



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

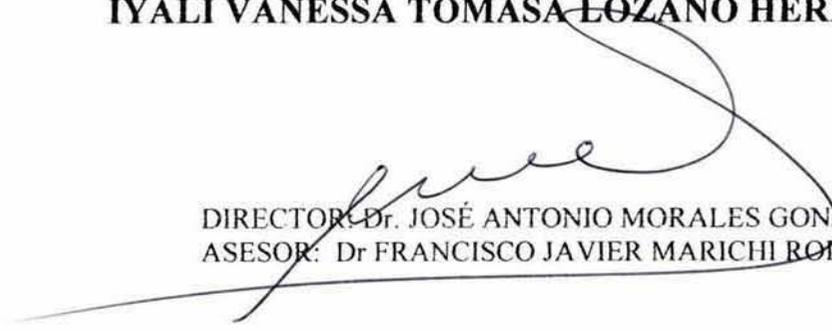
**PRESENCIA DE FIBRONECTINA, TENASCINA Y
ENTACTINA EN PROCESOS INFLAMATORIOS
DEL LIGAMENTO PERIODONTAL ORIGINADOS
POR FUERZAS ORTODÓNCICAS.**

T E S I S I N A

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**CIRUJANA DENTISTA
P R E S E N T A:**

IYALI VANESSA TOMASA LOZANO HERNÁNDEZ


DIRECTOR: Dr. JOSÉ ANTONIO MORALES GONZALEZ
ASESOR: Dr. FRANCISCO JAVIER MARICHI RODRÍGUEZ



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 la dirección del Dr. José Antonio Morales González.

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



Agradecimientos

A mis padres

Gracias por todo su apoyo y comprensión durante la realización de esta tesina así como en todo el transcurso de la carrera y mi vida.

A mis Hermanos

Yair, Cesar y Rocío

Gracias por todo su apoyo

A mi abuelita Raquel Hernández Hernández

Aunque ya no esta con nosotros muchas gracias por su cariño y apoyo

A Gerardo Segura Navarrete

Muchas gracias por estar a mi lado, por tu cariño y tu comprensión

A mis amigos

Karina Lara, Liliana Espinales, Adriana Suárez , Nahemi Acosta, Víctor Segura

Gracias por su amistad

Al Doctor Francisco Aceves y Alejandro Hernández

Gracias por su amistad y apoyo.

Al Doctor José Antonio Morales González

Gracias por su enseñanza y por todo su apoyo para la realización de este trabajo.



Al Doctor Francisco Javier Marichi Rodríguez

Gracias por su enseñanza y por todo su apoyo para la realización de este trabajo.

Gracias a todas las personas que han estado presentes en gran parte de mi vida y a las personas no mencionadas Gracias.

Gracias a la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Gracias a todos los profesores por sus enseñanzas durante el transcurso de toda la licenciatura.



ÍNDICE:

Índice Fotográfico.....	VII
Introducción	X
Antecedentes.....	1
Generalidades de Proteínas.....	4
Fibronectina.....	16
- Estructura.....	17
- Biosíntesis.....	18
- Mecanismos de acción.....	20
- Función	22
Tenascina.....	29
- Estructura.....	29
- Biosíntesis.....	30
- Mecanismos de acción.....	30
- Función.....	36
Entactina.....	38
- Estructura.....	38
- Biosíntesis.....	39
- Mecanismos de acción.....	41
Reacción inflamatoria en el periodonto al aplicar fuerzas ortodóncicas.....	42



Técnicas utilizadas para la determinación de proteínas.....	51
Planteamiento del Problema.....	58
Justificación.....	58
Objetivos.....	59
- Objetivo general.....	59
- Objetivos específicos.....	59
Hipótesis.....	60
- Hipótesis nula	60
- Hipótesis de trabajo	60
Metodología.....	61
Conclusiones.....	78
Referencia bibliográfica.....	79
Anexos.....	83



ÍNDICE FOTOGRÁFICO

Fig1 Muestra la adherencia de la fibronectina a los filamentos de actina en el espacio extracelular.	19
Fig2. Muestra la estructura de la entactina y su unión con la laminina.....	38
Fig 3. Muestra la unión de la entactina con las diferentes glucoproteínas de adhesión.	39
Fig 4 . Muestra la distribución de las proteínas de adhesión en la membrana basal. Alan Stevens, Histología Humana,1998.....	41
Fig 5. Muestra los diferentes tamaños de pipetas utilizadas y las 5 muestras de ligamento periodontal.	62
Fig 6. Muestra los tubos de ensaye con agua y soluciones sin muestra.....	63
Fig 7. Muestra los tubos de ensaye con la muestra y solución D.	63
Fig 8. Espectrofotometro.....	64
Fig. 9 Muestra los aparatos utilizados para realizar la electroforesis	65
Fig 10. Muestra Cristales para realizar el gel de poliacrilamida.....	66
Fig. 11 Ay 11B Una vez colocados los cristales en la estructura se colocan en el soporte para la realización del gel.....	66



Fig. 11 C y 11D muestran la colocación de los cristales en la estructura y en soporte para la estructura.	67
Fig 12. Realización del gel de poliacrilamida.	68
Fig 13 A. Se muestra gel de poliacrilamida, con jeringa y muestra de ligamento periodontal con azul de Comassi.	68
Fig 13 B y 13 C. Toma de las muestras de ligamento periodontal con azul de Comassi para ser colocadas en el gel de poliacrilamida.	69
Fig 13D y13E. Colocación de las muestras en el gel de poliacrilamida.....	69
Fig 14. Muestras ya colocadas en el gel de poliacrilamida.	70
Fig.15 Muestra el gel de poliacrilamida en tinción.	70
Fig. 16 A y 16 B Muestran los geles ya deshidratados colocados en papel celofán.....	71
Fig17. Muestra al aparato de electroforesis.	71
Fig. 18 A, B y C Colocación de los cristales para ser llevados a la cámara de electroforesis.	72
Fig 19 Muestra El electrofotometro ya encendido	72
Fig 20 se muestra el gel de poliacrilamida con las proteínas ya colocadas.....	73



Fig.21 Muestra el nivel de proteínas a través del gel.....	73
Fig 22 Muestra esquemática de la colocación de la almohadilla de fibra, papel filtro, gel, papel de nitrocelulosa como membrana receptora, papel filtro y almohadilla de fibra.	74
Fig.23 Muestra al gel colocado para hacer la transferencia.....	74
Fig.24 Muestra el papel de nitrocelulosa para la recepción.....	74
Fig. 25 a la 28 Una vez colocado el sándwich se colocan en el cassette para posteriormente colocarlo en el aparato de transferencia.	75
Fig.29 Muestra la colocación de solución para transferencia, esta de estar refrigerada.	76
Fig. 30 A y B Muestran la cámara la transferencia por diferentes vistas ya con el cassette dentro.	76
Fig. 31 Cámara de transferencia conectada en el electrofotometro.....	76
Fig. 32 A a la 32 D Muestran La membrana en la tinción de Pouson y como se van tiñendo las proteínas.....	77



INTRODUCCIÓN

En la presente tesina se trata el tema de la presencia de proteínas de adhesión así como determinar la presencia de fibronectina, tenascina y entactina en los procesos inflamatorios del ligamento periodontal cuando se le aplican fuerzas ortodóncicas.

Primero se enfoca en la matriz extracelular que es el sostén que da el sustento estructural al tejido donde se definen gran parte de las características físicas de un tejido.

Las células de sostén y su matriz extracelular asociada se define como el tejido conjuntivo. ⁽¹⁰⁾

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

Los fibroblastos segregan los componentes de la matriz extracelular en la mayor parte de los tejidos.

Ahora la matriz extracelular está compuesta principalmente por proteínas fibrilares rodeadas de glucosaminoglucanos y pequeñas cantidades de glucoproteína estructural con función en la adhesión celular donde juegan un papel importante la fibronectina y la tenascina. ⁽¹⁾

La fibronectina media la adhesión entre diversas células y componentes de la matriz extracelular. ⁽¹⁰⁾



Es una glucoproteína multifuncional, que existe circulando en el plasma, que se une transitoriamente a la superficie de muchas células lo que permite la adhesión de la célula a la matriz extracelular

La fibronectina tiene actividad fibroblástica reparando lesiones por cicatrización en tejidos dentales sometidos a fuerzas ortodóncicas y formando continuamente proteoglicanos y glucosaminoglicanos, sintetiza anticuerpos mediante las células plasmáticas y une los fibroblastos a las células del sistema inmune esto hace que aumente la matriz extracelular, y neoformación tisular que ocurre en el ligamento periodontal como consecuencia del movimiento dental aumentando el colágeno. ⁽¹⁰⁾

La Tenascina es otra glucoproteína de adhesión sintetizada por los fibroblastos, células gigantes y otras células mesenquimatosas asociada a la embriogénesis, y procesos de odontogénesis, angiogénesis y en el desarrollo neural participa en la remodelación y reparación de tejidos, estimula y dirige la capacidad de migración de los diferentes tipos de células, estructura de los tejidos con asociación con el estrés mecánico que soportan estos tejidos. ⁽²⁾

También se encuentra durante la odontogénesis y en el tejido pulpar y periodontal durante el resto de la vida dental asociada a procesos de reparación y remodelación periodontal. Regulación de la migración de las células gliales del sistema nervioso central. ⁽¹⁴⁾

Así también se determinara la presencia de estas proteínas mediante técnicas como es el Western blot



Con la determinación de la presencia de estas proteínas es orientarnos y saber como los procesos inflamatorios que se ocasionan al aplicar fuerzas ortodancias en los dientes.



ANTECEDENTES

1998 Wallner 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).⁽¹⁾

1983 Bourdon Nos menciona que la tenascina fue aislada en diferentes laboratorios, la cual recibió varios nombres.⁽²⁾

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.⁽³⁾

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.⁽⁴⁾



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 *in 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. Se sugiere que la unión a proteínas del cemento puede influenciar la selectividad de las células a la repoblación celular de las áreas del ligamento periodontal.⁽⁵⁾

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.⁽⁶⁾

1992 Ward 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.⁽⁷⁾

1992 Ngan empleó un sistema dinámico para estudiar los efectos hidrostáticos del ligamento periodontal en humanos *in vitro*. Demostrando que la fibronectina, en lugar de la laminina o la colágena, es el substrato 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 la colágena tipo I, su comportamiento de adhesión y migración puede ser cambiado.⁽⁸⁾



GENERALIDADES DE PROTEÍNAS

Las células que forman los tejidos pueden dividirse en dos grupos en células parenquimatosas que es donde recae la función del tejido y las células de sostén que dan sustento estructural al tejido.

Las células de sostén comprenden una serie de tipos celulares altamente desarrollados con complejas funciones metabólicas y que producen una matriz extracelular que define gran parte de las características físicas de un tejido. Estos dos tipos de células asociadas se denominan tejido conjuntivo.

Células de sostén estas ofrecen estabilidad mecánica a los tejidos, estas están incluidas dentro de las células del tejido conjuntivo, estas derivan del mesénquima, producen diversos materiales de la matriz extracelular, al madurar se encargan de la formación de tejidos con pocas células en los que la matriz extracelular es el principal componente, y producción de mecanismo de adhesión celular que interaccionan con la matriz extracelular mas que otras células.

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

Los fibroblastos segregan los componentes de la matriz extracelular en la mayor parte de los tejidos.



MATRIZ EXTRACELULAR

Se ha definido a la matriz extracelular (EMC) como el material estructuralmente estable cuya integridad estructural y composición funcional es importante para mantener y dar soporte a las células y los tejidos. ⁽¹⁾

Las macromoléculas extracelulares son las que constituyen la sustancia o matriz extracelular.

La matriz extracelular de los animales esta compuesta de cuatro tipos principales de macromoléculas como la colágena, proteoglucanos, glucoproteínas estructurales y elastina. Con excepción de la elastina, cada clase de moléculas de la matriz extracelular contiene proteínas relacionadas donde cada miembro es producto genético único, tiene un grado de distribución específico en los tejidos que implica la matriz en el desarrollo y en las funciones celulares, se identifican los receptores de superficie celular específico para los componentes de EMC.

Sus características funcionales son dar resistencia a la tracción y elasticidad.

También tiene como funciones el crecimiento, establecimiento de la diferenciación, el desarrollo y las respuestas metabólicas de las células.



Estas moléculas de proteínas y de polisacáridos se segregan de forma local y se unen formando un tramo organizado en el espacio extracelular de la mayoría de los tejidos. La matriz extracelular actúa formando estructuras altamente especializadas como el cartílago, tendones, láminas basales, huesos y dientes.

Las macromoléculas que constituyen la matriz extracelular están segregadas por células locales.

La matriz extracelular del tejido conectivo propiamente dicha está compuesta por una sustancia básica (compuesta por glucosaminoglucanos (GAG), proteoglucanos y glucoproteínas de adhesión).

Su estructura general es una red dispersa de células de sostén que producen un entramado organizado y abundante de proteínas fibrilares organizadas en un gel hidratado donde hay la presencia de agua.

El agua da la hidratación y permite el transporte de sustancias entre la sangre y las células de los tejidos a la vez que amortigua y se opone a las fuerzas de presión y permite el intercambio rápido de nutrientes y productos de desecho transportados por el líquido tisular.

A su paso por la sustancia básica que esta hidratado de GAG y proteínas fibrilares que forman una "sustancia fundamental" en las que están incluidas las fibras de colágena. ⁽⁹⁾



Existen dos tipos de fibras presentes en la matriz extracelular. La primera de estas fibras resiste a las fuerzas de compresión y la última soporta las fuerzas de tensión o tracción. Las cuales son de tres tipos: colágenas, elásticas y reticulares.

En la matriz amorfa que también contiene agua, sales, sustancias de bajo peso molecular, glucoproteínas adhesivas y pequeñas cantidades de proteína. Su componente principal son los proteoglucanos.

