



UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE ODONTOLÓGIA
Departamento de Estomatología



ugr



**NIVELES DE CALCITONINA EN EL FLUIDO CREVICULAR
GINGIVAL Y EN SALIVA Y GRADO DE DISCONFORT
DURANTE LA FASE INICIAL DEL MOVIMIENTO
ORTODÓNICO EN PACIENTES JÓVENES**

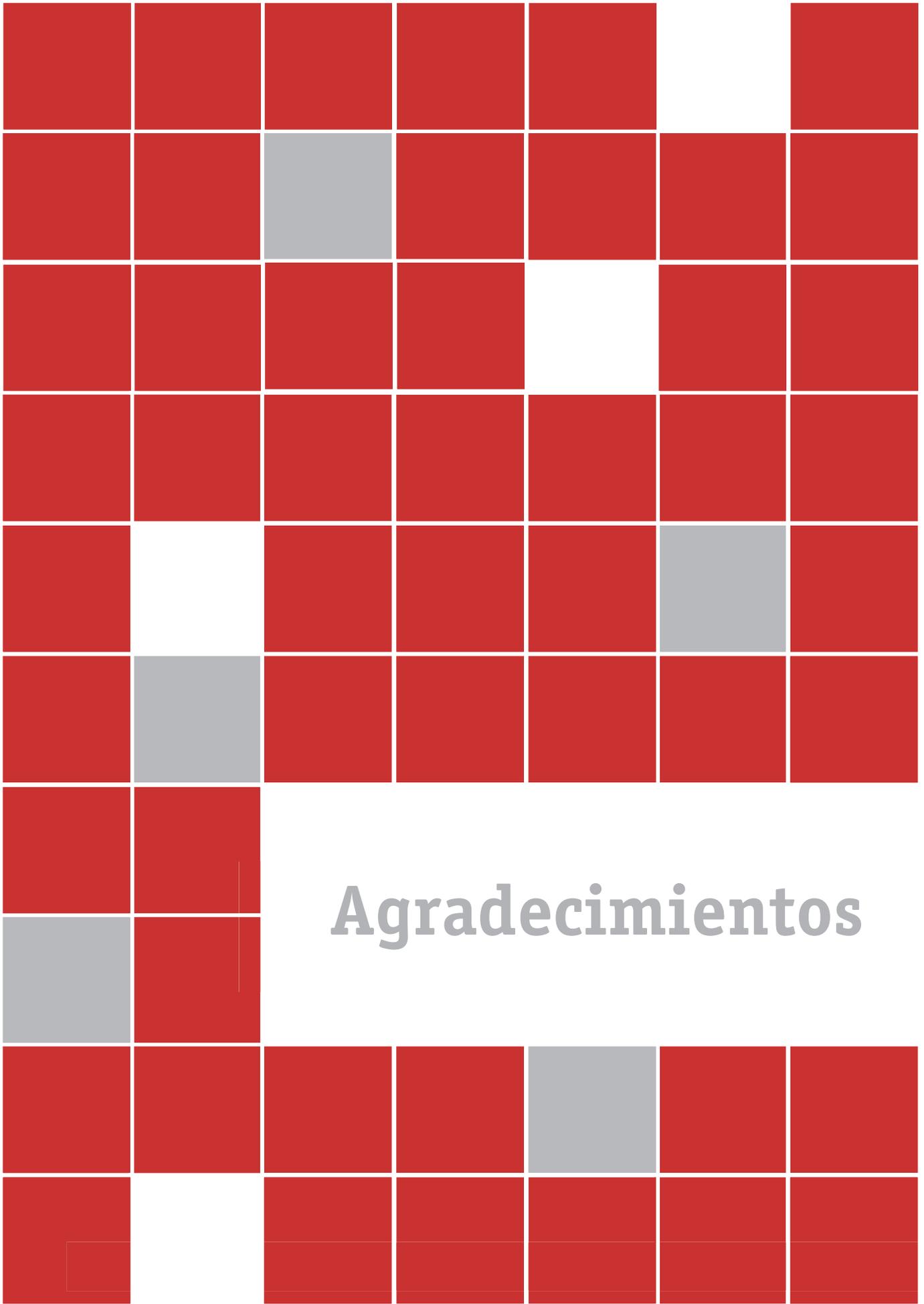
MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

DOLORES LINDE MATEOS

Bajo la dirección de los doctores
J.A. Alarcón Pérez
O. Caba Pérez
C. Martín Álvaro



Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Dolores Linde Mateos
D.L.: GR 2234-2014
ISBN: 978-84-9083-307-0



Agradecimientos



Deseo expresar mi gran agradecimiento a todas las personas que me han facilitado el camino para conseguir mis objetivos en este proyecto. En especial:

Al Dr. José Antonio Alarcón Pérez, Profesor del Departamento de Estomatología de la Facultad de Odontología de la Universidad de Granada, por su confianza en mí, y su gran dedicación y esfuerzo, sin su colaboración y apoyo no hubiera sido posible la realización de este proyecto.

