-rad.com/>

La electroforesis de proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida, comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es sin duda alguna una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra pues se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.^{15,20,22}

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga un pH diferente al de su punto isoeléctrico y por eso tienen la propiedad de desplazarse cuando se someten a un campo eléctrico. La velocidad de migración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Cuanto mayor carga por unidad de masa más rápida será la migración. Empleando geles de sílice o de acetato de celulosa y aplicando las proteínas en una zona estrecha en torno a los electrodos se pueden determinar diferencias de carga neta (carga total/masa) entre proteínas. Este método se denomina electroforesis zonal. La matriz de poliacrilamida no es un buen soporte para este



método pues la migración de las proteínas en su seno no sólo es proporcional a la carga neta sino también al tamaño y forma de las proteínas.²¹

Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pHs, temperatura y fuerza iónica.

Algunas características destacables de la electroforesis en geles de poliacrilamida son : Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzador ('cross-linking'), la bis-acrilamida en presencia de un iniciador y un catalizador. Como iniciador se suele utilizar TEMED (N,N,N,N'-tetrametilnediamina) y como iniciador el ión persulfato (S₂O₈⁻) que se añade en forma de persulfato amónico. En algunas situaciones, como por ejemplo en el isoelectroenfoco en el que la presencia de persulfato puede interferir con la electroforesis se emplean ribofavina y TEMED.²²

Las soluciones de acrilamida se desgasifican pues el oxígeno es un inhibidor de la polimerización. Además, durante la polimerización se libera calor que podría provocar la formación de burbujas en el seno del gel.

La velocidad de polimerización viene determinada por la concentración de persulfato (catalizador) y TEMED (iniciador).

La porosidad del gel la determina las proporciones relativas de poliacrilamida y bis-acrilamida, siendo menor el poro cuanto más bisacrilamida vs. acrilamida se use.

El porcentaje total de acrilamida/bisacrilamida determina el rango de separación del gel. Habitualmente los geles se denominan en función del % de acrilamida/bisacrilamida que contienen. Así, la mayoría de las proteínas se separan bien en el rango 5 a 10%. Un menor porcentaje (mayor tamaño de poro) es mejor para separar proteínas de gran tamaño.



En función del estado de las proteínas (nativo o desnaturalizado) a lo largo del proceso electroforético éstas se clasifican en electroforesis nativas o desnaturalizantes.^{24,25}

Una electroforesis desnaturalizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturalización (pérdida de la estructura tridimensional). En esta situación la migración es proporcional a la carga y al tamaño de la molécula pero no a su forma. El agente desnaturalizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.

Una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturalización. En esta situación las proteínas migran en función de su carga, de su tamaño y de su forma. Además se mantienen en ciertos casos las interacciones entre subunidades y entre proteínas, separándose los complejos. Los sistemas tampón empleados en estos caso son : tris-glicina (rango de pH 8.3 a 9.5), tris-borato (rango de pH 7.0 a 8.5) y tris-acetato (rango de pH 7.2 a 8.5).

Tipos de electroforesis

SDS-PAGE es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada. Su nombre significa la electroforesis en geles de poliacrilamida que se realiza en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli (Lammeli (1970), Nature, 277, p. 680) Se trata de un tipo de electroforesis desnaturalizante en la que las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturalizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.^{22,23,24}

En general se emplean sistemas de dos tampones (discontinuos). Este sistema permite la separación de volúmenes relativamente grandes de muestra sin pérdida de resolución. La concentración se produce por



