

Revista de la Asociación Dental Mexicana

Volumen **62**
Volume

Número **5**
Number

Septiembre-Octubre **2005**
September-October

Artículo:

Cambios en la expresión de laminina en
el ligamento periodontal en dientes
sujetos a tensión ortodóntica en
humanos

Derechos reservados, Copyright © 2005:
Asociación Dental Mexicana, AC

**Otras secciones de
este sitio:**

- ☞ Índice de este número
- ☞ Más revistas
- ☞ Búsqueda

*Others sections in
this web site:*

- ☞ *Contents of this number*
- ☞ *More journals*
- ☞ *Search*



edigraphic.com

Cambios en la expresión de laminina en el ligamento periodontal en dientes sujetos a tensión ortodóntica en humanos[§]

José Gutiérrez Salinas,* José Antonio Morales González,** Leila D Vargas Castro,*** Francisco Marichi Rodríguez,*** Jaime Esquivel Soto***

* Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, División de Investigación Biomédica, Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE, México DF
** Profesor de la Escuela de Dietética y Nutrición, ISSSTE, México DF
*** Facultad de Odontología, UNAM.

§ Trabajo apoyado parcialmente por la Sociedad Mexicana de Investigación Biomédica AC.

Resumen

Objetivo: Determinar la presencia de laminina, en el ligamento periodontal (LPD) en premolares a los que se les aplicó fuerzas ortodónticas. **Hipótesis:** La laminina presente en el ligamento periodontal de dientes sujetos a presión ortodóntica presentará modificaciones en su expresión. **Diseño, material y métodos:** Se colocó aparatología en sujetos clínicamente sanos en sus primeros premolares superiores, siendo el derecho experimental (sometido a fuerza ortodóntica) y el izquierdo el control (sin aparatología). Al término de tres semanas, se obtuvieron los LPDs para determinar la presencia de laminina por medio de western blot. **Resultados:** En comparación de los premolares que no fueron sometidos a fuerzas ortodónticas, los que sí tuvieron aparatología presentaron una disminución estadísticamente significativa en la presencia de laminina. **Conclusiones:** Nuestros resultados indican que existen cambios a nivel molecular en el LPD de dientes que fueron sometidos a fuerzas ortodónticas.

Palabras clave: Fuerzas ortodónticas, laminina, ligamento periodontal, moléculas de matriz extracelular.

Abstract

Objective: The objective of this study was to determine presence of laminin, in the periodontal ligament (PL) from premolars to those that were applied orthodontic forces. **Hypothesis:** Laminin from the periodontal ligament of teeth subject to orthodontic pressure will present modifications in its expression. **Design, material and methods:** Orthodontic forces was placed clinically in healthy subjects in its first superior premolars being the right experimental (with orthodontic force application) and the left one the control (without orthodontic force application). After three weeks, the PL was obtained to determine the presence of laminin by means of Western-blot technique. **Results:** The results showed that, in comparison of the premolars that were not subjected to orthodontic forces; those that if they had orthodontic forces they presented a decrease statistically significant in the laminin presence. **Conclusions:** Our results indicate that changes exist at molecular level in the PL of teeth that were subjected to orthodontic forces.

Key words: Orthodontic forces, periodontal ligament, molecules of cellular adhesion, laminin.

Recibido para publicación: 28-Julio-2005.

Introducción

Existe suficiente información y evidencia de que las funciones celulares de adhesión, motilidad y crecimiento entre otras, son extensamente reguladas por la matriz extracelular. Esta matriz está compuesta de diferentes tipos y

combinaciones de proteínas de adhesión como son la colágena, proteoglucanos, así como glucoproteínas cuya representante más importante es la laminina y la fibronectina. En el diente, la matriz extracelular juega un papel muy importante en los procesos de adhesión, el cual se lleva a cabo principalmente por el ligamento periodontal.¹⁻³

El ligamento periodontal en el humano está hecho por las células de la llamada unidad dentoalveolar, compuesta principalmente de tres tipos celulares, que son los cementoblastos, fibroblastos y osteoblastos.¹⁻³ Todas estas células producen entre otras cosas, los componentes proteicos que forman al ligamento periodontal.