Proteoglucanos:

Los PG (proteína+glucosaminoglucano) pueden ser de diversos tamaños.

Es una macromolécula compuesta de cadenas de polisacárido sulfatado que están unidos covalentemente a una proteína, de peso molecular de $10 \text{ a } 20 \times 10^6$ Daltons.

Está compuesta de Hialuronato (glicosaminoglucano), una cadena proteica y adicionados lateralmente Glucosaminoglucanos de tres tipos, Condroitin 6 Sulfato y Keratín Sulfato en un 90% y menos de un 5% de Condroitin 4 Sulfato.

Estos últimos tienen una heterogeneidad potencial casi ilimitada. Pueden diferir notablemente en contenido proteico, en tamaño molecular, en número y en tipos de cadenas de GAG por molécula.

La vida media de los Proteoglucanos varía entre 7 y 200 días. Los centros proteínicos de los PG se elaboran en el RER y los grupos GAG se enlazan de manera covalente con la proteína en el AG.



Suelen contener hasta un 90% y un 95% en peso de carbohidratos en forma de numerosas cadenas de GAG largas, no ramificadas y por lo general sinácido siálico.

Se repelen eléctricamente entre si, dada su carga eléctrica negativa, pero tienen una gran capacidad hidrofílica, lo que produce una alta presión hidrostática.

Funciones de los PG:

- Las cadenas de GAG tienden a adoptar conformaciones enrolladas al azar muy extendidas y ocupar un volumen inmenso para su masa.

- Al ser muy hidrofílicas atraen grandes cantidades de agua, formando así geles hidratados incluso a concentraciones muy bajas. Esta tendencia está notablemente incrementada por su elevada densidad de cargas negativas que atraen a cationes osmóticamente activos.

- Esta propiedad de atraer el agua genera una presión de hinchamiento en la matriz extracelular, que resiste a las fuerzas de compresión (a diferencia de las fibrillas de colágena que resisten a las fuerzas de tracción).

- Debido a su organización porosa e hidratada, las cadenas de GAG permiten la rápida difusión de las moléculas hidrosolubles, la migración de células y el desarrollo de procesos celulares.

- Llenan eficazmente el espacio extracelular, a pesar de que la cantidad de GAG del tejido conectivo es inferior al 10% en peso de la cantidad de proteínas fibrosas (colágena y elastina).



- Cada vez se dispone de más pruebas de que el ácido hialurónico tiene una función especial en los tejidos a través de los que migran las células durante el desarrollo o la reparación de heridas.
- No solo se produce en grandes cantidades en estos tejidos sino que además su degradación por medio de la enzima hialuronidasa esta asociada con el cese de la migración celular.
- Los PG poseen también sitios de fijación para ciertas moléculas de señalamiento como el factor de transformación del crecimiento (TGF-).
- Al fijarse a estas moléculas de señalamiento, los PG pueden impedir su función al evitar que las moléculas lleguen a sus destinos o incrementarlas al concentrarlas en una localización específica.
- Son sintetizados por la mayoría de las células y juegan un papel muy importante en muchos procesos celulares (por ej. Movilidad, adhesión celular, proliferación, diferenciación y morfogénesis) debido a su habilidad inherente de adherirse a otras células.
- Los proteoglucanos son encontrados intercelularmente en los gránulos secretorios así como en la superficie de la membrana celular.
- Los proteoglucanos extracelulares dan soporte mecánico a lo largo de las moléculas de la matriz celular y afectan la fibrillogénesis de la colágena, la migración y la agregación celular.
- Los proteoglucanos pueden regular el crecimiento y diferenciación celular indirectamente mediante su adhesión a factores de crecimiento tales como



los fibroblastos y los factores de crecimiento endotelial y transformando el factor de crecimiento beta.

- Las dos principales glucoproteínas estructurales del fibrocartilago son la Fibronectina y la Laminina.

-Algunos proteoglucanos extracelulares tales como el Agrecan y la Decorina inhiben la unión celular a la colágena y la fibronectina adhiriéndose a la porción adherible de los GAG de estas proteínas ⁽¹⁰⁾

-Los Glucosaminoglucanos sulfatados tiene una distribución topográfica variable según las áreas de carga de la articulación.

- Se encuentran en mayor cantidad en la parte lateral de la eminencia donde se concentran fuerzas compresivas durante la masticación, movimientos laterotrusivos, protrusivos y en bruxismo, así también en la parte anterior del cóndilo y en la porción central del disco articular que son zonas de carga casi permanente en las ATMs

Fibras:

Las fibras de la matriz extracelular brindan resistencia tensil y elasticidad a esta sustancia. Las fibras elásticas dan resistencia, a la tracción y elasticidad por eso son la base de la función mecánica de sostén.

Se han descrito 3 tipos de fibras basándose en su morfología y su reactividad con los colorantes histológicos.

Los 3 tipos de fibras son de colágena, reticular y elástica.



Colágena:

Las fibras de colágeno parecen de color blanco resplandeciente. Las cuales son conocidas como fibras blancas que suelen medir menos de 10 Nm. de diámetro y son incoloras.

Al teñirse con hematoxilina y eosina se manifiestan como haces de fibras sonrosadas, onduladas y largas.

Las largas fibras de colágeno: refuerzan y contribuyen a organizar la matriz, la fase acuosa del gel polisacárido permite la difusión de nutrientes, metabolitos y hormonas entre sangre y tejidos.

GLUCOSAMINOGLUCANOS

Los Glucosaminoglucanos (GAG), anteriormente conocidos como mucopolisacáridos, son largas cadenas de polisacáridos no ramificadas, compuestas por unidades repetidas de disacáridos.

Actualmente reciben el nombre de GAG debido a que uno de los 2 residuos de glucosa del disacárido repetido siempre es una aminoglucosa (N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina) y el otro típicamente un ácido urónico (idurónico-glucurónico).

Los GAG tienen una intensa carga negativa debido a la presencia en muchos de los residuos de glucosa de grupos carboxilo.



Se han diferenciado 7 grupos de GAG según su estructura, sus residuos y el número y localización de los grupos sulfato. Se trata del:

1. Ácido hialurónico (HA) Cartílago, líquido sinovial, piel, tejido de sostén.
2. Sulfato- Condroitino (CS) Cartílago, hueso, piel, tejido de sostén.
3. Sulfato- Dermatán (DS) Piel, vasos sanguíneos, corazón.
4. Sulfato- Heparán (HS) Membrana basal, arterias pulmonares.
5. Heparina (H) Pulmón, hígado, piel, granulos de mastocitos
6. Sulfato- keratano (KS) Cartílago, córnea, disco vertebral.

Las subunidades básicas de disacáridos de H, HS y HA son el N-acetilglucosamina y el ácido urónico, los de CS y DS son la N-acetilgalactosamina y el ácido urónico y los de KS son la N-acetilglucosamina y la galactosa.

Los disacáridos en HA no son sulfatados pero los GAG's restantes si los son en diferentes extensiones dando pie a una gran secuencia de heterogeneidad.

Forman la matriz de los tejidos de sostén cuyas propiedades vienen determinadas por la carga y por la organización espacial.

Los métodos de tinción que pueden indicar su presencia en tejido e incluyen las tinciones catiónicas (básicas) de alta afinidad⁽¹¹⁾



Glucoproteínas de Adhesión:

La capacidad de las células para adherirse a los componentes de la matriz extracelular se encuentra mediada, en gran medida por las glucoproteínas de adhesión.

Estas se fijan a las células a la matriz extracelular, Actúan sobre la morfología de las células al influir sobre la organización del citoesqueleto y contribuyen a orientar a la célula migrante durante el desarrollo embrionario como en los procesos de cicatrización, contribuyen al anclaje de los epitelios a la matriz extracelular y forman parte de las laminas basales.

Estas grandes macromoléculas tienen varios dominios, uno de los cuales por lo menos suele fijarse a las proteínas de la superficie celular llamadas Integrinas, uno a las fibras de colágena y uno más a los PG.

También pueden ser en sus estructuras ser de tipo funcional como estructural, tiene sitios de adhesión independiente para las células y para otros componentes y tiene diferentes subunidades. ⁽¹⁾

De esta manera, las glucoproteínas de adhesión comprimen a los diversos componentes de los tejidos entre sí:

Los tipos principales de PG son:

1. Fibronectina: Gran dímero compuesto por dos subunidades polipeptídicas similares, cada una de cerca de 220000 daltons, unidas entre sí por sus extremos carboxilo mediante enlaces disulfúricos.



Se sintetiza principalmente en los fibroblastos. Marca las vías migratorias de las células embrionarias, de modo que las células del organismo en desarrollo que están migrando pueden llegar a su destino.

2.Laminina: Glucoproteína muy grande 950000 daltons compuesta por 3 cadenas polipeptídicas de gran tamaño A, B1 y B2.

Las cadenas B se envuelven alrededor de las cadenas A y se mantienen en su posición por puentes disulfuro. La laminina se localiza casi estrictamente en la lámina basal. Tiene sitios de fijación para heparina sulfato, colágeno tipo IV, entactina y membrana celular.

Posee unión con colagena tipo IV, entactina y receptores de superficie celular.

3.Entactina: Se fija a la molécula de laminina en el sitio en que se unen entre sí, los 3 brazos cortos de esa molécula, también lo hace al colágeno de tipo IV y por tanto facilita la fijación de la laminina a la red de colágeno.

4. Tenascina: Es una gran glucoproteína compuesta por 6 cadenas polipeptídicas que se conservan unidas entre sí por enlaces disulfúricos.

Tiene sitios de fijación para los sindecanes y fibronectina. Se ubica en el tejido embrionario. La segunda posee dominios para colágeno tipo I, PG e integrinas de osteoblastos y osteocitos.

Facilita la fijación de cristales de hidroxapatita al colágeno de tipo I en el hueso.



La nutrición y la eliminación de los productos de deshecho dependen de la difusión a través de la matriz extracelular.

La avascularidad del cartílago posiblemente es mantenida por el Inhibidor de crecimiento de células endoteliales e Inhibidores de proteasas.⁽¹²⁾

Los elementos celulares son capaces de formar su propia matriz extracelular, a partir de la difusión de los nutrientes estimulados por la carga a que es sometida la articulación lo cual también ayuda a la eliminación de los productos de deshecho, y en determinadas situaciones serán capaces de liberar enzimas degradadoras que lo lleven a su autodestrucción⁽¹³⁾



FIBRONECTINA

La fibronectina (FN) es una glucoproteína estructural multifuncional de alto peso molecular, inicialmente adopta diferentes formas todas codificadas por el mismo gen estos se originan de diferentes recortes mRNA.

Contiene aminoácidos casi idénticos con propiedades similares, tiene actividad inmunohistoquímica promovedora de adhesión celular, es un factor de estimulación de adhesión y fijación que tiene la capacidad de estimular el crecimiento celular y diferenciación.

Es un componente estructural de la matriz extracelular que se presenta como fibrillas insolubles y en forma soluble en la sangre y otros líquidos tisulares.⁽¹¹⁾

Esta presente en la matriz pericelular e intercelular, en las membranas basales y en una gran variedad de fluidos corporales.

La fibronectina y otras glucoproteínas están íntimamente involucradas en las interacciones de las células con otras células y con su ambiente externo.

La fibronectina es sintetizada por una gran variedad de células e íntimamente asociada con los fibroblastos, las células endoteliales, los condrocitos, las células gigantes, las células amnióticas, los miocitos y monocitos.



Estructura

La fibronectina está compuesta de dos cadenas de polipéptidos que son similares pero no idénticas.

Su peso molecular es de 250 kD. Los polipéptidos están unidos cerca de su terminal C y poseen una serie de dominios globulares, ligeramente doblados que tienen características especiales de adherencia.

Además tiene un enlace disulfuro y su terminación carbono en cada subunidad hay varios dominios globulares con sitios de unión para colágeno, heparina, fibrina (interviene en la coagulación). ⁽¹¹⁾

Esta molécula es producto de células mesenquimales y epiteliales, el plasma producido por hepatocitos y en el cromosoma humano 2, así como en condrocitos, macrófagos y plaquetas⁽¹⁾

La fibronectina tiene una estructura modular. Los módulos son de tres tipos principales, denominados tipo I, II y III .

El tipo I está compuesto de cerca de 45 aminoácidos y comprenden las terminaciones N y C de la molécula. Las nueve repeticiones tipo I son interrumpidas en la terminación N por dos repeticiones tipo II, cada una consistente de 60 aminoácidos.

La mitad de cada polipéptido contiene 15-17 repeticiones tipo III, cada una de 90 residuos de largo.



La estructura de la fibronectina es dependiente de su origen celular. La heterogeneidad de las cadenas del polipéptido derivan de los enlaces alternativos del RNAm de la fibronectina.

Biosíntesis

La fibronectina tiene ocho enlaces diferentes dependiendo del origen celular y la variante de unión 4-10% de la masa de la molécula pueden ser carbohidratos con enlace O y N.

Tiene dos sitios de adherencia para las células la colágena, la heparina y algunos proteoglucanos, el DNA, ácido hialurónico y la fibrina.

Estos sitios estructurales proveen de las bases químicas para las diversas funciones de la fibronectina como la regulación del crecimiento, la diferenciación, la arquitectura celular y la migración.

La fibronectina existe en dos formas principales, la fibronectina plasmática y fibronectina hística.

La fibronectina plasmática es soluble en condiciones fisiológicas, mientras que la hística solo es soluble en pH alcalino.

La fibronectina plasmática es un dímero, pero la hística es una mezcla de dímeros y polímeros más grandes, todas las formas de fibronectina derivan de un solo gen. Las variaciones menores en los empalmes determinan las diferencias en la composición de aminoácidos que, a su vez, son responsables de las ligeras variantes en las propiedades biológicas dentro de la familia.



Como sucede con otras proteínas plasmáticas, la fibronectina plasmática es sintetizada y secretada por los hepatocitos.