isotacoforesis de la muestra en el primer gel ('stacking'). El efecto de estrechamiento de las bandas se basa en el hecho de que los iones glicinato, relativamente cargados negativamente (en el depósito de tampón superior) tienen una movilidad electroforética inferior que los complejos de proteínas-SDS. que a su vez tienen menor movilidad que los iones Cl^- de los tampones de carga en el gel de apilamiento ('stacking'). Cuando se conecta la diferencia de potencial todas las especies han de migrar a la misma velocidad para mantener el circuito eléctrico. Los iones glicinato sólo se pueden desplazar a la misma velocidad que los iones Cl^- si hay una región de 'field strenght'. 'Field strenght' es inversamente proporcional a la conductividad que es a su vez proporcional a la concentración, El resultado es que las tres especies de interés ajustan sus concentraciones de forma que $[\text{Cl}^-] > [\text{proteína-SDS}] > [\text{glicinato}]$. Como sólo hay una pequeña concentración de proteína-SDS las tres se concentran en una banda muy delgada entre las fronteras de migración del Cl^- y del glicinato. Cuando el glicinato alcanza el borde del gel de separación adquiere una mayor carga en el nuevo medio, con un pH superior, e incrementa su movilidad. A partir de ese momento la interfase entre el glicinato y el Cl^- deja atrás a los complejos de proteína-SDS que se desplazarán a su propia velocidad.^{20,25}

SDS es un detergente de acción desnaturalizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturalizadas con una relación de 1.4 g de SDS por g de proteína, uniéndose aproximadamente una molécula de SDS por cada dos aminoácidos de la cadena. Esta unión masiva de moléculas de SDS bloquea la carga propia de la molécula de proteína y le confiere al complejo una carga neta negativa proporcional a su masa, haciendo que todas las proteínas acomplejadas con SDS viajen hacia el ánodo. La separación de los complejos SDS-proteína es proporcional sólo a la masa de la proteína pues todas tienen la misma carga por unidad de masa. Se puede entonces determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos



moleculares conocidos. Las moviidades de las proteínas en los geles de SDS-PAGE son funciones lineales del logaritmo de su peso molecular.

Colorantes.

La tinción con azul de Coomasie permite detectar hasta 0.2 a 0.6 microg de proteína, y es cuantitativo (lineal) hasta 15 a 20 microg. Se emplea habitualmente en soluciones de metanol-acético y se destiñe por difusión en soluciones de isopropanol-acético. Para la tinción de geles se recomienda eliminar los amfólitos mediante inclusión de tricloroacético (TCA) en el colorante y la destinción en ácido acético.

La formula para teñir con Coomasie es : Solución de Azul de Coomasie : 0.2 g de azul Coomasie en 90 ml de metanol: agua 1:1 v:v y 10 ml de ácido acético glacial.

Tinción : sumergir el gel en 5 vol. de colorante al menos 1 h con agitación suave (el máximo se consigue en 3 h).

Destinción : habitualmente mediante cambios repetidos de 10% acético en 20% metanol:agua. Se puede conseguir muy rápidamente mediante electroforesis.^{20,24,25}

Métodos de transferencia a filtros

La transferencia de proteínas o 'blotting' supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas, seguido de la detección empleando sistemas especialmente diseñados para la tinción de 'blots'. El método más potente es el denominado 'Western blot' en el que las proteínas son separadas en primer lugar mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y posteriormente se transfieren mediante la aplicación de un campo eléctrico perpendicular al gel a una membrana. El procedimiento es análogo al desarrollado por el Prof. E. Southern



('Southern blotting') y por ello se le denominó 'Western'. Hay sin embargo otros métodos de transferir o aplicar proteínas sobre una membrana. El más sencillo es aplicarlas directamente en forma de una pequeña gota de una solución concentrada sobre la membrana. La absorción de la gota provoca la adhesión de la proteína a la membrana, quedando en forma de una mancha o 'dot' (es el caso del 'dot blot').

las proteínas son transferidas desde el gel a la membrana electroforéticamente. La ventaja de este proceso es su corta duración (de 30 min a pocas horas), lo que reduce notablemente el efecto de difusión de las bandas. El procedimiento se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro empapado en tampón de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana. Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en un tanque en el que se encuentra una solución salina (tampón de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). La carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es positiva debida a la carga del SDS.

La electroforesis se realiza a 8-10 V/cm (de separación entre electrodos), que suele corresponder a 0.3 a 2. Amp de 1 a 4 h. La velocidad de transferencia es inversamente proporcional al tamaño de la proteína.