Es conocido el hecho de que las fibras proteicas que componen al ligamento periodontal están formadas de varias proteínas de adhesión que se clasifican en colágenas, proteoglucanos y glucoproteínas; de este último tipo de proteínas, las principales componentes son la laminina y la fibronectina.¹⁻³

La laminina es una glucoproteína con un peso molecular de 900-kd y se presenta principalmente en la base de las membranas basales de las células que constituyen a la unidad dentoalveolar; el cual incluye al ligamento periodontal.¹⁻⁵

La laminina está compuesta por tres cadenas: alfa-1 (400 kd); beta-1 (215 kd) y gamma-1 (215 kd); las cuales se unen en su carboxilo terminal para formar una proteína globular estabilizada por enlaces disulfuro.^{5,6}

En el ligamento periodontal, la laminina se cree que funciona como un promotor de la adhesión de las células endoteliales y epiteliales que lo conforman, además de servir como puente de enlace entre el esmalte y la dentina así como unir a las moléculas de colágena y se sabe que su presencia estimula la síntesis de matriz extracelular.^{5,7} Esta última función es muy importante ya que determina que el diente pueda estabilizarse dentro de su alvéolo.

El tratamiento ortodóncico consistente en la aplicación de fuerzas de tensión a los dientes y tiene como finalidad la corrección estética y funcional de los mismos. Dicho tratamiento se realiza a través de diversas técnicas cuya finalidad principal es someter al diente o dientes a una fuerza tensional continua para la corrección de la maloclusión.¹⁻³

Se sabe que la aplicación de una fuerza ortodóncica controlada, produce modificaciones en los componentes de la unidad dentoalveolar que dan como resultado la interacción de los componentes proteicos principales tanto del diente, el alvéolo y el ligamento periodontal que los une.^{4,5,8} Puesto que, el principal componente de adhesión del diente en su alvéolo es el ligamento periodontal, es de suponer que este ligamento sufra las consecuencias de las fuerzas aplicadas, sobre todo, en las proteínas que lo componen.^{4,5,8,9} Al respecto es de señalar que al momento no se sabe qué o cuáles proteínas que componen al ligamento periodontal se modifican en su cantidad o propiedades para permitir el movimiento del diente dentro de la cavidad alveolar del hueso.

Por lo anterior, el objetivo de este estudio es determinar la presencia y estimar la cantidad de laminina que se

localiza en el ligamento periodontal de dientes sometidos a fuerzas ortodóncicas.

Diseño, material y métodos

Selección de pacientes y aplicación de aparatología. Para realizar este estudio, se reclutaron ocho pacientes sanos de ambos sexos, mayores de edad que acudían a la Clínica de Ortodoncia de la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Odontología de la UNAM. Su tratamiento de base contempló extracciones de primeros premolares superiores y ellos fueron informados del estudio para su consentimiento. A los sujetos se les colocó aparatología fija prescripción Roth, hendidura 0.018, con un arco de níquel-titanio calibre 0.016 (marca GAC). La aparatología se aplicó en todos los dientes de ambas arcadas con excepción de los premolares superiores izquierdos, los cuales actuaron como grupo control. Los premolares superiores derechos fueron considerados como el grupo que fue sometido a presión ortodóncica (grupo experimental). A dicho premolar se le colocó el bracket con una angulación de 20° con respecto al eje longitudinal y al arco empleado. Dicho bracket se ligó al arco con un módulo elastomérico (marca TP) y el diente se sometió a una presión ortodóncica durante tres semanas continuas. Al término de este tiempo en que se dejaron actuar las fuerzas ortodóncicas de la aparatología, fueron extraídos los premolares superiores tanto derecho (estudio) como izquierdo (control).

Además de lo anterior, a cada paciente se le tomó una radiografía periapical (con técnica de planos paralelos) de los primeros premolares superiores izquierdo y derecho después de la aplicación de la aparatología y a las tres semanas posteriores al tratamiento, antes de la extracción.