La mayoría de las células de origen mesenquimático, incluso fibroblastos y células endoteliales, secreta fibronectina hística.

La fibronectina se ubica en la matriz extracelular, donde se presenta en la forma de filamentos delicados o conglomerados pequeños, unida a las fibras colágenas y en las superficies celulares. (Figura1)

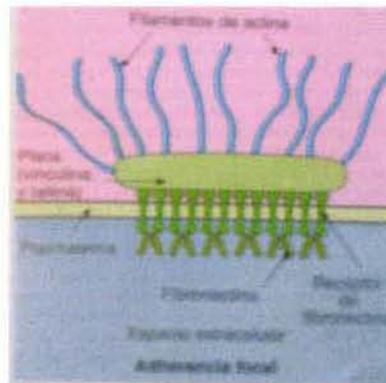


Fig1 Muestra la adherencia de la fibronectina a los filamentos de actina en el espacio extracelular. Alan Stevens, Histología Humana, 1998.

En ocasiones, la fibronectina plasmática queda atrapada en membranas basales que cumplen importantes funciones de filtración, como las de los glomérulos renales.



La fibronectina hística es una de las primeras macromoléculas estructurales que se deposita durante el desarrollo embrionario.

Forma una matriz "primitiva" que permite la organización inicial y que luego será sustituida por la matriz órgano específica definitiva.

Este papel de la fibronectina hística como matriz "indiferenciada" se repite en las fases iniciales de la reparación de las heridas.

Mecanismos de acción

La fibronectina durante un tratamiento quirúrgico suprime la inserción de las células epiteliales y el crecimiento y por tanto es benéfica para fomentar la nueva inserción.

Tiene actividad fibroblástica reparando lesiones por cicatrización de tejidos dentales sometidos a fuerzas ortodóncicas.

Formando continuamente prostaglandinas y glucosaminoglicanos, sintetiza anticuerpos mediante las células plasmáticas y une los fibroblastos a las células del sistema inmune esto hace que aumente la matriz extracelular, y neoformación tisular que ocurre en el ligamento periodontal .

La molécula de fibronectina tiene dominios especializados con sitios de fijación específicos que le permiten fijarse a las colágenas, los proteoglucanos, los glucosaminoglucanos, el fibrinógeno, la fibrina, superficies celulares, bacterias y DNA.



Las variadas propiedades de fijación de la fibronectina le permiten conectar a las células con otros componentes de la matriz extracelular e integrar así al tejido en una unidad funcional.

Mediante la acción de la trasglutaminasa (factor XIII de la cascada de la coagulación) la fibronectina entabla enlaces cruzados covalentes con ella misma, el fibrinógeno, la fibrina o la colágena. Esta formación de enlaces cruzados sería muy importante en las fases iniciales de la reparación de las heridas.

Esto nos dice que la tenascina esta presente de forma similar en el lugar de tensión y presión y la fibronectina va aumentando con la presión con forme se aumenta la tensión.

Además de colágenos y elastina, la matriz extracelular contiene varias otras glucoproteínas, de las cuales la mejor caracterizada es la fibronectina.

Las fibronectinas son una familia de glucoproteínas de composiciones de aminoácidos casi idénticas y propiedades similares. Todas las formas de fibronectina derivan de un solo gen.

Las variaciones menores en los empalmes determinan las diferencias organización inicial y que luego será sustituida por la matriz órgano específica definitiva. Este papel de la fibronectina hística como matriz “indiferenciada” se repite en las fases iniciales de la reparación de las heridas.

En la composición de aminoácidos que, a su vez, son responsables de las ligeras variantes en las propiedades biológicas dentro de la familia.



Función

Como sucede con otras proteínas plasmáticas, la fibronectina plasmática es sintetizada y secretada por los hepatocitos.

La mayoría de las células de origen mesenquimático, incluso fibroblastos y células endoteliales, secreta fibronectina hística.

En ocasiones, la fibronectina plasmática queda atrapada en membranas basales que cumplen importantes funciones de filtración, como las de los glomérulos renales.

La fibronectina hística es una de las primeras macromoléculas estructurales que se deposita durante el desarrollo embrionario.

Forma una matriz "primitiva" que permite la organización inicial y que luego será sustituida por la matriz organoespecífica definitiva. Este papel de la fibronectina hística como matriz "indiferenciada" se repite en las fases iniciales de la reparación de las heridas. Marca las vías migratorias de las células embrionarias, de modo que las células del organismo en desarrollo que están emigrando pueden llegar a su destino.

El plasma de la fibronectina de los hepatocitos es menor en tamaño que el de la fibronectina que es sintetizada por varias células en cultivos.

Los enlaces alternativos se encuentran localizados en tres sitios diferentes de la cadena del polipéptido.



Los segmentos tipo III EIIIA o EIIIB pueden estar unidos dentro o fuera. La tercera alternativa de unión ocurre en el segmento de la variable V, que es una región de 120 residuos que puede o no encontrarse o ser incluida solo parcialmente.

Estas alternativas de unión confieren diferentes propiedades en la molécula de la fibronectina tales como una mayor glucosilación, diferente sensibilidad a la proteasa y características de adhesión.

La fibronectina se adhiere a otras sustancias. La terminación N contiene (a) sitios importantes en la adherencia de la fibronectina a la fibrina, la heparina, los estafilococos, un sitio de unión cruzada a la transglutaminasa y un sitio para el ensamble de la matriz de fibronectina .

La adherencia de la fibronectina a la fibrina es importante en la incorporación de fibronectina en los coágulos sanguíneos. La fibronectina posee una unión cruzada con la fibrina en el residuo glutamina localizado a tres aminoácidos de la terminación N a través de la acción de la transglutaminasa .

La adherencia de la fibronectina y los sitios de unión cruzada de la transglutaminasa también están localizados junto a la terminación C y puede también jugar papeles similares mediando la participación de la fibronectina en la formación del coágulo sanguíneo .

El sitio de mayor adhesión a la heparina se encuentra probablemente localizado cerca de la terminación C, debido a que el sitio de la terminación N se adhiere a la heparina muy débilmente y no a toda la concentración salina fisiológica .



La adherencia de la fibronectina a los estafilococos puede facilitar el establecimiento de infecciones ocasionadas por tales bacterias.

La terminación N es también importante en el ensamblaje de las matrices de la fibronectina por los fibroblastos .

El heparan sulfato, particularmente el heparan sulfato transmembranoso con actividad de adherencia a la fibronectina puede jugar un papel muy importante en el ensamblaje de la fibronectina.

La fibronectina se adhiere a la mayoría de las colágenas desnaturalizadas. El sitio de adhesión de la colágena reside en las dos repeticiones tipo II .

Para la colágena tipo I, el sitio de adherencia en la molécula de colágena está cerca de o en el sitio de la hendidura de la colagenasa de los mamíferos. Adyacente al sitio de adhesión de la colagenasa, se encuentra el sitio de unión al DNA, cuyo significado es desconocido.

El principal sitio de unión celular está localizado en la porción media de la fibronectina en una repetición tipo III homóloga que contiene la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) Cuando cubre superficies plásticas, la fibronectina promoverá el enlace de los fibroblastos y otras células .

Existen dos sitios de unión celular probablemente menos importantes en el segmento de unión V de la fibronectina humana.



Mientras que la secuencia RGD comprende el sitio principal de adherencia en el segmento homólogo tipo III, comprendiendo también el principal sitio de adherencia de otras proteínas (colágena tipo I, vitronectina, fibrinógeno,

osteopontina, trombospondina, factor de von Willebrand), no está presente en los otros sitios de adherencia en la región alternativa de unión V, y el REDV y otras secuencias median la adhesión celular a estos segmentos de la fibronectina humana .

Las integrinas se presentan sobre las superficies celulares y se unen a las secuencias RGD (y también a las REDV) en la fibronectina.

El sitio principal de adhesión de la heparina reside en la terminación C en los tres segmentos homólogos tipo III de la fibronectina. Otros GAG's sulfatados también se unen a la fibronectina pero con una menor afinidad que la de otras heparinas. Los proteoglicanos se unen a la fibronectina a través de unión cooperativa del sitio GAG de sus cadenas.

Los proteoglicanos de las superficies celulares se unen a la fibronectina vía el sitio de unión a la heparina de la molécula. Debido a que los proteoglicanos pueden interactuar con la mayoría de las moléculas extracelulares, pueden de la misma forma promover la construcción de complejos de proteínas de matriz extracelular en las que la fibronectina se encuentra envuelta centralmente.

La adhesión de la fibronectina a las integrinas sobre la superficie de los fibroblastos también promueve la síntesis y deposición de matriz .

Se ha demostrado que la fibronectina tiene importantes efectos biológicos sobre una variedad de células blanco.



Promueve el crecimiento y anclaje de los fibroblastos y otros cultivos de células normales, el establecimiento de la polaridad de las membranas basales y la migración de una gran variedad de células, además de ser un quimiorreceptor de los fibroblastos.

La diferenciación de una gran variedad de células se ve afectada por la fibronectina. Por ejemplo, los condrocitos se vuelven fibroblastos, las células de músculo liso pierden su fenotipo contráctil, se inhibe la formación de módulos multicelulares por las células del músculo liso aórtico y las células malignas se revierten a un fenotipo de apariencia normal en presencia de fibronectina.

La fibronectina tiene actividad fibroblástica reparando lesiones por cicatrización de tejidos dentales sometidos a fuerzas ortodóncicas y formando continuamente prostaglandinas y glucosaminoglucanos, sintetiza anticuerpos mediante las células plasmáticas y une los fibroblastos a las células del sistema inmune esto hace que aumente la matriz extracelular, y neoformación tisular que ocurre en el ligamento periodontal como consecuencia del movimiento dental aumentando el colágeno pero deficientes en la unión al diente lo que determina bolsas profundas.

Las fibronectinas constituyen el prototipo de moléculas de adhesión en la matriz extracelular y plasma, el receptor integrina $\alpha 5 \beta 1$ de fibronectina está asociado con la glicoproteína de membrana plaquetaria Ic y IIa, receptor que puede mediar adhesión plaquetaria a las superficies cubiertas de fibronectina sin una señal previa de activación.



La fibronectina, que circula libremente en el plasma, las glándulas linfáticas, el suero y el fluido intersticial del organismo. Cuando un tejido sufre daños, la fibronectina se fragmenta y se dispersa hacia afuera, al contrario de la fibronectina intacta, que está presente en todo el cuerpo.

Estos fragmentos se unen a ciertos receptores de las células cercanas al tejido dañado, lo que los estimula a invadir y reparar la lesión.

Células del cáncer pueden mutar de manera tal que la fibronectina intacta las estimule a invadir también los tejidos. "El cáncer es el precio que pagamos por nuestra capacidad para sanar de las heridas.

Cuando la fibronectina intacta estimula las células del cáncer, estas pueden alcanzar fácilmente el torrente sanguíneo o el sistema linfático, entrar en metástasis, y extenderse a otras parte del cuerpo.

Cuando un tejido sufre daños, la fibronectina se fragmenta y se dispersa hacia afuera, al contrario de la fibronectina intacta, que está presente en todo el cuerpo.

La fibronectina del plasma es la única parte del suero necesaria para una invasión.

Falta página

N°

28



TENASCINA

La tenascina fue aislada en diferentes laboratorios y la cual recibió varios nombres que estudiaban aspectos diferentes de biología celular.

De acuerdo con esto tiene varios nombres incluso GMEM, antígeno miotendinoso, citotactina, J1220/200, hexabrachion, neuronectina La tenascina fue aislada de la matriz extracelular de tejidos diferentes.⁽¹⁾

Esta estructura se visualizó primero en el micrógrafo de preparaciones sombreadas rotatorias de la matriz extracelular aislado de los fibroblastos de humanos (Erickson e Iglesias, 1984).

ESTRUCTURA

Compuesta de una cadena larga hexamérica unida por puentes de disulfuro con un peso molecular de 190 a 320 KDa dependiendo del tejido donde se encuentre.

Con seis brazos largos que se extienden radialmente de una protuberancia central. Cada uno de los brazos posee una protuberancia terminal, un estrecho segmento distal y un delgado segmento proximal. Tres brazos unidos por una forma de enlaces disulfados de una unión tipo T.

Dos uniones son enlazadas mediante uniones disulfadas en la protuberancia central. Hay varios subtipos TN-C, TN-L (procesos de extensión) TN-S



(es insoluble e inhibe el crecimiento) TN-R, TN-W,-TN-X y TN-Y localizada en diferentes tejidos

Existen tres tipos de sitios de receptores para la tenascina estos sitios son el de fibrinógeno (El sitio se asemeja a la región terminal C de las cadenas de fibrinógeno β y γ que forman el nódulo D del fibrinógeno), fibronectina tipo III y factor de crecimiento epidermal (EGF)

BIOSINTESIS

Es elástica y posee sitios de unión para otras proteínas de la matriz extracelular y para receptores de adhesión de la membrana celular tipo glucocálix ⁽¹⁴⁾ y a los mismos receptores de integrinas como la fibronectina ⁽¹⁵⁾

MECANISMOS DE ACCIÓN

En los procesos inflamatorios reactivos esta altamente relacionada como en el liquen plano y esta presente en el estroma de muchas neoplasias (donde es ampliamente sintetizada por los fibroblastos alrededor de estos tumores), pero también es proporcional a la presencia y nivel de inflamación. Desaparece de las heridas durante el proceso de reepitelización y la contracción de la herida

El estado de adhesividad de las células es caracterizado por células diferenciadas, quiescentes (células en reposo) y el estado intermedio se da en células de cicatrización y durante la morfogénesis interactuando con otras células.



Esta distribuido en el ligamento periodontal debido a la función de este como soportar cargas mecánicas pesadas e interfases de tejidos mineralizados y no mineralizados, lo que hace pensar que la tenascina provee elasticidad participando en los procesos degenerativos y regenerativos de tejidos donde el ambiente biomecánico normal ha sido alterado.