El proceso provoca un fuerte calentamiento de la solución por lo que se recomienda refrigerar el sistema y recircular el tampón.

Una vez realizada la transferencia la membrana se puede analizar inmediatamente o bien conservarla en frío (2 a 8°C) durante meses.



Existen diferentes combinaciones de soluciones de transferencia y de membranas para cada aplicación. En la tabla 2 se incluyen algunas de las más características.

Gel	Tampón de transferencia	Membrana
SDS-PAGE (Lamlli) O'Farrell 2D	25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% v/v metanol, pH 8.3	Nitrocelulosa Papel de intercambio iónico PVDF
SDS-PAGE O'Farrell 2D	25 mM Tris, 192 mM glicina, pH 8.3	Nitrocelulosa, Nylon, Papel de intercambio iónico, PVDF, papel dialo-modificado
Native PAGE (proteínas ácidas o básicas)	25 mM fosfato sódico, pH 6.5	papel dialo-modificado
	15 mM borato sódico, pH 9.2	papel dialo-modificado
IEF, Native-PAGE (proteínas básicas), geles de urea ácidos	0,7% ácido acético	Nitrocelulosa, Nylon, papel dialo-modificad

Tabla 2 Condiciones de electroblotting más comunes.

<http://www.ub.es/biocel>

El grosor del gel es un factor que influye notablemente en la transferencia, siendo muy ineficiente a partir de geles de 2 mm de espesor, y tanto más eficiente cuanto más fino es el gel, con un límite debido a los problemas de manipulación en torno a los 0.4 mm.^{19,21}

La membrana que se emplea más frecuentemente es la nitrocelulosa, aunque cuando se requieren soportes más robustos, por ejemplo cuando la membrana ha de ser reutilizada diversas veces se recurre al Nylon. sin embargo las membranas de Nylon se bloquean con más dificultad que las



de nitrocelulosa y suelen presentar mayor 'background'. Las membranas de PVDF tienen gran capacidad de unión a proteínas y gran resistencia mecánica pero se humedecen con más dificultad.

Todas las membranas son hidrofóbicas y requieren un tratamiento previo con metanol antes de sumergirlas en soluciones acuosas.

Es importante incorporar en el gel a transferir un control de la transferencia que habitualmente es el propio carril donde se han cargado los marcadores de peso molecular que al transferirlos se tiñen sobre el filtro para ver si la transferencia de toda la gama de pesos moleculares ha sido correcta.^{22,24,25}



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No se conoce bien la influencia que puedan generar los movimientos ortodóncicos sobre las moléculas de adhesión celular del ligamento periodontal. Se sabe que al realizar movimientos de ortodoncia se genera una respuesta inflamatoria y se han detectado numerosos mediadores químicos que intervienen en la respuesta inflamatoria, como son las prostaglandinas, interleucinas, factores de necrosis tumoral, etc.

No se ha evaluado la presencia y posible incremento de las moléculas de adhesión celular en el ligamento periodontal al iniciar movimientos ortodóncicos.



JUSTIFICACIÓN

Al existir una alteración del tejido periodontal por enfermedad o por estimulación mecánica, se requiere que se restaure este tejido conectivo, desencadenándose una serie de eventos que inician, mantienen y terminan estas remodelaciones. Las moléculas de adhesión celular se describen como reguladoras de estos eventos, en los cuales existe una comunicación celular medida por estas moléculas que regulan su actividad celular, pero en la actualidad se desconocen cual o cuales de estas moléculas están estrechamente involucradas en este proceso cuando se inducen movimientos ortodóncicos. En especial nada está descrito sobre la expresión de estas moléculas en el ligamento periodontal en humanos.



OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERAL

Determinar el efecto de los movimientos ortodóncicos en la expresión de la Laminina, colágena y Vitronectina moléculas de adhesión celular del ligamento periodontal en humanos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Correlacionar la(s) modificación(es) de las moléculas de adhesión celular con los movimientos ortodóncicos.

Determinar la cantidad de Laminina, Colágena y Vitronectina presentes durante el movimiento dental así como la que esta presente en el ligamento cuando no se aplica movimiento dental, por medio de la utilización del Western blot, electroforesis y la determinación de proteínas con anticuerpos.