Extracción de premolares y obtención del ligamento periodontal. Una vez extraídos los premolares, se procedió a retirar inmediatamente el ligamento periodontal (LP) unido a las zonas cervical, media y apical de los premolares por medio del raspado con una hoja de bisturí. El tejido así obtenido fue pesado e inmediatamente colocado en una solución amortiguadora fría (Tris, 0.01 M; sacarosa 0.255 M; EGTA 0.3 mM, pH 7.4) para ser homogenizado con un Potter No. 5 de teflón. El homogenado así obtenido fue alicuotado y se le determinó la concentración de proteína por el método de Lowry utilizando albúmina de suero bovino con estándar.¹⁰

Electroforesis de proteínas y Western blot. Para analizar la presencia de la laminina, esto se llevó a cabo por medio de una electroforesis discontinua en geles de acrilamida por la técnica de Laemmli.¹¹ Brevemente, se tomó una muestra del homogenado de LP y se le agregó un volumen de una solución que contiene 2-mercaptopeta-

nol (2 mM), SDS (10%), glicerol (1%), todo ello disuelto en solución amortiguadora de fosfatos (PBS; pH 8). Las muestras fueron calentadas por dos minutos y colocadas (100 µg proteína total por muestra/carril) para ser corridas en un gel de acrilamida al 7.5% llevándose a cabo la misma a 100 V por 120 minutos. Una vez terminada la electroforesis, los geles fueron teñidos con una solución de azul de coommassie y desteñidos con una solución de metanol/ácido acético (50%/10% v/v).

En otra serie de geles, se procedió de la manera anteriormente descrita, sin embargo, al término de la corrida los geles fueron colocados en PBS para lavarse en agitación por tres veces por 10 minutos cada uno. Al término de las lavadas, los geles fueron colocados junto con un papel de nitrocelulosa (Bio-Rad, 0.45 micras) como membrana receptora en una cámara de transferencia (Miniprotean-Gen-3). La trasferencia se realizó en una solución de electrolitos (Tris 0.25 M, Glicina 0.05M, SDS 1%, metanol 20%) por 90 minutos a 100 mA. Terminada la transferencia, la membrana fue teñida con rojo de Ponceau para determinar la ubicación de las proteínas. Posteriormente, la membrana se lavó tres veces con PBS y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente en agitación continua en una solución de bloqueo (5% de leche en polvo descremada y 0.5% de tween-20). Al término de la incubación, se lavó tres veces con PBS y fue expuesta al anticuerpo primario dirigido en contra de la laminina; incubándose por 60 minutos junto con solución de bloqueo en agitación constante. Al término de esta incubación, se lavó tres veces con PBS y se expuso al anticuerpo secundario unido a peroxidasa por 60 minutos. Posteriormente, se lavó en tres ocasiones y se reveló con una solución de peróxido de hidrógeno (0.5%) y NBT al 0.01%, dejándose reaccionar hasta la aparición de manchas que denotaron la presencia de laminina.¹²⁻¹⁴

Una vez localizada la laminina, la membrana fue escaneada en un equipo Alpha Imagen™ versión 3.3™ 1200 con sistema de documentación y análisis para determinar por medio de colorimetría la cantidad aparente de laminina por muestra. El escáner de las proteínas fue analizado por el equipo anterior para expresar los resultados en unidades digitales de imagen (pixeles).

Análisis estadístico. El promedio de todos los resultados del escáner tanto para el grupo control como del experimental fueron analizados para ver su diferencia estadística en el programa de cómputo SS-P2M4 dando una diferencia estadísticamente significativa con una $p < 0.05$.

Resultados

La *figura 1* muestra un ejemplo representativo de una serie de radiografías (A, B, C y D) de los premolares tan-

to el control como el experimental. Las letras A y B corresponden al diente control a tiempo cero y tres semanas después. Las letras C y D muestran los premolares experimentales a tiempo cero y tres semanas antes de su extracción, respectivamente. Las radiografías fueron hechas con la intención de valorar si se presentaba algún tipo de cambio que pudiese presentarse en el espacio que ocupa el ligamento periodontal. Como puede observarse, haciendo la comparación entre los grupos control (A y B) y experimentales (C y D), no se observaron clínicamente cambios en dicho espacio.