La tenascina es regulada por varios factores de crecimiento, citoquinas, péptidos vasoactivos, proteínas de la matriz extracelular y factores biomecánicos como ya se había mencionado.

Su degradación se ha reportada por metaloproteinasas, elastasas y serinas lo que probablemente afectaría la cicatrización de las lesiones. ⁽¹⁶⁾

Como ya se menciona es importante en la reparación de heridas y tejidos como en la cicatrización de epitelio (mucosa oral), formación de tejidos de granulación y en los frentes de migración de las células epiteliales. ⁽¹⁷⁾

Una fuente importante de tenascina son los queratinocitos pero no parece que sean un substrato de adhesión para la migración de estos.

Las células especializadas están rodeadas por un matriz extracelular compuesta por colágeno, proteoglicanos y glucoproteínas sirve como sustrato para morfogénesis de tejido, brinda soporte y flexibilidad a tejidos maduros y actúa como distribución de información genética de forma que traduce e integra las señales intracelulares a través de diferentes receptores en la superficie celular esto tiene influencia en los procesos de crecimiento, diferenciación, migración y supervivencia.



La tenascina se muestra altamente expresada en los adultos en procesos de regeneración nerviosa, daños vasculares, formación de tumores y metástasis debido a su interacción con otras moléculas de la matriz extracelular y con diferentes células, asociada con cambios en la matriz extracelular.

Estas relaciones están reguladas por otras moléculas y por interacciones célula-célula cuando las células son de la misma especie son llamadas homotípicas y cuando son de diferente especie son llamadas heterotípicas.

Las interacciones homotípicas regulan el establecimiento y mantenimiento de las poblaciones celulares mediante condensaciones de células mesenquimales o vainas de células epiteliales.

Las interacciones heterotípicas median interacciones inductivas o morfógenicas de tejidos, también llamadas de inducción embrional y forman parte de interacción entre células tejidos.

Estas han sido agrupadas en tres grupos a través de contactos célula-célula mediados por unión GAP y por factores de crecimiento, morfógenos, hormonas y a través de moléculas de la matriz extracelular y sus receptores de superficie celular en esta categoría es donde esta asociada la tenascina moléculas de la matriz extracelular.

En el ciclo del desarrollo del órgano dental la tenascina comprende una serie de procesos biológicos, que incluyen interacciones epitelio-mesénquima, diferenciación celular, morfogénesis, fibrinogénesis y mineralización. Este ciclo inicia en la sexta semana de vida intrauterina y continua a lo largo de toda la vida del diente.



El desarrollo dental se divide en la diferenciación de la lámina dental a partir del ectodermo que tapiza la cavidad oral primitiva o estomodeo.

Estas son inducidas por el ectomesénquima adyacente, las células basales del epitelio dental proliferan, dando lugar a las láminas vestibular y dental.

En las células de la lámina vestibular se forma una hendidura que constituye el surco vestibular.

A partir de la lámina dental, se da un proceso de proliferación y diferenciación celular, que avanza secuencialmente a través de los estadios de brote, casquete, campana y formación radicular.

En el desarrollo morfogenético de los dientes, intervienen en una primera fase, desde el engrosamiento epitelial hasta el estadio de brote y la primera condensación del mesénquima, los factores BMP-2 y BMP-4 (proteínas morfogenéticas óseas).

Estos factores regulan la expresión de los genes *Msx-1* y *Msx-2* que determinan el patrón microscópico del órgano dentario a través de la regulación de distintas moléculas de la superficie celular y de la matriz extracelular, que condicionan la adhesión entre las células, la remodelación de la membrana basal, remodelación de la matriz que conducen a la condensación del mesénquima y a la morfogénesis epitelial.

Entre estas moléculas, se destacan en el mesénquima el sindecán -1 (proteoglicano de la superficie celular) y la tenascina (glucoproteína de la matriz extracelular).



Se ha sugerido que la tenascina, puede ser importante como estimulante de la diferenciación de los odontoblastos, asociada con cambios en la expresión de moléculas extracelulares.

La tenascina se localiza en los tejidos mesenquimatosos dentales, simultáneamente con otras moléculas tipo Sindecán-1 (proteoglicano de matriz extracelular con dominio intracelular), a las que se une, para regular conjuntamente cambios en la morfología celular, así como la adhesión de las células proliferativas y la condensación del tejido que rodea el mesénquima dental.

La tenascina se expresa durante la proliferación epitelial en la porción lingual del germen dental, en el mesénquima que rodea el brote y en la membrana basal. En la etapa tardía del brote epitelial, la tenascina y el sindecán están localizados en el mesénquima condensado que demarcado por el mesénquima que le rodea, y esto ocasiona una rápida proliferación celular.

En la etapa temprana del estadio de casquete, la tenascina está presente en el mesénquima que rodea el tejido epitelial, particularmente en la región donde la lámina dental y el órgano del esmalte se conectan al epitelio oral, la tenascina actúa reduciéndose en la papila dental, pero se encuentra aumentada en la membrana basal, posiblemente por su relación con la polarización y diferenciación de los odontoblastos.

Durante el estado temprano de campana, aparece intensamente en la región cuspídea del mesénquima dental y presenta un gradiente de concentración que disminuye hacia cervical. No se expresa en retículo estrellado ni en la diferenciación de los ameloblastos.



Con el avance de éste estado, se esparce en la totalidad del tejido pulpar y permanece en éste aún después del desarrollo completo de la corona y de la erupción del diente.

La papila dental coincide con el proceso de diferenciación de los odontoblastos que inicia en las cúspides, además de estar asociada a la formación de dentina. Por esto, su presencia en tejido pulpar maduro, puede reflejar la naturaleza de las células pulpares indiferenciadas no terminales.

Además, contribuye a la textura y remodelación del tejido fibroso que rodea al diente sin erupcionar.

La tenascina presenta una distribución estructural en bandas que se alteran con zonas de expresión y de no expresión, relacionadas a su incorporación periódica en el desarrollo de la matriz de dentina.

En los dientes maduros se encuentra en preentina en la región interodontoblástica, en la pulpa dental. En tejidos duros no ha sido identificada.

En el ligamento periodontal no muestra una distribución uniforme, ya que hay una mayor expresión en regiones relacionadas con superficies de adherencia a nivel de la zona osteoblástica, cementoblástica y en el precemento.

Esto puede asociarse con la elaboración de matrices de tejido mineralizado y/o la habilidad de los fibroblastos para diferenciarse en células formadoras de tejidos duros.



En hueso alveolar, matriz ósea y lagunas osteocíticas, se ha encontrado una expresión moderada de la tenascina, mientras que en las membranas óseas (periostio y endostio) su expresión es marcada.⁽¹⁸⁾

A nivel pulpar, en pulpa dental sana, la tenascina está distribuida en todo el tejido especialmente en la zona libre de células, pero en pulpa hialinizada y con inflamación crónica, está ausente.

La mayor expresión de la tenascina en la zona libre de células puede deberse a su función como mediadora del estrés mecánico o a su relación con la elaboración de dentina secundaria al facilitar la migración y diferenciación celular.

En las interfases de tejidos mineralizados y no mineralizados (dentina y predentina) la tenascina puede estar asociada con el estrés mecánico.

FUNCIÓN

Es un glucoproteína de la matriz extracelular de matriz oligomérica sintetizada por fibroblastos, las células gigantes y otras células mesenquimatosas asociada a la embriogenesis, y procesos de odontogenesis, angiogenesis y en el desarrollo neural participa en la remodelación y reparación de tejidos, estimula y dirige la capacidad de migración de los diferentes tipos de células, estructura de los tejidos con asociación con el estrés mecánico que soportan estos y desarrollo de tumores para esto debe relacionarse con células cuya interacción es regulada por la integrinas (matriz de adhesión)



También se encuentra durante la odontogénesis y en el tejido pulpar y periodontal durante el resto de la vida dental asociada a procesos de reparación y remodelación periodontal. Regulación de la migración de las células gliales del sistema nervioso central.

En la embriogenesis se encuentra en pulpa y predentina y en el adulto se encuentra en el periostio, ligamento y procesos de cicatrización.

Funciones:

Depende de la forma de presentación, ya sea soluble o insoluble (unida a un sustrato) y estado de diferenciación de células blanco.

Sirve para inducción del estado intermedio de adhesividad, caracterizado por pérdida de estrés con tenidos en las fibras de actina y reestructuración de las placas de adhesión esto funciona en los procesos de adaptación, reparación y produce señales de supervivencia para prevenir la apoptosis (muerte celular programada) debido a la pérdida de adhesión celular pero a la vez permitir la movilidad de las células.⁽¹⁹⁾

También juega un papel importante como modulador de la inflamación, en la morfogenesis de tejidos embrionarios participando en las interacciones epitelio-mesenquima, reparación de tejido pulmonar, degeneración interna de la membrana sinovial así como en la degradación e hipertrofia de esta, en placas arteroescleróticas humanas en este caso se relaciona con el grado de inflamación y también puede estar asociada a regeneración de tejidos y nervios periféricos.^(20,21)



ENTACTINA

La entactina fue aislada inicialmente desde la base de la matriz extracelular como membrana secretada por Rodent Yolk Sac⁽²²⁾. En la línea de las células pero no era bien conocida y caracterizada.

También fue aislado del sarcoma EHS por Timpl et al, derivado de la misma proteína. ⁽²²⁾

Su extracción bajo condiciones muy gentiles revela que es una cuarta molécula íntimamente asociada a la laminina debido a que se une a ella por tres brazos cortos de esa molécula (figura 2). Esta molécula fue originalmente llamada entactina y un fragmento anexo a la entactina, que formó estructuras del tipo de un nido, que fue denominada nidogeno.



Fig2. Muestra la estructura de la entactina y su unión con la laminina. J.F.G. Vliegthart. Glycoproteins II, New Comprehensive Biochemistry. 1997.

Estructura

La entactina/ nidogeno es una glucoproteína con una cadena polipeptídica simple, con un peso molecular de 150 kDa, que exhibe actividades de adherencia a la colágena tipo IV y la laminina en la terminal C y G₃ (figura 3).



Contiene secuencias RGD que son sitios de unión celular. También se encuentra unida al Heparan sulfato. ⁽²³⁾

Esta presente con dos dominios globulares separados por un dominio lineal rico en ⁽²⁴⁾

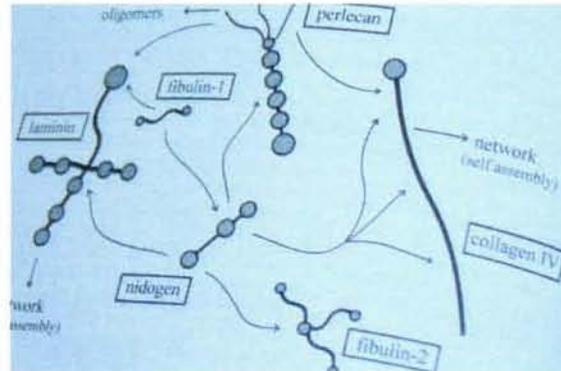


Fig 3. Muestra la unión de la entactina con las diferentes glucoproteínas de adhesión. Peter d. Yurchenko, David, Extracellular Matrix assembly and structure. New York.

En la forma larga del nidogeno se liga al dominio globular NC1 de colágeno IV en cromatografía al 86%, la unión del nidogeno con la laminina ayuda ala estabilización de la estructura de la membrana base. ⁽²²⁾

Biosíntesis

La entactina esta en unión con la membrana basal, la cual es de unión autónoma en la cual la interacción macromolecular de las proteínas es altamente ordenada en su arquitectura estructural de los tejidos animales.

La entactina es una proteína oligomérica grande que se observa en la superficie de células embrionarias y tumorales, se cree que el papel de la Entactina es verdaderamente antiadherente.



La entactina también está relacionada con el colágeno de tipo IV y por tanto facilita la fijación de la laminina a la red de colágeno.

La entactina se encuentra en las membranas basales específicamente en la lámina basal que se divide en lámina lúcida y lámina densa.

La lámina basal cumple varias funciones importantes por una parte actúa como sostén del epitelio, debido a su sostén del epitelio y permite la fijación de la parte inferior del epitelio con la matriz extracelular subyacente.

- En especial con el colágeno que contiene y actúa como filtro molecular pasivo que retiene moléculas sobre la base de tamaño, forma o carga eléctrica.

- Como filtro celular permite el paso de glóbulos blancos contra organismos invasores, impide el paso de otras células del tejido conectivo a que ingresen al epitelio.

- Como capa de sostén para el ingreso (migración) de células nuevas desde los bordes circundantes de la herida hacia el centro, influye en la diferenciación y la organización celular debido a que las moléculas de la matriz extracelular reaccionan con los receptores de superficie celular⁽²⁵⁾.

- La lamina densa se compone de un reticulado de glucoproteínas adhesivas como laminina, colágeno IV, entactina y proteoglicano como perlecano. (figura 4)

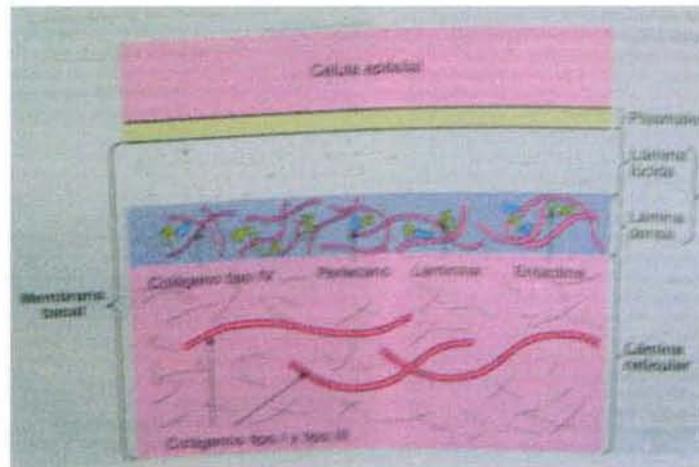


Fig 4 . Muestra la distribución de las proteínas de adhesión en la membrana basal. Alan Stevens, Histología Humana, 1998.