HIPÓTESIS

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los movimientos ortodónticos en el ligamento periodontal producen inflamación debido a que las fuerzas aplicadas producen aumento de las proteínas de adhesión Colágena, Vitronectina y Laminina

HIPÓTESIS NULA

El ligamento periodontal al aplicar los movimientos ortodónticos, no existe ni se modifica la presencia de proteínas de adhesión.



METODOLOGÍA

En esta investigación se estudio el ligamento periodontal de los premolares sometidos a presión ortodóncica, en 5 pacientes, los cuales recibirán tratamiento en la Clínica de Ortodoncia de la División de Estudios de Postgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Dichos pacientes en los cuales su plan de tratamiento contemple extracciones de primeros premolares superiores, inferiores o ambos. La aparatología se aplico en todos los dientes de ambas arcadas y fueron ligados con módulos elásticos, con excepción de 5 premolares izquierdos programados a extracción (que fueron considerados como grupo control). Se realizo la extracción de los premolares en la Clínica de Cirugía de la misma institución obteniendo las muestras del ligamento periodontal de la zona cervical, media y apical del premolar control y de los premolares con aparatología. Todas las muestras fueron colocadas en suero fisiológico para su posterior procesamiento.

El ligamento periodontal recolectado tanto de los pacientes con tratamiento ortodóncico como de pacientes que no reciben tratamiento de ortodoncia, fueron sometidos a Western blot . Como a continuación se describe:

Se colocaron 11 tubos de ensaye en una gradilla (Fig. 6) de los cuales se tomaron 10 tubos de ensaye y se les colocaron dos tubos por muestra y el ultimo se utilizo como tubo blanco (sin muestra).²²

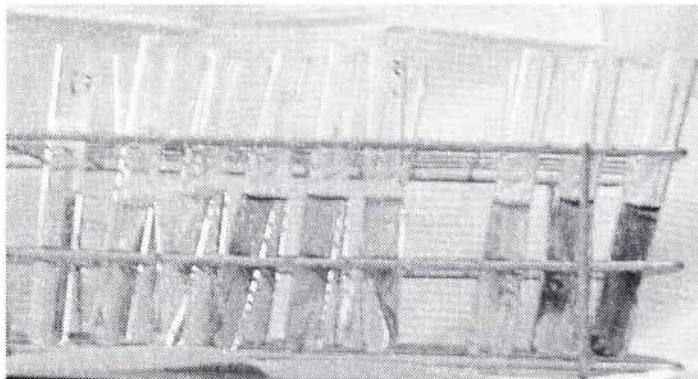


Fig. 6.- se observan 10 tubos con muestra y uno sin muestra (tubo blanco a la izquierda) Instituto de Bioquímica Médica FES Iztacala

A los once tubos se les colocó 1 ml de agua destilada, solución C (que es la combinación de la solución A y B) 3 ml, y se procede a colocar en los 10 tubos 0.50 μ l de muestra con las pipetas (Fig. 7) se deja reposar las soluciones 15 minutos.

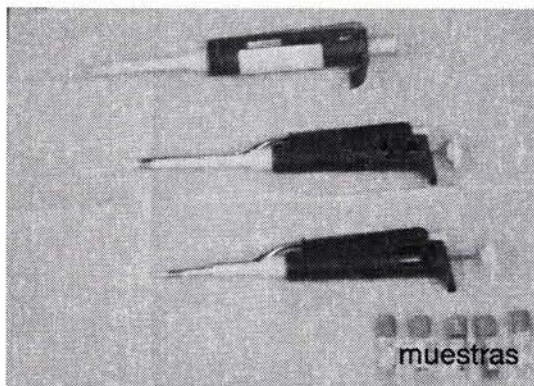


Fig. 7 pipetas y muestras

Instituto de Bioquímica Médica FES Iztacala

Mientras tanto se preparó la solución D que contiene 2.2 ml de folín y 2.2 ml de agua destilada. Transcurrido el tiempo se le coloca .300 μ l de esta solución a los once tubos se mezcla y se deja 30 minutos.