Una vez obtenido el ligamento periodontal de los premolares tanto controles como experimentales, se determinó su cantidad por peso, siendo el promedio para ambos grupos de 100-200 mg; con un promedio de concentración de proteína total para el grupo control de 125.04 ± 15 mg y para el grupo de estudio de 183.5 ± 13.05 mg.

En la *figura 2*, se muestra un gel representativo de acrilamida en donde fueron corridas las proteínas totales del ligamento periodontal tanto del grupo control (C) como del grupo experimental (E). A simple observación no se ven diferencias apreciables entre los grupos, sin embargo, una vez que se ha realizado el Wester-blot a estas proteínas para la detección específica de la laminina, se puede apreciar a simple vista una menor coloración en las manchas correspondientes a los grupos de dientes que fueron sometidos a fuerzas ortodóncicas (*Figura 3-A*). En la *figura 3* se muestra una imagen representativa del wester-blot para laminina (*Figura 3-A*) y su gráfica correspondiente obtenida del escaneo de dicha imagen (*Figura 3-B*) para cada carril. Tal como puede apreciarse en esta figura, existe en general, una menor cantidad de laminina (reportada como unidades arbitrarias) en los carriles que contienen a la proteína proveniente de los premolares que fueron sometidos al movimiento ortodóncico, en comparación con los controles. Esta disminución en la presencia de laminina se aprecia mejor en la *figura 4* en donde están contenidos los promedios obtenidos por escaneo de las imágenes de Western-blot tanto del grupo control como del grupo experimental. Al respecto podemos mencionar que existe una diferencia estadísticamente significativa en relación a la cantidad de laminina entre ambos grupos ($p < 0.05$), siendo de un 85.83%, para el grupo que fue sometido a presión ortodóncica, en relación con el grupo control; esto es, existe una disminución promedio de 14.67% en la cantidad de laminina en los grupos tratados en relación con el grupo control.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio indican que al aplicar presión a un diente por medio de una fuerza or-