Al Dr. Octavio Caba Pérez, Profesor del Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad de Jaén, por ofrecerme sus conocimientos y guiarme en el proceso del laboratorio.

A la Dra. Conchita Martín, Profesora del Departamento de Estomatología IV de la Facultad de Odontología de la Universidad Complutense de Madrid, por su gran ayuda realizando los análisis estadísticos y la interpretación de los resultados.

A Alba Carrillo Navas, una gran compañera que me ha demostrado su compañerismo y entusiasmo por la ortodoncia, y contar con su colaboración ha sido muy gratificante.

A mis padres, a los cuales les debo todo lo que soy, y por lo tanto este trabajo. Ellos me han inculcado que con esfuerzo, dedicación y sacrificio podemos conseguir nuestras metas en la vida. Mis éxitos reflejan el esfuerzo que cada día ellos hacen por mí.

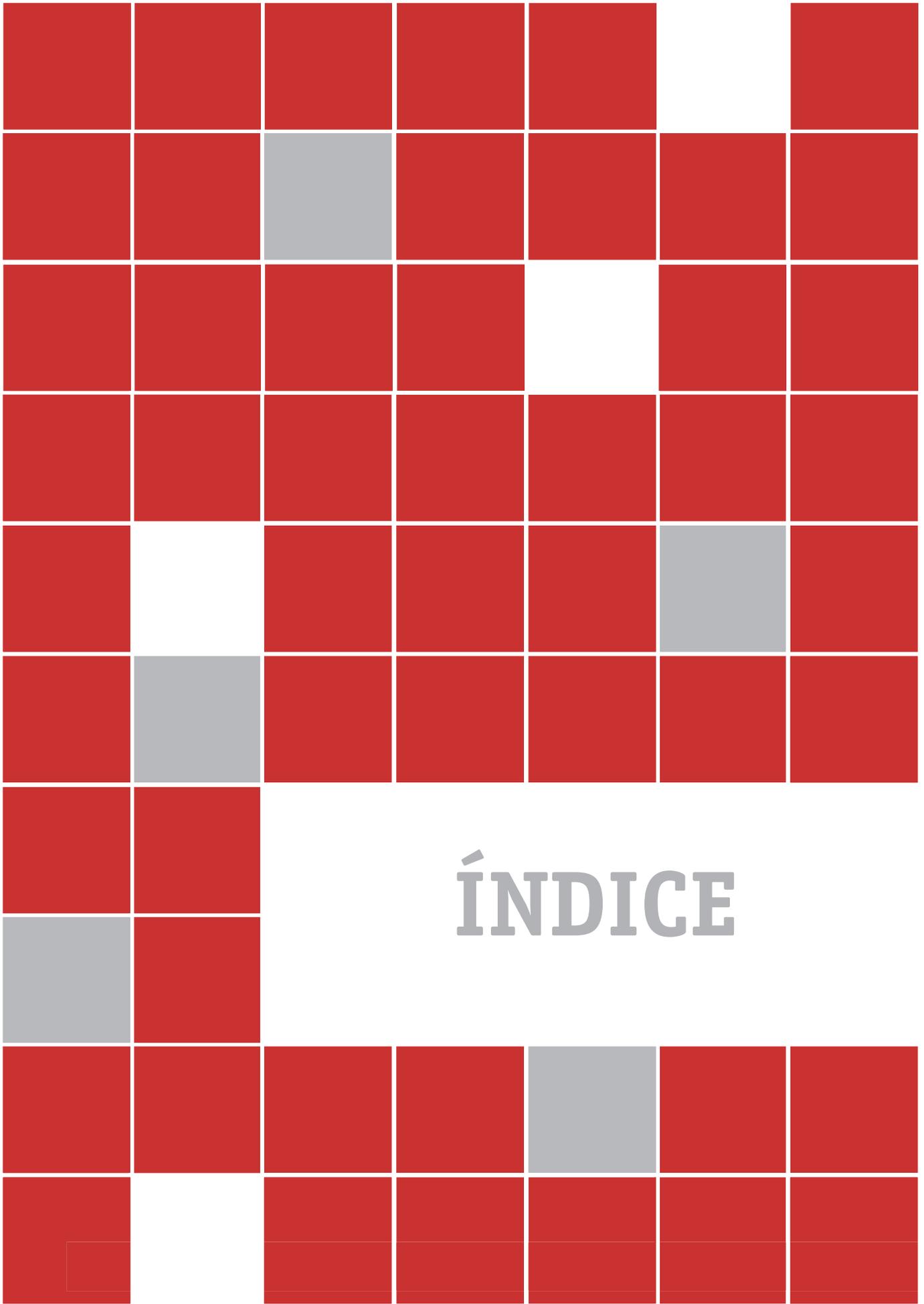
A mis hermanos, por su apoyo incondicional y su gran ayuda a lo largo de todo este camino, y sobre todo por estar conmigo siempre que los necesito.