El espectómetro tiene que estar listo para recibir las soluciones, se pone para que tenga una lectura de 660 nm, (fig 8) para que se le coloque nuestro tubo blanco esto sirve para que se identifiquen las soluciones excepto por supuesto la muestra que es la que se quiere reconocer y cuantificar.^{20,21,22}

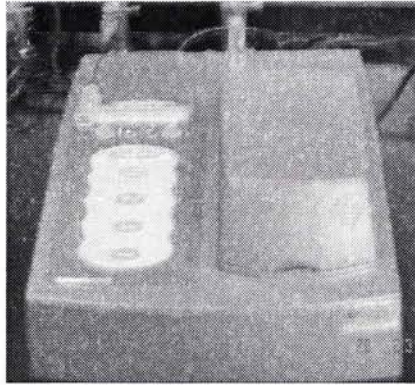


Fig.8 espectrofotómetro
Instituto de Bioquímica Médica FES Iztacala.

Una vez que el espectrómetro marco cero con el blanco, se colocaron uno por uno los tubos de ensaye dando como resultado la siguientes lecturas tabla 3

		H ₂ O	Muestra	Sol. C	Sol.D	Tubo 1	Tubo 2	promedio	formula
Blanco		1 ml		3 ml	.300µl				
M 1	14 VI	1 ml	.050 µl	3 ml	.300µl	.071	.052	.061	11.02
M 2	24 V	1 ml	.050 µl	3 ml	.300µl	.003	.007	.058	1.46
M 3	45 B	1 ml	.050 µl	3 ml	.300µl	.006	.005	.006	11.02
M 4	15 I	1 ml	.050 µl	3 ml	.300µl	.006	.011	.008	1.00
M 5	44SAR	1 ml	.050 µl	3 ml	.300µl	.006	.006	.014	15.20

Tabla 3. tabla de resultados y porcentajes de las muestras.

Los porcentajes de proteína los llevamos al 80% (tabla 4) para después colocar estos porcentajes en el gel de poliacrilamida.

Muestra 1	80% 32µl
Muestra 2	80% 23.6 µl
Muestra 3	80% 32 µl
Muestra 4	80% 23.6 µl
Muestra 5	80% 20.8 µl

Tabla 4. muestras al 80%



Las muestras se homogenizaron con azul de comazie al 1-1 esto quiere decir que se colocó la misma porción de comazie y de muestra. Se colocó 100 μ l de comazie y 100 μ l de muestra.

Una vez que se tiene la muestra en comazie se prepara el gel de poliacrilamida para colocar las muestras en los pozos Fig. 9

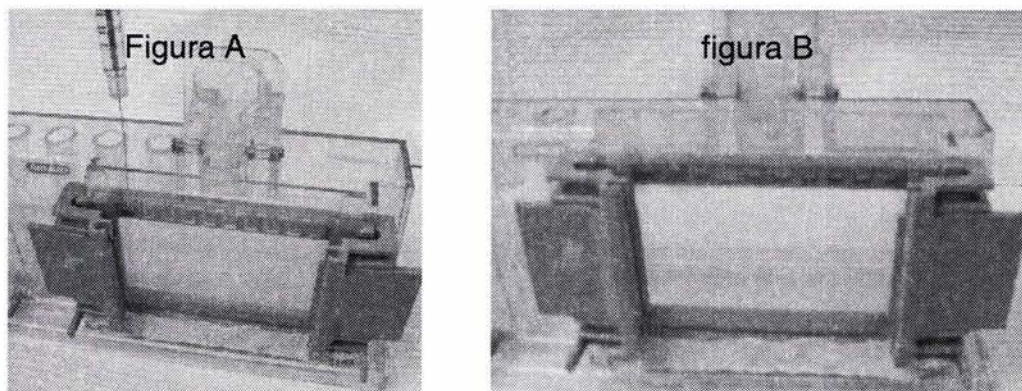


Fig. 9. A colocación de las muestras en los pozos
Instituto de Bioquímica Médica FES Iztacala.