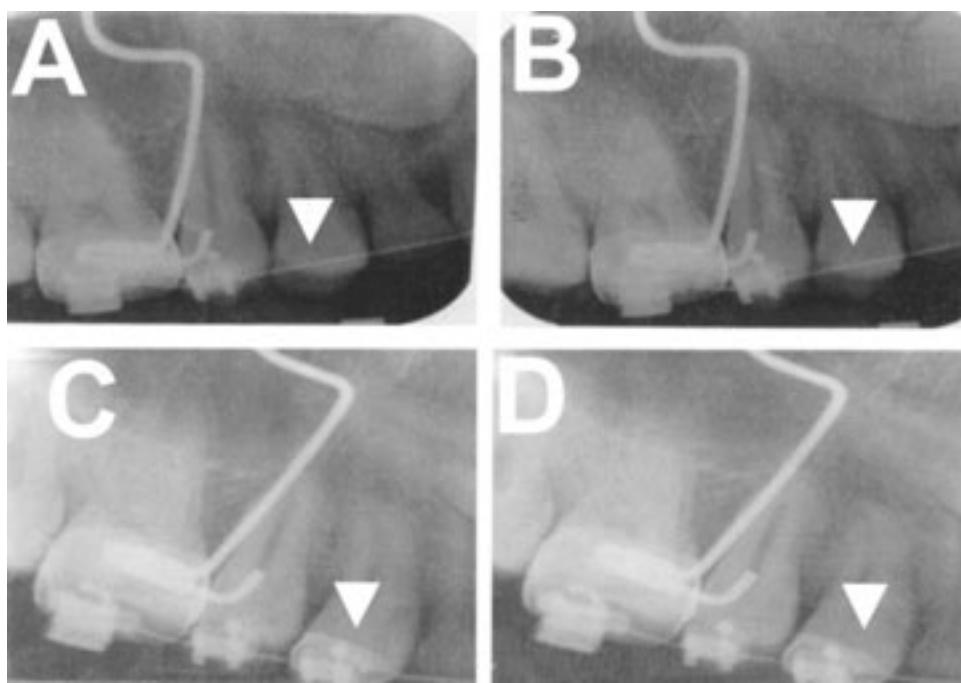


Figura 1. Radiografías de los premolares obtenidas a tiempo cero y tres semanas posteriores a la aplicación de tensión ortodóncica. En la figura se ilustran un juego de radiografías representativas en un sujeto seleccionado para este estudio. La imagen A corresponde al premolar superior izquierdo (flecha) inmediatamente después de colocar la aparatoología al resto de los dientes. La imagen B fue obtenida tres semanas después, previa a la extracción de dicho diente, siendo éste el tomado como control. Las figuras C y D corresponden a las imágenes radiográficas del mismo paciente tomadas a los premolares superiores derechos (flechas) considerados como el grupo de estudio a los cuales se les aplicó presión ortodóncica por tres semanas (como puede verse por el bracket que contiene). En las radiografías aquí mostradas, se observa que tanto para el grupo control como para el grupo en estudio, no se presentó ningún tipo de cambio clínicamente observado en el grosor del espacio correspondiente al ligamento periodontal durante las tres semanas en que se le aplicó la tensión ortodóncica.

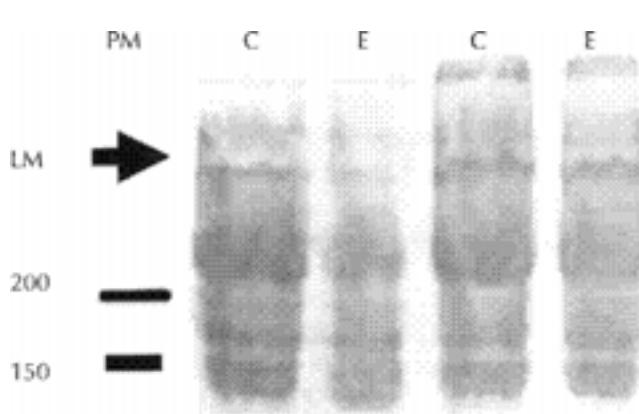


Figura 2. Fotografía de un gel de acrilamida al 7.5% teñido con azul de coommassie en donde se ilustra una serie representativa de las proteínas totales del ligamento periodontal obtenido de dientes control (C) y los que fueron sometidos a tensión ortodóncica (E). PM: estándares de pesos moleculares (200 y 150 kilodaltones).

todóntica dada por la aplicación de aparatoología por un periodo de tres semanas, se produce una disminución en la presencia de la laminina en el ligamento periodontal de estos dientes.

Lo anterior puede ser un indicio de que el ligamento periodontal es sensible en las primeras semanas posteriores a la aplicación de fuerza tensional demostrado por los cambios encontrados en la expresión de la laminina.

Estudios realizados en los últimos años han demostrado el efecto que los movimientos ortodóncicos y las

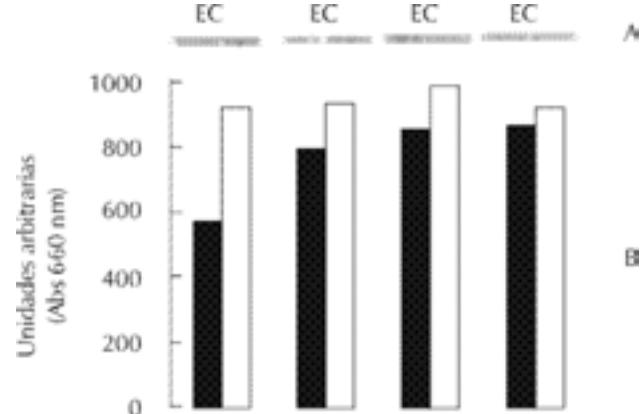


Figura 3. Membrana de Western-blot (A) representativa de las muestras en estudio y su correspondiente gráfica de absorbancia (B) después de ser colocada en el escáner Alpha Imagen TM versión 3.3TM 1200 con sistema de documentación y análisis para determinar por medio de colormetría la cantidad aparente de laminina por muestra, tanto en grupos control (C) como en los experimentales (E).