Agradecimientos



A mi marido, que siempre me ha apoyado, me ha ayudado en todo, y ha aguantado los momentos más duros de este proyecto. Su amor y comprensión han sido esenciales.

A mis amigas y amigos, por su compañerismo, su ayuda y su capacidad de levantarme el ánimo siempre que lo necesito. Desde el momento que los conocí han estado siempre conmigo, como una gran familia.



ÍNDICE



I. INTRODUCCIÓN	1
I.1. Tejido óseo	3
I.1.1. Formación del tejido óseo	4
I.1.2. Remodelación del tejido óseo	4
I.1.3. Osteoclastos	6
I.1.3.1. Origen	6
I.1.3.2. Función	7
I.2. Remodelación ósea provocada por fuerzas ortodóncicas	8
I.2.1. Fundamento de los movimientos ortodóncicos	8
I.2.2. Origen de los osteoclastos en el movimiento dental	10
I.2.3. Mediadores bioquímicos del movimiento dentario	10
I.2.4. Fuerzas excesivas en ortodoncia	11
I.3. Fluido crevicular	13
I.3.1. Concepto de fluido crevicular	13
I.3.2. Composición de fluido crevicular	14
I.3.3. Cambios en el fluido crevicular relacionados con el movimiento ortodóncico	15
I.4. Saliva	15
I.4.1. Concepto de saliva	15
I.4.2. Composición de saliva	16
I.4.3. Aplicaciones clínicas de saliva	17
I.5. Calcitonina	18
I.5.1. Concepto de calcitonina	18
I.5.2. Glándula tiroides	19
I.5.3. Función de calcitonina	20
I.5.3.1. Función antireabsortiva	20
I.5.3.2. Función analgésica	21
I.5.4. Aplicaciones clínicas de calcitonina	22
I.6. Dolor relacionado con el movimiento dental ortodóncico	23
I.6.1. Etiología del dolor	23
I.6.2. Intensidad del dolor	23
II. JUSTIFICACIÓN	25
III. OBJETIVOS	29



IV.MATERIAL Y MÉTODO	33
IV.1. ESTUDIO CLÍNICO 1	35
IV.1.1. Selección de la población de estudio	35
IV.1.2. Diseño del estudio	36
IV.1.2.1. Movimiento ortodóncico	36
IV.1.2.2. Visitas	37
IV.1.2.3. Parámetros clínicos	38
IV.1.3. Recogida del fluido crevicular gingival	38
IV.1.4. Evaluación del disconfort o dolor	39
IV.1.5. Análisis de Western-Blot	39
IV.1.5.1. Preparación de las muestras	39
IV.1.5.2. Electroforesis	40
IV.1.5.3. Transferencia	43
IV.1.5.4. Bloqueo	44
IV.1.5.5. Incubación	44
IV.1.5.5.1. Anticuerpo primario	44
IV.1.5.5.2. Anticuerpo secundario	45
IV.1.5.6. Detección	45
IV.1.6. Análisis densitométrico	46
IV.1.7. Análisis estadístico	47
IV.1.7.1. Estadística descriptiva	47
IV.1.7.2. Estadística analítica	47
IV.2. ESTUDIO CLÍNICO 2-ESTUDIO PILOTO	48
IV.2.1. Selección de la población de estudio	48
IV.2.2. Diseño del estudio	50
IV.2.2.1. Visitas	50
IV.2.2.2. Parámetros clínicos	50
IV.2.3. Recogida de la saliva	50
IV.2.4. Análisis de Western-Blot	51
IV.2.4.1. Preparación de las muestras	51
IV.2.4.2. Electroforesis, transferencia, bloqueo, incubación, detección y análisis densitométrico	53