Una vez que se colocaron las muestras en los pozos se mete a la cámara de electroforesis fig. durante 1:00 hr. a un amperaje de 160 mili amperes y se espera que las proteínas corran por el gel Fig.10



Fig.10 en A cámara de electroforesis Fig. B controlador del mili amperaje
Instituto de Bioquímica Médica FES Iztacala.



Las proteínas una vez que están sobre el gel se siguió con el procedimiento de transferencia el cual consiste en transferir las proteínas a una membrana electroforetica. . La ventaja de este proceso es su corta duración (de 30 min a pocas horas), lo que reduce notablemente el efecto de difusión de las bandas. El procedimiento se inicia apilando sucesivamente sobre una esponja plana papel de filtro empapado en tampón de transferencia, el gel, la membrana en contacto directo con el gel, más papel de filtro y finalmente una esponja plana Fig.11 . Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en un tanque en el que se encuentra una solución salina (tampón de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel).

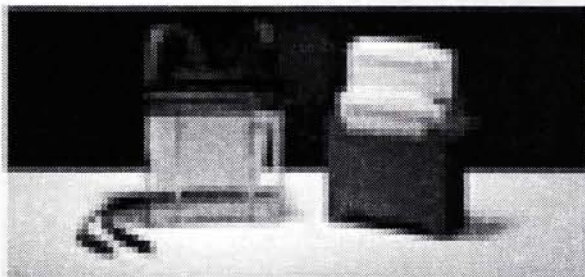


Figura.11 cámara para transferencia electroforetica
Instituto de Bioquímica Medica FES Iztacala

Este conjunto se recoge entre dos capas de plástico perforado y se introduce en un tanque en el que se encuentra una solución salina (tampón de transferencia) y dos electrodos planos (diseñados para conseguir un campo uniforme en toda la superficie del gel). Se dispone de forma que el gel quede hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+). La carga neta de las proteínas en el caso de los geles de SDS-PAGE es positiva debida a la carga del SDS.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



CONCLUSIONES

Se llego a la conclusión de que en los movimientos ortodóncicos si existe la presencia de proteínas de adhesión, que las proteínas son de alto peso molecular por lo que se tubo que realizar un gel de mayor poro (al 8%) pero debido a las características del seminario de titulación no se logro determinar que proteínas específicamente existe en los movimientos ortodóncicos ni se logro cuantificar la proteína esperada.

Este trabajo se seguirá investigando para presentarlo mas adelante con todos los discusiones y resultados esperados



BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Weckmann AL, Cabral AR. Novedades moleculares y clínicas de las colágenas .*Rev Invest Clin* 1996; 48(3): 207-221
- 2.- Michael Ward and David Marcey. *Fibronectin, an Extracellular Adhesion Molecule*© David Marcey, 2001
- 3.- Louis A. Norton, Kim L. Andersen. Estudio metodológico de los cambios en la forma de las células orales con un estímulo de tensión ortodóntica. *Archs oral Biol.* Vol 40, No. 9 , pp 865-872.
- 4.- R. C Shore. Modelo que explica el aparente movimiento oclusal de las proteínas del ligamento periodontal en incisivos de ratones. *Archs Oral Biol.* Vol. 24. pp 861-862.
- 5.- M.J. Somerman. Diferentes respuestas de sujeción de las células del ligamento periodontal y los fibroblastos gingivales *J: Perodontol* February, 1989. pp. 73-77.
- 6.- Metzger Z. Diferentes efectos quimiotácticos en el cemento con la unión de proteínas en las células del ligamento periodontal. *J Periodont Res* 1998; 33: 126-129.
- 7.- <http://escuela.med.puc.cl/paginas/cursos/histologiaweb.html>
- 8.- <http://escuela.med.puc.cl/histologia/histologiaweb/paginas/dinujosBIG.gf/d40bigCO.html>.
- 9.- M.A. Harson and Hassell Pas. *EXTRACELLULAR MATRIX A PRACTICAL APPROACH*. The practical Approach series, 1995; pag 1-16-404
- 10.- Marcel E Nimni. *COLLAGEN VOLUME I BIOCHEMISTRY*. Crc press inc boca Rater Florida 299
- 11.- Marcel E Nimni. *COLLAGEN VOLUME II BIOCHEMISTRY*. Crc press inc boca Rater Florida 299