fuerzas tensionales tienen sobre el ligamento periodontal. Sin embargo, estos estudios están realizados *in vitro* y/o en especies distintas del ser humano.⁹⁻¹⁴

Estos estudios sugieren que existe una modificación en los componentes celulares del ligamento periodontal cuando se le aplican fuerzas de tensión. Dichos cambios han sido atribuidos a un proceso inflamatorio del ligamento periodontal que puede abarcar al tejido gingival.^{9,15-18}

Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que de acuerdo a las condiciones experimentales que

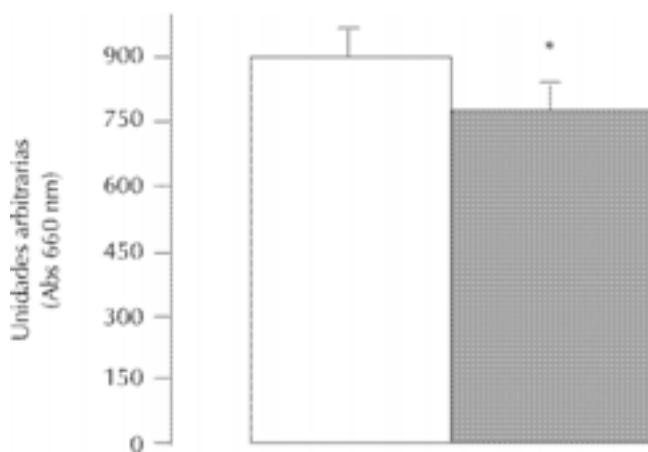


Figura 4. Gráfica de los promedios de las densitometrías de todos los grupos tanto controles (barra blanca) como los experimentales (barra negra). El asterisco denota una $p < 0.05$.

fueron utilizadas, la aplicación continua de presión ortodóncica a un diente durante un periodo de tres semanas, produce una disminución en la concentración de laminina localizada en el ligamento periodontal, comparado con un grupo control que no fue tratado.

En comparación con los estudios que se han realizado *in vitro*, no se observó aumento en la presencia de la laminina, probablemente por el tiempo al cual fueron sometidos los dientes a la presión ortodóncica. Sin embargo, la tensión y el tiempo al cual fue sometido el diente, resultó ser suficiente para producir cambios en la presencia de la laminina en el ligamento periodontal. Lo anterior sugiere que la disminución de la cantidad de laminina en el ligamento periodontal de los dientes sometidos a tensión ortodóncica, es una primera respuesta inflamatoria del ligamento a este tipo de fuerzas. Lo anterior está basado en el hecho de que existen los reportes que mencionan que hay dicha inflamación en el ligamento periodontal en los dientes que están siendo sometidos a presiones ortodóncicas y que dicha inflamación permanece mientras el estímulo de tensión existe.^{9,15-18}

Es probable que tres semanas de tratamiento no sean el tiempo suficiente para observar cambios clínicos en la posición del diente sometido a tensión, sin embargo, puede ser tiempo suficiente para desarrollar un proceso inflamatorio controlado, ya que, como todo tejido vivo, el ligamento periodontal responde a los estímulos de tensión, probablemente con un proceso inflamatorio, el cual debe ser el mínimo suficiente para activar a las especies celulares que se encuentran en el alvéolo y generar los cambios observados en la laminina.

Estas primeras etapas de respuesta del ligamento periodontal ante la presencia de una fuerza tensional debe

ser investigada con mayor detalle, ya que puede aportar conocimiento sobre las diversas fases por las que atraviesa la respuesta celular y molecular del ligamento periodontal para abrir la puerta a las líneas de investigación que señalen los procedimientos que hay que seguir para controlar y regular la presencia y calidad de estas proteínas. Estas proteínas son mediadoras del proceso inflamatorio dentro del alvéolo dental, sobre todo cuando se coloca la aparatología necesaria para llevar a cabo un procedimiento ortodóncico. El conocer los elementos iniciales que participan en la respuesta inflamatoria del ligamento periodontal nos puede ayudar a controlarla, ya que es sabido que de no presentarse dicha inflamación, el proceso de remodelación de los dientes es más rápido y por lo tanto el tiempo de tratamiento se acortaría.