MECANISMOS DE ACCIÓN

Muestra adhesión a las células epiteliales y no epiteliales. ⁽²⁶⁾

Los anticuerpos contra ella solo se localizan en las membranas basales. No se conocen sus interacciones con otros componentes de la membrana basal ni su función, se cree que juega un papel importante en la adherencia y penetración del embrión primitivo. Junto con la tenascina esta es una glucoproteína no fibrilar.

Se cree que juega un papel importante en la adherencia y penetración del embrión primitivo por su parte la Trombosplastina se encuentra en concentraciones importantes en la MEC que rodea el revestimiento de los vasos sanguíneos maduros en donde parece inhibir la angiogenesis citoesqueleto y motilidad celular. ⁽²²⁾



REACCIÓN INFLAMATORIA EN EL PERIODONTO AL APLICAR FUERZAS ORTODONCICAS.

GENERALIDADES DE LIGAMENTO PERIODONTAL

Los tejidos que constituyen el periodonto.

Constituyen tejidos de sostén y protección del diente. Estos son:

- Encía
- Ligamento periodontal
- Hueso alveolar
- Cemento

En este capítulo nos enfocaremos al ligamento periodontal

Ligamento periodontal

Tejido conectivo que rodea la superficie radicular y vincula el cemento con el hueso. Es una continuación del tejido conectivo de la encía y se comunica con los espacios medulares a través de los conductos vasculares del hueso. ⁽¹⁹⁾ Se encuentra ocupando el espacio del ligamento periodontal.

Este espacio tiene un ancho variable según la pieza dental y la edad. Mide en promedio de 0,25 mm más o menos 50%.

Tiene forma de reloj de arena: ancho en cervical y apical y más angosta en el fulcrum o eje de rotación (unión tercio medio con el tercio apical).

Las fibras del ligamento periodontal son colágenas, reticulares, elásticas, oxitalámicas.



Las fibras de colágena son las más importantes, le permiten cumplir su función principal. Se forman mientras la pieza hace erupción. Nacen del cemento y del hueso, se insertan en cemento y hueso, que son las fibras de Sharpey.

Estas fibras se hacen más gruesas y se fusionan en el centro del ligamento, fusión que se llama plexo intermedio, el que permite la acomodación de las fibras cuando completa su erupción. Toman un trayecto regular formando grupos de fibras colágenas, las que se caracterizan por un trayecto ondulado, de "S" itálica, lo que les permite enderezarse para cumplir su función (no son elásticas).

Grupos de fibras principales

- Fibras de la cresta alveolar: Se extienden en sentido oblicuo desde el cemento por debajo del epitelio de unión hasta la cresta alveolar. Tienen una inserción superior en cemento. Su función es absorber las fuerzas de extrusión y se oponen a los movimientos laterales. Son muy pocas.
- Fibras horizontales: Se extienden en ángulos rectos respecto al eje longitudinal del diente, se encuentran en la porción más cervical del diente desde el cemento hasta el hueso alveolar. Otro grupo está muy cercano al ápice. Las fibras permiten absorber fuerzas laterales.
- Oblicuas: son las más numerosas, tienen un trayecto descendente del hueso al cemento. (Inserción más superior en el hueso). Soporta las fuerzas axiales, soportan las tensiones masticatorias verticales y las transforman en tensión sobre el hueso alveolar.



-Apicales: irradiada alrededor del ápice. Inserción más superior en el cemento. Soportan las fuerzas de extrusión. Permiten también amortiguar las fuerzas de intrusión.

- Oxitalán : van paralelas con la superficie radicular en dirección vertical y se flexionan para fijarse en el tercio cervical de la raíz, se piensa que regulan el flujo vascular

El eje de rotación permite a la pieza girar y un movimiento fisiológico. Cuando hay una fuerza que gira en torno a su fulcro, se desplaza en un sentido en la zona coronaria y en sentido inverso en la zona apical. A una zona se transmiten fuerzas de presión, al otro lado se producen fuerzas de tracción.

Las fuerzas de presión transmitidas por el ligamento se traducen en reabsorción del hueso, las de tracción, permiten aposición de tejido óseo. Donde ocurre una constante remodelación fisiológica.

Células

Las fibras del ligamento periodontal remodelan las fibras principales para lograr la adaptación ante las necesidades fisiológicas y en reacción a diferentes estímulos.

-Fibroblastos: función de formar y fagocitar fibras colágenas mediante hidrólisis enzimática. y matriz intercelular.

-Osteoblastos: se encuentran en el ligamento periodontal en relación con el tejido óseo. Son los responsables de la formación del hueso.

- Cementoblastos: ubicados en relación, al cemento, responsables de la formación de cemento secundario.



-Osteoclastos: En relación con el hueso. Responsables de producir la reabsorción del hueso.

- Células epiteliales: restos de Malasez. Se estiman que son remanentes de la vaina de Hertwig, que se desintegra durante el desarrollo radicular. Se distribuyen cerca del cemento a través del ligamento periodontal de casi todos los dientes sobretodo en ápice y región cervical. Se disminuyen con la edad, al irse degenerando y a la vez desapareciendo o pueden sufrir calcificación para convertirse en cementículos.

-Células mesenquimáticas indiferenciadas: se pueden transformar en cualquier tipo celular.

SUSTANCIA FUNDAMENTAL

El ligamento periodontal cuentan con una porción considerable de sustancia fundamental que rellena los espacios entre las fibras y las células, consta de glucosaminoglucanos, como ácido hialurónico y proteoglucanos y glucoproteínas y con un contenido elevado de agua como del 70%

Funciones del Ligamento Periodontal

-Física: de soporte al órgano dental, transmisión de las fuerzas oclusales al hueso, en íntima relación con la función formativa, formar tejido para protección de vasos y nervios de lesiones por fuerza mecánicas, conservación de tejidos gingivales.

-Formativa: formar cemento o hueso de acuerdo a las demandas funcionales según las fuerzas transmitidas, función de los osteoclastos.



- El ligamento en forma normal no tiene cementoclastos (solo aparecen en funciones específicas). Los fibroblastos actúan de acuerdo a las necesidades funcionales.
- Sensorial: tiene terminaciones nerviosas de presión, al tacto y dolor. Es capaz de detectar anomalías en la oclusión.
- Nutrición: relacionado con la vascularización.⁽²⁷⁾

INFLAMACIÓN

Inflamación es la denominación dada a la reacción del organismo vivo frente a una lesión tisular y el principal mecanismo de defensa.

En un principio la inflamación es una reacción de defensa local con el objetivo de destruir o debilitar el agente causal, limitar la lesión tisular y reconstruir la estructura original mediante la regeneración o la cicatrización, lo que puede estar acompañada de una reacción sistémica.

La reacción inflamatoria tiene lugar en el tejido conectivo donde juegan un papel importante los leucocitos, sobre todo los granulocitos, neutrófilos, donde en condiciones normales se encuentran en un escaso número en este tejido.

La reacción inflamatoria incluye una cascada de procesos que pueden tener lugar sin afectar reacciones inmunes específicas pero en la mayoría de los casos es seguida de una reacción inmune influyen sobre las células endoteliales de las vénulas poscapilares, que se contraen y aumentan la permeabilidad de los vasos; además, junto con la histamina liberada por los mastocitos, causan la relajación de la musculatura lisa de las arteriolas, lo cual aumenta el flujo sanguíneo.



De este modo hay incremento de la temperatura de la zona y el incremento de la permeabilidad permite que el plasma fluya hacia el tejido conectivo, que aumenta de tamaño hasta formar el edema de la inflamación (gr. *oidemo*, tumefacción; edema implica flujo de líquido hacia los espacios intercelulares con el consecuente incremento de volumen del tejido).

La mayor cantidad de líquido causa presión sobre las terminaciones nerviosas sensitivas, que además son estimuladas por varios de los mediadores de la inflamación, y en conjunto causan dolor.

El factor de necrosis tumoral alfa y la interleuquina-1 estimulan las células endoteliales de las vénulas poscapilares para que expresen moléculas de adhesión celulares, lo cual conduce a la fijación de leucocitos al endotelio y su consecuente pasaje hacia el tejido conectivo de la zona inflamada.

Esta migración de leucocitos comprende las siguientes fases: en la fase primaria de adhesión los leucocitos de la zona marginal realizan un "rolido" sobre las células endoteliales, donde se fijan y se separan alternativamente de la superficie celular.

Esto es causado por las moléculas de adhesión celular ya expresadas sobre la superficie endotelial, pertenecientes a un grupo denominado selectinas, entre ellas selectina E (de endotelio) y selectina P (de plaquetas).

Las selectinas se unen a los ligadura (bajo la forma de oligosacáridos específicos) en la superficie de los leucocitos.



La unión es bastante débil, pero el rolido disminuye la velocidad de flujo de los leucocitos y el mayor contacto con el endotelio induce modificaciones de la conformación de las moléculas de integrina sobre la superficie del leucocito, de tipo LFA (leucocito, antígeno asociado a la función leucocitaria).

Debido a esto, en la segunda fase de adhesión los leucocitos se fijan con fuerza al endotelio que, estimulado por la interleuquina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa, entre otros, expresa otras moléculas de adhesión celular, por ejemplo ICAM (molécula de adhesión celular intercelular) y VCAM (molécula de adhesión celular vascular), que actúan como ligadura para las moléculas de integrina LFA en la superficie de los granulocitos neutrófilos, los monocitos y los linfocitos.

De este modo, las células se detienen y migran entre las células endoteliales hacia el tejido conectivo, atraídas por las quimioquinas secretadas por el endotelio.

Las distintas moléculas de adhesión se expresan en diferentes momentos, de acuerdo con tipos variables de mediadores que estimulan las células endoteliales y también por la especificidad de las moléculas de adhesión para diversos tipos de leucocitos.

En conjunto, esto determina que determinados tipos de leucocitos son reclutados en un orden específico.

Por lo general, en la zona de inflamación intervienen primero los granulocitos neutrófilos, que después son reemplazados por los monocitos (que se diferencian a macrófagos) e incluso linfocitos. Además, determinados tipos de leucocitos intervienen en distintos tipos de inflamación.



Con independencia de las características de la inflamación, gradualmente se produce la destrucción de las bacterias por fagocitosis, en un principio debido a la acción de los granulocitos neutrófilos, que mueren al cabo de pocos días, en parte debido a su corta vida media.

Se forma pus, que es el cúmulo de leucocitos muertos y tejido destruido. Los síntomas clínicos cardinales de inflamación -tumor (tumefacción), rubor (enrojecimiento), calor y dolor- se entienden de inmediato a partir de la naturaleza del proceso inflamatorio.

Con posterioridad se agregó un quinto síntoma cardinal a los cuatro originales, la pérdida de la función.

En las últimas fases de la inflamación, los macrófagos continúan la fagocitosis de las bacterias y eliminan además las células muertas, los restos celulares y otras sustancias presentes. También comienzan los procesos de reparación.

La mayor parte de los macrófagos se originan por diferenciación de los monocitos reclutados hacia la zona de la inflamación desde el torrente sanguíneo. ⁽¹¹⁾

La fibronectina puede unirse a las plaquetas por dos mecanismos:

1.- Donde involucra un receptor no-integrina, el complejo glucoproteína Ib donde media la adhesión de plaquetas a la zona de lesión y da un vía alterna al receptor integrina (α IIb β 3), el complejo glucoproteína IIb-IIIa es involucrado en la agregación plaquetaria, que es activado por trombina o ADP



Las principales integrinas presentes en la superficie de las plaquetas que participan en el proceso de adhesión y agregación plaquetaria son el colágeno (GP Ia-Ib), la fibronectina (GP Ic-IIa), la laminina ($\alpha 6-\beta 1$), Factor von Willebrand, la vitronectina y el fibrinógeno y para la agregación el fibrinógeno, la fibronectina, el Factor von Willebrand la vitronectina el receptor de los tres es (GP IIb-IIIa), sin embargo no importa el agonista sino la formación del coágulo plaquetario que es la agregación plaquetaria donde participan los receptores de glucoproteínas IIb-IIIa (integrinas más abundantes en la membrana plaquetaria 50 000 por célula) y en esta agregación plaquetaria participan la fibronectina y la vitronectina donde son receptores y favorecen la adhesión plaquetaria a subestructuras endoteliales



TÉCNICAS PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS

TÉCNICA DE LOWRY

Es un experimento que consiste en la cuantificación es una técnica coliremetricas y espectrofotometricas para determinación proteínica contenida en una solución.

Sus ventajas. Es confiable para la cuantificación proteínica por la poca variación entre las diferentes proteínas.

Sus desventajas: Mucha interferencia de las sustancias, Proporción de la reacción lenta, Inestabilidad de ciertos reactivos, Proteínas desnaturalizadas irreversiblemente.⁽²⁸⁾

ELECTROFORESIS

La electroforesis es la migración de iones en un campo eléctrico, se emplea profusamente para la separación analítica de moléculas biológicas.

La emigración electroforética resultante del ion a través de la disolución experimenta la oposición de una fuerza de fricción, se aplica en realidad, solamente a dilución infinita en un disolvente no conductor.⁽²⁹⁾

Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida es comúnmente denominada electroforesis en poliacrilamida (PAGE, 'polyacrilamide gel electrophoresis') es una de las técnicas más ampliamente usada para caracterizar mezclas complejas de proteínas.



Es un método conveniente, rápido y económico a nivel de muestra debido a que se requieren sólo cantidades del orden de microgramos de proteína.

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.

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. El porcentaje a emplear dependerá del tamaño de las proteínas a separar. En un gel en gradiente la proteína migra hasta que alcanza una zona donde el tamaño de poro impide cualquier avance. Una vez que se alcanza el 'límite de poro' no se produce una migración apreciable aunque no se detiene completamente.