- 12.- Peter D. Yurchenco and David E. Birk and Robert P. Mecham. EXTRACELLULAR MATRIX ASSEMBLY AND STRUCTURE. Academic Press New York-350-385
- 13.- Chapman and Hall. OUTLINE STUDIES IN BIOLOGY GLUCOPROTEINS. London New York pag. 95
- 14.- Shirley Ayad and Ray P. Boot-Handford and Martin J. Humphries. THE EXTRACELLULAR MATRIX FACT BOOK SERIES. Second edition. San Diego, London pag 301
- 16.- P. Marle Bartold, PhD A Sapath. BIOLOGY OF THE PERIODONTAL CONNECTIVE TISSUES. Narayanan PHD Puntessene Books P. 104-106
- 17.- Chomczynski P, Sacchi N (1987). Single-step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-59.
- 18.- Cumming RC, Liu JM, Youssoufian H, Buchwald M (1996). Suppression of apoptosis in hematopoietic factor-dependent progenitor cell lines by expression of the FAC gene. *Blood* 88:4558-67.
- 19.- Kamimura S and Tsukamoto H (1995). Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 21:1304-09.
- 20.- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:266-75.
- 21.- Niemela O, Parkkila S, Ylä-Herttuala S, Villanueva J, Ruebner B and Halsted CH, Sequential acetaldehyde production, lipid peroxidation, and fibrogenesis in micropig model of alcohol-induced liver disease. *Hepatology* 22:1208-1214, 1995.



22.- Morales-González JA, Gutiérrez-Salinas J, Yáñez L, Villagómez-Rico C, Badillo-Romero J and Hernández Muñoz R, Morphological and biochemical effects of a low ethanol dose on rat liver regeneration. Role of route and timing of administration. Dig Dis Sci 44:1963-1974, 1999.

23.-Flávio Vellini-Ferreira. ORTODONCIA DIAGNOSTICO Y PLANIFICACIÓN CLÍNICA. Artes medicas latinoamericana. Pág. 11-25

24.- <http://discover.bio-rad.com>

25.- <http://www.ub.es/biocel>



ANEXOS

Las soluciones para la determinación de proteínas fueron las siguientes:

REACTIVOS:

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O} (2\text{H}_2\text{O})$

Na_2CO_3

NaOH

Folin

SOLUCIONES:

Solución A, 100ml

0.5g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

1 g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O} (2\text{H}_2\text{O})$

100 ml de agua destilada

conservar en refrigeración

Solución B 1 litro

20g Na_2CO_3

4g NaOH

1 litro de agua destilada conservar en refrigeración

Solución C 51 ml

1 ml de solución A

50 ml de solución B

solución D

10 ml de folin

10 ml de agua destilada



GELES DE POLIACRILAMIDA

Solución 1: 4 ml

Solución 2: 4.3 ml

Solución 4: 0.110 μ l

Agua destilada: 2.1 ml

PONDS: 0.150 μ l

TEMED: 0.010 μ l

GEL EMPACADOR:

Solución 1: 4.370 μ l

Solución 3: 0.162 μ l

Solución 4: .120 μ l

Agua destilada: 1.300 ml

PONDS: 0.045 μ l

TEMED: 0.008 μ l

BUFER PARA TRANSFERENCIA:

Tris 5.8 Trizma base

Glicina 29 gr

SDS sodio diodecilsulfato 1.0 gr

Metanol 200 ml

Llevar a un litro con agua conservar en refrigeración

AZUL DE COMASIE

SDS 10% 4 ml

2 mercaptanol: 2 ml

Tris ph 8 al 1 molar 2.5 ml

Glicerol 2 ml

Mercaptoptanol: 1 ml

Llevar a 10 ml con agua mantener refrigerado