Bibliografía

1. Proffit WR. *Orthodontic contemporany theoretic and practical*. 3rd ed. Argentina: Mosby; 2001: 296-308.
2. Lindhe J. *Periodontology clinical*. Buenos Aires: Panamericana; 1985: 29-50 y 451-457.
3. Shore RC, Berkovitz BK. Model to explain occlusal movement of extracellular protein of periodontal ligament of the rat incisor. *Archs Oral Biol* 24: 861-862.
4. Norton LA, Andersen LA, Arenholt D, Anderden L, Melssen B. A methodical study of shape changes in human oral cells perturbed by a simulated orthodontic strain *in vitro*. *Archs Oral Biol* 1995; 40: 865-872.
5. Somerman MJ, Foster RA, Imm GM, Sauk JJ, Archer SY. Periodontal ligament cell and gingival fibroblasts respond differently to attachment factors *in vitro*. *J Periodontol* 1989; 60: 73-77.
6. Metzger Z, Weinstock B, Dotan M, Narayanan AS, Pitaru S. Differential chemotactic effect of cementum attachment protein on periodontal cell. *J Periodont Res* 1998; 33: 126-129.
7. Genco RJ. *Periodoncia de Cohen*. Ed Interamericana-Mc Graw-Hill. México. 1993: 33-54.
8. Toms A, Gannon B, Carati C. The immunohistochemical response of the rat periodontal ligament endothelium to an inflammatory stimulus. *J Periodont* 2001; 72: 565-570.
9. Cho MI, Garant PR, Lee YL. Immunocytochemical *in vivo* localization of fibronectin-rich contact sites on fibroblasts of normal periodontal ligament and inflamed gingiva. *J Periodont Res* 1988; 23: 230-238.
10. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 266-75.
11. Laemmli VK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
12. Utto VJ, Larjava H, Peltonen J, Brunette DM. Expression of fibronectin and integrins in cultured periodontal ligament epithelial cell. *J Dent Res* 1992; 71: 1203-1211.

13. Polson AM. *Periodontal regeneration current stratus and directions*. Hong Kong: Quintessence books; 1994: 199-205.
14. Takako S, Yasuyoshi O, Mizuho K, Mieko G, Yoshihiro T, Hidetaka S. The distribution of fibronectin and laminin in the murine periodontal membrane, indicating possible functional roles in the apical migration of the junctional epithelium. *Archs Oral Biol* 1996; 41: 885-891.
15. Kapila YL, Lancero H, Johnson PW. The response of periodontal ligament cell to fibronectin. *J Periodont* 1999; 70: 1039-1045.
16. Lukinmaa PL, Mackie EJ, Thesleff I. Immunocytochemical localization of the matrix Glycoproteins -Tenascin and the ED-sequence-containing from of cellular fibronectin- in human permanent teeth and periodontal ligament. *J Dent Res* 1991; 70: 19-26.
17. Steffensen B, Dupng AS, Milam SB, Potempa CL, Winborn WB, Magnuson VL, Chen D, Zardeneta G, Klebe RJ. Immunohistological localization of cell adhesion proteins and integrins in the periodontium. *J Periodontol* 1992; 63: 584-592.
18. Hakkinen L, Oksala O, Salo T, Rahemtulla F, Larjava H. Immunohistochemical localization of proteoglycans in human periodontium. *Arch Oral Biol* 1995; 40: 863-872.

Reimpresos:

Dr. José Gutiérrez Salinas
Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental,
División de Investigación Biomédica,
Centro Médico Nacional "20 de Noviembre", ISSSTE
San Fernando núm. 502, 2º piso.
Col. Del Valle, 03100
México DF
Este documento puede ser visto en:
www.medigraphic.com/adm