Resuelve mejor las bandas pues las concentra en regiones muy estrechas, incrementa el rango de pesos moleculares que se pueden resolver en un mismo gel comparado con los de una concentración fija.

Algunas desventajas 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).

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 centro 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 porcentaje 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. Como lo son la fibronectina, tenascina y entactina.

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



Una electroforesis desnaturizante, la más común, es la que somete a las proteínas a migración asegurando la completa desnaturización (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 desnaturizante más empleado es el sodiododecilsulfato o SDS, un detergente.

Una electroforesis nativa es la que somete a las proteínas a migración sin desnaturización. 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).

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').⁽²⁴⁾

Se trata de un tipo de electroforesis desnaturizante en la que las muestras se desnaturizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturiza y recubre a la proteína), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

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 cargue 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.



SDS es un detergente de acción desnaturizante que se une a las cadenas polipeptídicas desnaturizadas 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.

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.

El inmunoblot se lleva 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 se realizó por 45 minutos. La membrana de nitrocelulosa fue lavada dos veces con PBS .

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. ^(30, 31)



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

No se conoce si hay presencia de las proteínas de adhesión celular como la fibronectina, tenascina y entactina en el ligamento periodontal cuando se aplican fuerzas ortodóncicas.

Debido a que se piensa que al aplicar diversos tipos de fuerzas ortodóncicas se ocasiona un proceso de reacción como es la inflamación en el ligamento periodontal y al ocurrir esta reacción del ligamento periodontal debido al estímulo puede haber un aumento, disminución o no ocurrir nada con las glucoproteínas de adhesión.

JUSTIFICACIÓN.

Debido a que en la investigación bibliografía se encontró que la fibronectina interviene en los procesos de cicatrización al aplicar fuerzas ortodóncicas y sirve como medio de unión para células y otras proteínas como la colágena, la tenascina debido a que este presente en el ligamento periodontal para soportar fuerzas, regeneración, adhesión, modulador de la inflamación. La entactina sirve como medio de unión para otras proteínas como la colágena y la laminina.

Se usan diferentes técnicas de determinación proteica como la técnica de Lowry que nos sirve para determinar la cantidad de proteína presente en una muestra de ligamento periodontal



La otra técnica sirve para separar las proteínas por su tamaño macromolecular y así poder determinar su presencia en la matriz extracelular del ligamento periodontal sano y en ligamento periodontal al que se le aplicaron fuerzas ortodóncicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Determinar el efecto de los movimientos ortodóncicos en la expresión, funciones y determinar la presencia de la fibronectina, la tenascina y la entactina como moléculas de adhesión celular del ligamento periodontal en humanos.

Objetivo Específico.

Determinar la presencia de proteínas de adhesión celular mediante el uso de técnicas como la de Lowry que sirve para determinación de proteínas y electroforesis para determinar el tamaño molecular de las proteínas presentes en las muestras de ligamento periodontal y si hay presencia de fibronectina, tenascina y entactina en muestras de ligamento periodontal tomadas de dientes sometidos a fuerzas ortodóncicas mediante el uso de anticuerpos primarios y secundarios.



HIPÓTESIS

Hipótesis de trabajo

Los movimientos ortodóncicos en el diente producen inflamación en el ligamento periodontal y debido a las fuerzas aplicadas produce un aumento de proteínas de adhesión como la fibronectina, tenascina y entactina

Hipótesis Nula

En el ligamento periodontal al aplicar los movimientos ortodóncicos no existe modificación en la presencia de proteínas de adhesión puesto que la fuerza aplicada al diente es mínima y no produce procesos inflamatorios.



METODOLOGÍA

En esta investigación se utilizó en el ligamento periodontal de los premolares sometidos a presión ortodóncica, los cuales recibieron 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. En los cuales su plan de tratamiento contempló extracciones de premolares superiores, inferiores o ambos. Se realizó la extracción de los premolares en la cual se obtuvieron muestras del ligamento periodontal de la zona cervical, media y apical del premolar controla los cuales no se aplicaron fuerzas y de los premolares con aparatología experimentales a los cuales se les aplicó fuerzas. Todas las muestras fueron colocadas en solución de suero fisiológico para su posterior procesamiento.

La muestra de ligamento periodontal de 5 premolares tratados ortodóncicamente fueron tomadas como grupo experimental, contando 5 muestras de ligamento periodontal de premolares no tratados ortodóncicamente fueron tomadas como grupo control.

Los ligamentos periodontales 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 cuantificara en las muestras utilizando albúmina de suero bovino como estándar por la técnica de Lowry (1951). Como a continuación se describe.

Obtenidas las muestras de ligamento periodontal para su análisis, fueron sometidos a Western blot.



Se determino la presencia de las moléculas de adhesión celular (fibronectina, tenascina y entactina) del ligamento periodontal por Western blot.

El equipo utilizado para realizar la técnica de Lowry es un espectrofotometro, 11 tubos de ensaye para la colocación de soluciones y muestras, pipetas de 10 μ l, 200 μ l y 1ml para colocación de muestras (figura 5), gradilla para tubos de ensaye, mezclador de espectrofotometro, y reactivos.



Fig 5. Muestra los diferentes tamaños de pipetas utilizadas y las 5 muestras de ligamento periodontal. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala.

CURVA DE PROTEÍNAS

Con esta técnica se cuantifico la cantidad de proteína en muestras de ligamento periodontal de dientes a los que se les aplicaron fuerzas ortodoncicas y a los que no se les aplicaron fuerzas.



Se colocaron 11 tubos de ensaye en la gradilla de los cuales, 10 tubos son para las muestras 2 tubos para cada una muestra de ligamento periodontal y un tubo es el control.(Figura 6)



Fig 6. Muestra los tubos de ensaye con agua y soluciones sin muestra Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala.

A los once tubos se les coloco 1ml de agua destilada con 3 ml de solución C que es la combinación de la solución A y B . También a los 10 tubos se les adiciona .050 μ l de muestra de ligamento periodontal y esperamos 15 minutos; El contenido de las soluciones A y B se muestran en los anexos. Figura 2 Muestra los tubos de ensaye con agua y solución A y B

Se Prepara la solución D que contiene 2.2ml. de folin y 2.2 ml. de agua de esta solución se colocan .300 μ l de esta solución a los once tubos y esperamos 30 minutos. (Fig 7)

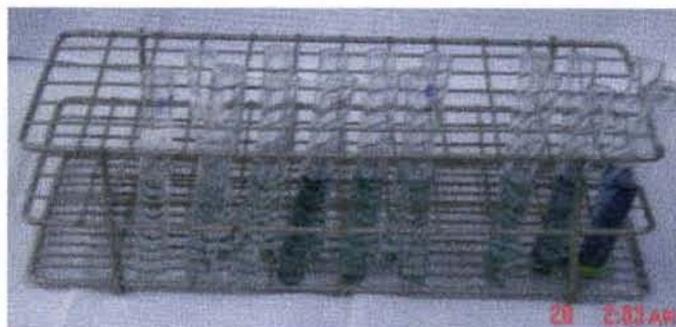


Fig 7. Muestra los tubos de ensaye con la muestra y solución D. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala.



Se leen las muestras en el espectrofotometro leyendo a una longitud 660nm. (Figura 8) Este se lleva a cero con el tubo blanco, se fueron colocando las muestras en el espectrofotometro que nos fue dando los resultados de la cantidad de absorbancia de proteína total que es reportada en mg/ml.



Fig 8. Espectrofotometro. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala.

Una vez obtenidos los resultados en el espectrofotómetro, se busca la muestra más estable y se realiza una formula ya establecida para sacar el promedio de cada muestra(Tabla 1), y así poder colocar la cantidad de muestra en el gel y así ser colocada en la cámara de electroforesis (Tabla 2).

		H ₂ O	Muest.	Sol. C	Sol. D	1	2	Prom.	Form.
Está.		1ml		3ml	.300µl				
M ₁	44B ₁₂	1ml	.050 µl	3ml	.300µl	.086	.070	.078	.952
M ₂	45 ₁₀	1ml	.050 µl	3ml	.300µl	.052	.049	.050	.617
M ₃	44 _{SAPG}	1ml	.050 µl	3ml	.300µl	.483	.313	.398	4.91
M ₄	Erick2 _{34IV}	1ml	.050 µl	3ml	.300µl	.325	.204	.264	3.25
M ₅	34 ₁₁	1ml	.050 µl	3ml	.300µl	.136	.140	.138	1.70

Tabla 1 con muestras y mediciones de sustancias



El extracto crudo de proteína fue sometido a electroforesis vertical en geles de acrilamida a 6%. Aquí las muestras fueron sometidas a una electroforésis de poliacrilamida con SDS al 10% y la corrida se llevará a cabo por 2 horas a 100 volts.

M ₁	44B ₁₂	Promedio .952	80 %	33.6
M ₂	45 ₁₀	Promedio.617	80 %	51.2
M ₃	44 _{SAPG}	Promedio 4.91	80%	32.4
M ₄	Erick2 ₃₄ IV	Promedio 3.25	80 %	10
M ₅	34 ₁₁	Promedio 1.70	80 %	18.8

Tabla 2. Promedios obtenidos de la electroforesis

Para la realización del gel se utiliza el estante para el gel, estructura para el gel, cristal grueso y delgado para el gel, peines de plástico para hacer la separación de celdas, tapa y tanque para electroforesis. (figura9 y 10)



Fig. 9 Muestra los aparatos utilizados para realizar la electroforesis Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala.

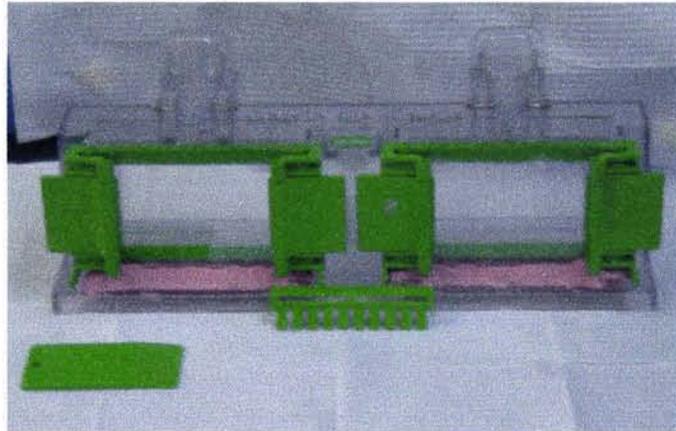
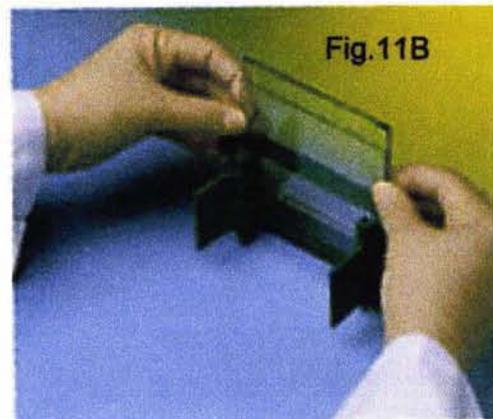
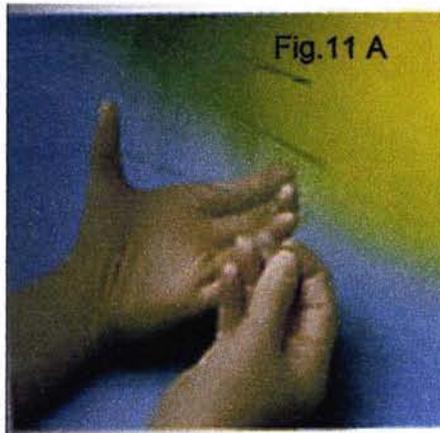


Fig 10. Muestra Cristales para realizar el gel de poliacrilamida. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Primero se colocan los cristales para gel y enseguida se colocan en la estructura para los cristales el cristal más delgado va por delante como se muestra en las figuras 11 A y 11 B



Una vez colocados los cristales en la estructura se colocan en el soporte para la realización del gel. (11 A y 11 B) Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

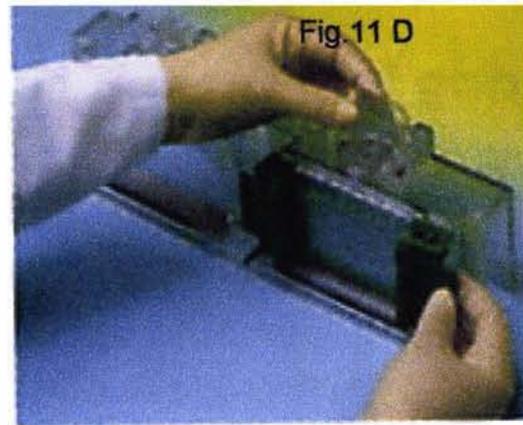
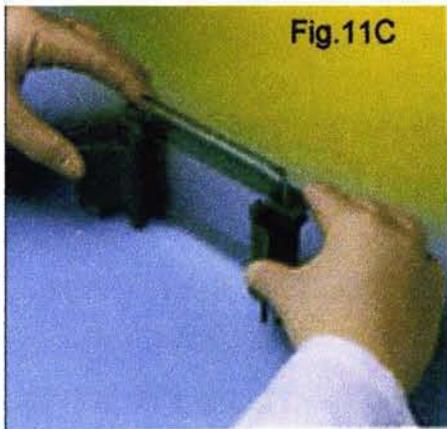


Fig. (11 C y 11 D) muestran la colocación de los cristales en la estructura y en soporte para la estructura. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Se fabricaron los geles de poliacrilamida al 6% donde se realiza un separador y uno es el empacador; Del separador se preparan 20 ml el cual esta formado por diferentes sustancias a las que nombramos solución 1, solución (acrylamide mix) 2, solución (1.5M tris con un pH de 8.8) solución 4 (SDS al 10%), agua, Pods (APS al 10%) y TEMED este gel fue preparado al 6% para que el poro del gel sea más grande y las proteínas puedan bajar mas fácil.

Del empacador se preparan 4ml para la fabricación de dos geles el cual esta formado por agua 1.4ml, Solución 1 0.33 μ l (acrylamide mix), solución 3 0.25 μ l (1.0M tris con un pH 6.8), solución 4 0.02 μ l (10% SDS), Pods 0.02 μ l(10% APS) y TEMED 0.002 μ l.

Estas soluciones se mezclan en las proporciones antes mencionadas y se van colocando con una pipeta en los cristales para electroforesis una vez gelificado el separador se realiza la mezcla del empacador y se espera



su gelificación colocando el peine de plástico para la formación de las celdas y posteriormente colocar las proteínas. (Figura 12)

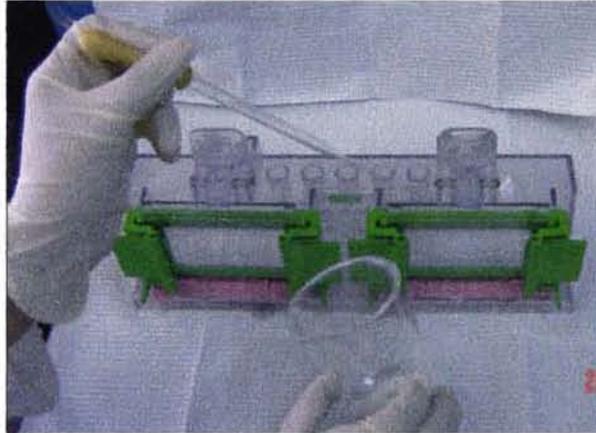


Fig 12. Realización del gel de poliacrilamida. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Las muestras se fueron colocando enumeradas del 1 al 5 en las primeras 5 celdas y en las otras 5 celdas se colocaron igual, en todas se colocaron 80 μ l de muestra con una jeringa de la cual se fue lavando cada vez que se colocaba la muestra (Figura13 A a la13E)

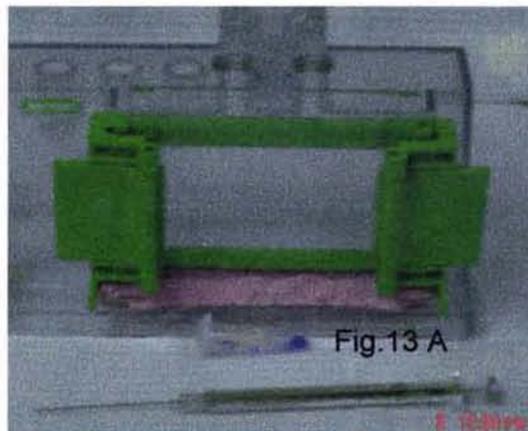


Fig 13 A. Se muestra gel de poliacrilamida, con jeringa y muestra de ligamento periodontal con azul de Comassi. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

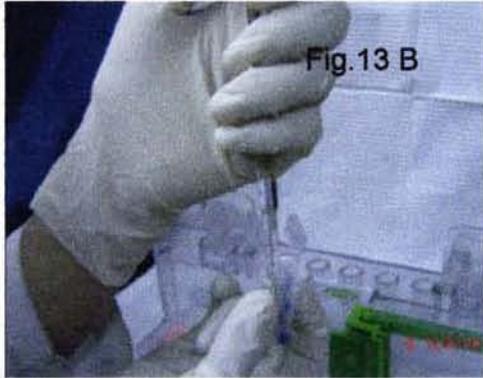


Fig. 13 B y C Toma de las muestras de ligamento periodontal con azul de Comassi para ser colocadas en el gel de poliacrilamida. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

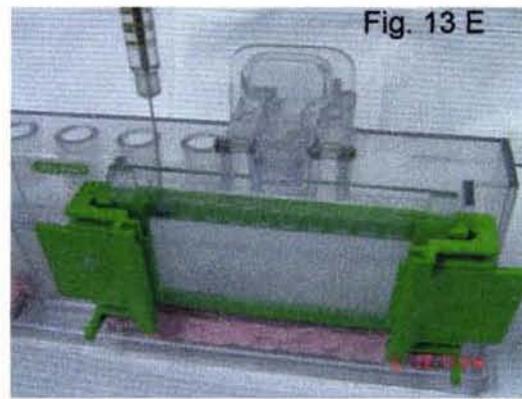


Fig 13 D y E. Colocación de las muestras en el gel de poliacrilamida. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

De cada muestra se colocaron diferentes cantidades de la Muestra 1 se colocaron 33.6 μ l, de la muestra 2 se colocó 51.2 μ l, de la muestra 3 32.4 μ l, de la muestra 4 10 μ l y de la muestra 5 18.8 μ l. como se muestra en la figura 14

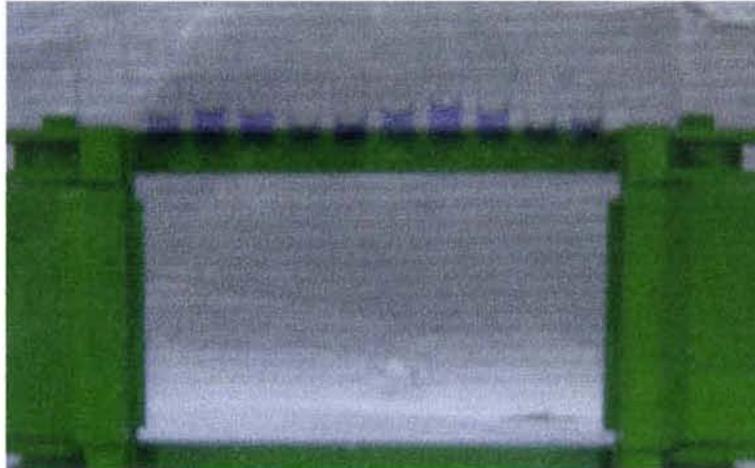


Fig 14. Muestras ya colocadas en el gel de poliacrilamida. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Se realiza otro gel el cual se tiñe sumergiendo el gel en 5 vol. de colorante al menos 1 h con agitación suave o toda la noche y después se realiza una destinción con solución para desteñir de 10% acético en 20% metanol y agua. (Figura 15)

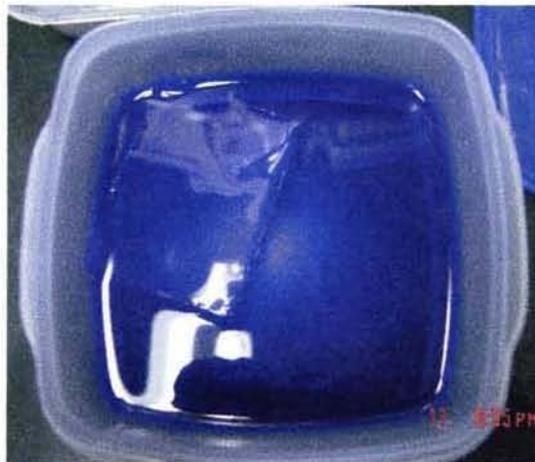


Fig.15 Muestra el gel de poliacrilamida en tinción. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Estos geles se deshidratan con solución para endurecer (Figura 16 A y B), y se colocan en papel celofán para conservarlos.

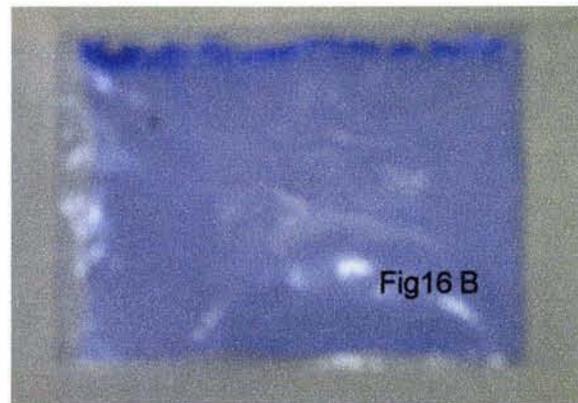
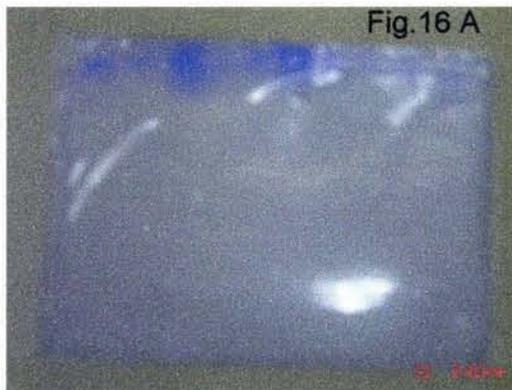


Fig. Fig.16 A y B Geles ya deshidratados colocados en papel celofán. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Después de colocadas las muestras en el gel se colocó el gel en la cámara de electroforesis por 2 hora a 160 voltios. Figura 17 muestra el aparato de electroforesis.



Fig. 17 Muestra al aparato de electroforesis. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Una vez colocadas las muestras en el gel se retiran los cristales del soporte y se colocan en el cassette como muestra la figura 18 A; Una vez colocados en el cassette se colocan en el armazón para sujetar el cassette como muestran las figuras 18 A y 18 C para posteriormente ser llevadas a la cámara de electroforesis.

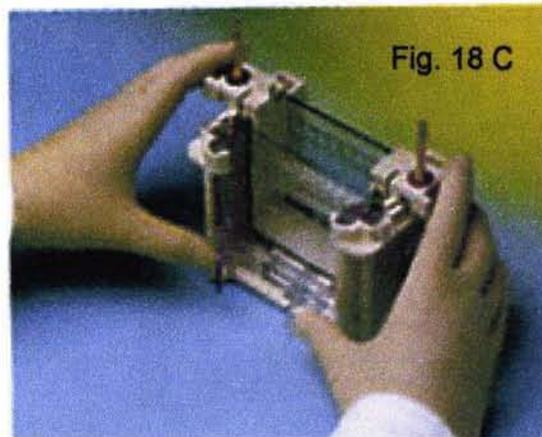
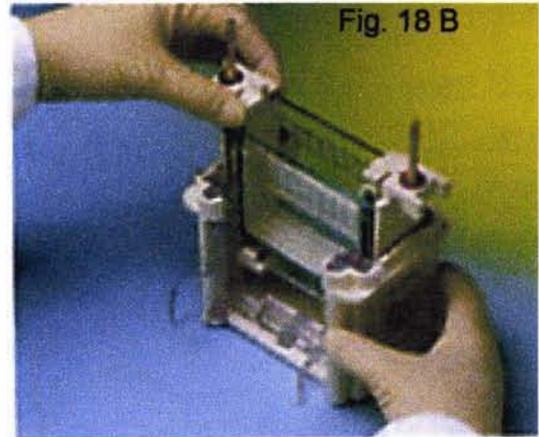
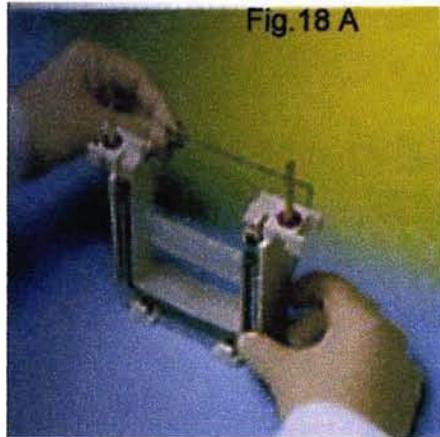


Fig. 18 A, B y C Colocación de los cristales para ser llevados a la cámara de electroforesis. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

En la cámara de electroforesis se coloca el buffer para electroforesis este debe estar refrigerado, el cristal más pequeño se coloca hacia el centro donde es mayor la fuerza de electroforesis.



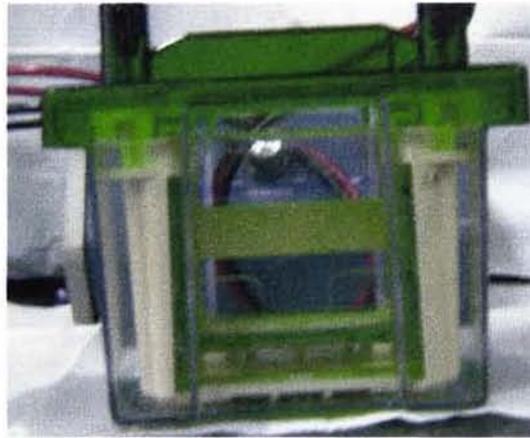


Fig. 20

Fig. 19 Muestra El electrofotometro ya encendido y en la Fig 20 se muestra el gel de poliacrilamida con las proteínas ya colocadas. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

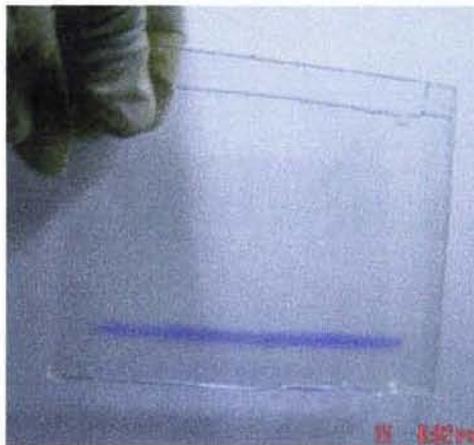


Fig.21 Muestra el nivel de proteínas a través del gel. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Después de dos horas de electroforesis del gel se observa como las proteínas presentes en la muestra bajaron al nivel deseado Figura 21, enseguida este gel será llevado para realizar la transferencia de las proteínas en la membrana, utilizando papel de nitrocelulosa como membrana receptora.



TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS

Los geles resultantes fueron preparados para inmunoblot.

El inmunoblot se llevo a cabo en un medio de transferencia (Tris-metanoglicina; 50/25/12 p/p) en cámara de transferencia por 45 minutos a 100 miliampers, utilizando papel de nitrocelulosa como membrana receptora.

Figura 22

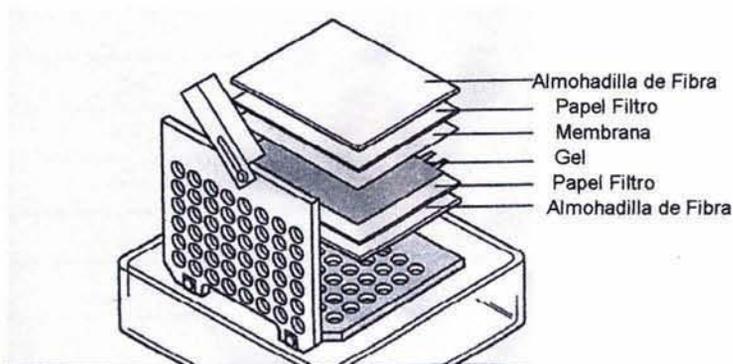


Fig 22 Muestra esquemática de la colocación de la almohadilla de fibra, papel filtro, gel, papel de nitrocelulosa como membrana receptora, papel filtro y almohadilla de fibra. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Las almohadillas, el papel filtro el gel y la membrana se van acomodando en el cassette de abajo hacia arriba siempre en un medio húmedo en este caso se utiliza un buffer especial para transferencia.

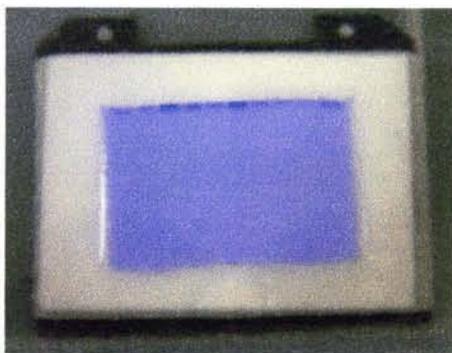


Fig. 23



Fig. 24



Fig.23 Muestra al gel colocado para hacer la transferencia, Fig.24 Muestra el papel de nitrocelulosa para la recepción. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Una vez colocado el sándwich se colocan en el cassette para posteriormente colocarlo en el aparato de transferencia. Figura 25 a la 28.

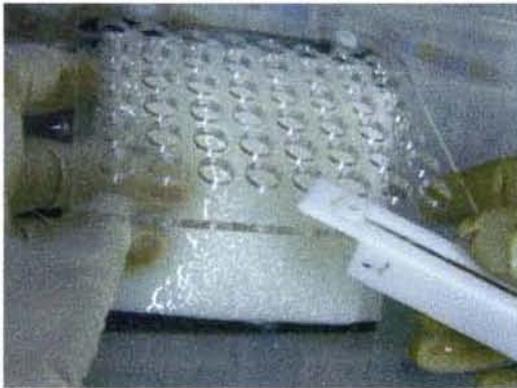


Fig. 25

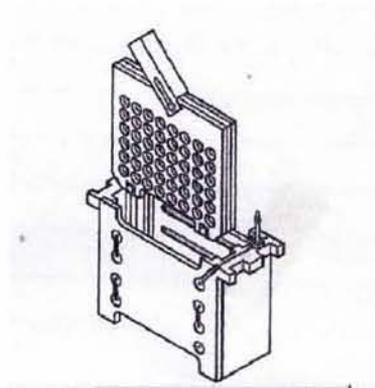


Fig. 26

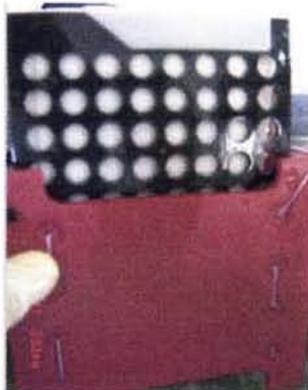


Fig. 27



Fig. 28

Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

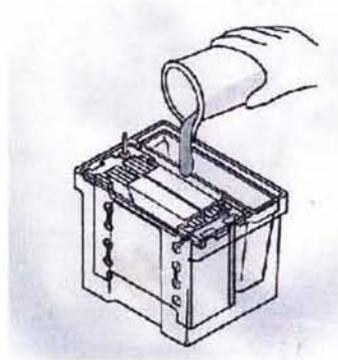


Fig.29 Muestra la colocación de solución para transferencia, esta debe estar refrigerada. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztaca

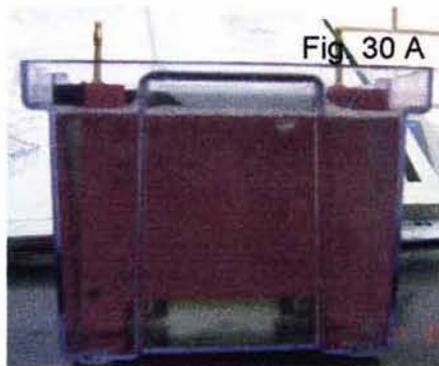


Fig. 30 A

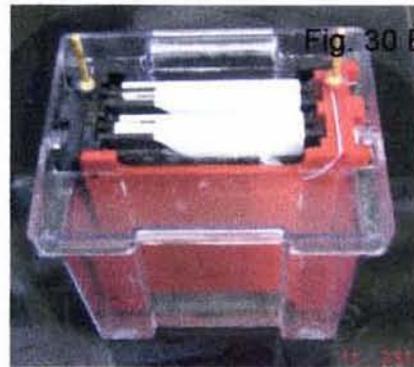


Fig. 30 B

Fig. 30 A y B Muestran la cámara la transferencia por diferentes vistas ya con el cassette dentro. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

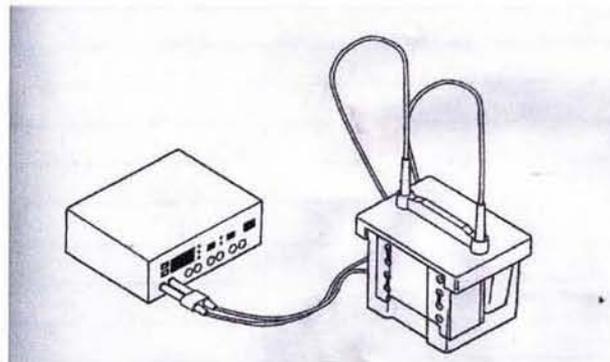


Fig31Cámara de transferencia conectada en el electrofotometro. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala



La transferencia de proteínas fue realizada por 45 min. La membrana de nitrocelulosa fue teñida por dos minutos con la solución de Pouson y es lavada con solución salina. Figuras 32 A a la D



Fig. 32 A a la D, Muestran La membrana en la tinción de Pouson y como se van tiñendo las proteínas. Tomadas en el laboratorio de Bioquímica Medica de la FES Iztacala

Después de ser teñida la membrana de nitrocelulosa se envuelve en plástico y se refrigeran.



CONCLUSIONES

Se interpretaron las técnicas para determinar cantidad de proteínas y realizar electroforesis así como transferencia de proteínas.

Por las características del seminario de titulación, en el momento de impresión de la tesina se estaban realizando los experimentos de inmunoblot (uso de anticuerpos primarios y secundarios)



BIBLIOGRAFÍA

1. M.A. Haralson and J.R. Hassell Pas. Extracellular matrix a practical approach. The practical Approach Series, 1995; pag 1-16-404.
2. www.javeriana.edu.co/Facultades/Odontologia/posgrados/acadendo/i_a_revisión08.html .
- 3.M.J. Somerman. Diferentes respuestas de sujeción de las células del ligamento periodontal y los fibroblastos gingivales, February, 1989; pag. 73-77
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, pag 861-862
- 5.Metzger Z. Diferentes efectos quimiotácticos en el cemento con la unión de proteínas en las células del ligamento periodontal. J Periodon Res 1998; 33: pag. 126-129
- 6.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, 1998; Vol40, No 9, pag 865-872.
- 7.Michael Ward and David Marcey. Fibronectin and Extracellular Adhesion Molecule; 2001
- 8.Weckman AL, Cabral Ar. Novedades moleculares y clínicas de las colágenas, Rev Investigacion Clinic 1996; 48 (3) pag 207-221



9. Alan Stevens, James S. Lowe. Histología Humana. 2da edición. Editorial Harcourt Brace, 1998; pag 49-64.
10. Iram Goldstern, John I. Gallin, Ralph Snyderman. Inflamacion basic principles and clinical. Second Edition. pag 752-753.
11. Finn Geneser. Histología sobre bases biomoleculares. 3ra Edición. Editorial Medica Panamericana , pag 1-813 197- 225.
12. Dijkgraaf L. et al. Normal cartilage structure, biochemistry and metabolism. J Oral Maxillofac Surg, 1999; 53:924-929.
13. Chenitz J. Rheumatoid arthritis and its implications in temporomandibular disorders. j of craniomandibular Practice, Enero 1992; vol1 (10); 59-69.
14. Jarvinen T, Tenascin c in the pathobiology and healing process of musculoesketal tissue injury. Sen-j-med-Sci-Sports, 2000 Dec; vol 10(6); 376-82.
15. L.lukina. Mackie. Immunohistochemical localization of the matrix glycoproteins tenascin and the ed-sequence-containing form of cellular fibronectin in human permanent teeth and periodontal ligament. J Dent res, vol 79 (1); january, 1999; 19-26.
16. Latijnhouwers.M. Tenacin-c degraation in chronic wounds is depent on serine proteinase activity. Arch-Dermatol-Res. Sep 1998; vol. 9 (290); 490-496.



17. Wallner-K, Tenascin-c is expressed in macrophage-rich human coronary atherosclerotic plaque. *Circulation*. Mar 16 1999; vol. 10 (99); 1284-9.
18. Thesleff I, Kantomaa T, Mackie E, Chiquet-Ehrismann R. Immunohistochemical localization of the matrix glycoprotein tenascin in the skull of the growing rat. *J Dent res*, May, 1999; vol 1 (79); 19-26.
19. Murphy. The adhesive activity of matricellular proteins in intermediate cell adhesion and adaptive state. *J-clin-Invest*. Apr 2001; vol 7 (107); 785-90.
20. www.encolombia.com/odontologia/foc/odonto205-regeneracion2.htm
21. www.javeriana.edu.co/Facultades/Odontologia/posgrados/acadendo/i_a_revisión08.html .
22. Marcel E. Nimmi. *Colagen. Biochemistry*; Boca Ratón Florida; Volume 1; pag. 299-179,180
23. J.F.G. Vliegthart. *Glycoproteins II, New Comprehensive Biochemistry*. El sevier ; 1997; Volume 295; pag. 652-541.
24. Peter d. Yurchenko, David e Birk, Robert p. Mecham. *Extracellular matrix assembly and structure*. New York: Ed. Academic Press, 468-190-196.
25. R. C. Hughes. *Outline studies in biology glycoproteins*. London: Ed. Capman and Hall; pag. 95-86.
26. Fermin A. Carranza, Jr Michael G. Newman. *Periodontología Clínica*. 8va edición. Editorial McGraw Hill Interamericana, pag 33-39.



27. idap.com.mx/Apuntes/Diagnostico/Periodonto(5).doc

28. PROTEIN METHODS Daniel M, Bollag, Michael D. Rozycki, Stuart J. Edelman. Second Edition Ed. Wiley –Lis 415. 68-71

29. Donald Voet, Judith Voet. BIOQUIMICA , Barcelona ;Ediciones Omega 1990; pag 745-100-105

30. Dr. Harold A. Harper. Manual de química fisiológica, Editorial Manual Moderno pag. 775-630-633

31. "<http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/page.htm>"



ANEXOS

Reactivos

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

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ citrato de sodio

Na_2CO_3

NaOH

Folin

Soluciones

Solución A 100ml

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

1g $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

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)

Solucion C 51 ml

1ml de solución A

50 ml de solución B

Solución D

10 ml. de Folin

10 ml. de agua destilada



GEL DE POLIACRILAMIDA AL 6%

Separador

Del separador se preparan 20 ml

Solución 1, solución (acrylamide mix) 4.0 ml

Solución 2 (1.5M tris con un pH de 8.8) 5.0 ml

Solución 4 (SDS al 10%), 0.2µl

H₂O 10.6 ml

Pods (APS al 10%) 0.2µl

TEMED 0.016µl

Empacador

Del empacador se preparan 4ml

H₂O 1.4ml

Solución 1 (acrylamide mix) 0.33µl

Solución 3 (1.0M tris con un pH 6.8), 0.25µl

Solución 4 (10% SDS) 0.02µl

Pods (10% APS) 0.02µl

TEMED 0.002µl.

Preparación de Proteínas

Se descongelan las muestras y se colocan en los tubos de Bacstainer de 1.5 ml o tubos para centrifuga.

Muestra de proteína 100 µl

Azul de Comassie 100 µl

Se pone a Hervir agua y las muestras se sumergen por un minuto.



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.

SDS (Sodio dodecil Sulfato) 10% 4ml.

2 Mercaptanol 1ml

Tris pH 8 μ molar 2.5 ml

Glicerol 2ml

Anforar a 10 ml con agua

1 pizca de Azul de Comassie

Solución para desteñir

(Medio Ambiente)

50% Methanol 500ml

10% Acido Acetico 100ml

Anforar hasta un litro con agua

Solución para endurecer

H₂O 100ml

10 ml de Glicina glicerol

Solo se observaran las proteínas

Buffer para Electroforesis

2 Litros de buffer

Se homogeniza y se debe obtener un pH de 8.3 Se baja el pH con ácido clorhídrico.

TRIZMA 6 gr.



Glicina 28.8 gr.

Agua bidestilada

Buffer para Transferencia

Tris 5.8 gr.

Glicina 29 gr.

SDS (sodio dodecil sulfato) 1.0 gr.

Metanol 200 ml

Anforar con agua bidestilada hasta un litro.