IV.2.5. Análisis estadístico	53
IV.2.5.1. Estadística descriptiva	53
IV.2.5.2. Estadística analítica	53
V. RESULTADOS	55
V.1. Resultados del estudio 1	57
V.1.1. Cambios en los niveles de calcitonina en el fluido crevicular gingival	57
V.1.2. Evaluación del disconfort o dolor	59
V.1.3. Índices de Gingivitis, Placa y Sangrado	60
V.2. Resultados del estudio 2-estudio piloto	62
V.2.1. Cambios en los niveles de calcitonina en saliva	62
V.2.2. Índices de Gingivitis, Placa y Sangrado	64
VI. DISCUSIÓN	67
VI.1. Discusión del estudio 1	69
VI.1.1. Discusión de la técnica: Western-Blot	69
VI.1.2. Relación entre niveles de calcitonina y movimiento dental ortodóncico	70
VI.1.3. Relación entre los niveles de calcitonina en el fluido crevicular y la intensidad de dolor percibida	74
VI.2. Discusión del estudio 2-estudio piloto	76
VII. CONCLUSIONES	81
VIII. BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXO 1	95
ANEXO 2	99



Capítulo 1

INTRODUCCIÓN



Durante el movimiento dental ortodóncico se produce un proceso de remodelación ósea, en el cuál intervienen una serie de factores bioquímicos relacionados algunos con la reabsorción ósea (ej. IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , sustancia P, ó NTx) y otros con la formación ósea (ej. osteocalcitona y leptina), los cuales pueden ser encontrados en el fluido crevicular gingival (Ren and Vissink, 2008).

La calcitonina interviene activamente en el metabolismo óseo y es secretada bajo condiciones de incremento de la reabsorción ósea, (Paula and Rosen, 2010) por lo tanto el estudio de los niveles de la calcitonina en el fluido crevicular y en la saliva podría darnos una información valiosa acerca del proceso de remodelación ósea que tiene lugar durante el movimiento dental ortodóncico.

I.1 TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo es un tejido dinámico, formado aproximadamente por el 10% de células, 60% de cristales minerales (hidroxiapatita cristalina) y el 30% de matriz orgánica. La matriz orgánica incluye sobre todo colágeno tipo I (88%); otras proteínas representando el 10% y lípidos y glucosaminoglicanos representando el 1-2%.

Principalmente existen dos tipos de hueso: El hueso cortical que proporciona una función mecánica y de protección y el hueso trabecular que provee fuerza, y aún más importante, otorga la mayoría de las funciones metabólicas. Es un tejido conectivo peculiar, formado por células y una matriz extracelular que, a diferencia con otros tejidos, se mineraliza (Del Fattore et al., 2012).

El hueso tiene tres funciones vitales: proporcionar soporte y sitios de unión para los músculos, proteger a órganos vitales tanto a la médula ósea como al cerebro y actuar como un órgano metabólico con grandes reservas de calcio y fosfato (Feng and McDonald, 2011).

Las funciones del hueso se llevan a cabo por tres tipos de células principales:

- Osteoblastos: células de origen mesenquimal que tienen funciones osteogénicas.
- Osteoclastos: células gigantes multinucleadas que surgen de la línea de monocitos y macrófagos, dedicados a reabsorber el hueso.
- Osteocitos: surgen de los osteoblastos maduros que, una vez depositada la matriz ósea, permanecen atrapados en ella, convirtiéndose en células en reposo (Del Fattore et al., 2012).

I.1.1. Formación del tejido óseo

En los adultos humanos, la formación ósea ocurre generalmente por remodelación. La remodelación ósea es un proceso fisiológico en el cuál el hueso viejo o dañado es eliminado por los osteoclastos y entonces reemplazado por un hueso nuevo formado por los osteoblastos. La reabsorción ósea y la aposición ósea no se producen a lo largo de la superficie del hueso de forma aleatoria, por el contrario, se producen en determinados sitios anatómicos y sigue una secuencia de acontecimientos bien definida, que se conoce como el ciclo de remodelado (Tang et al., 2009).

I.1.2. Remodelación del tejido óseo

La remodelación ósea requiere la acción coordinada de cuatro tipos principales de células óseas: células de revestimiento óseo, osteocitos, osteoclastos y osteoblastos. En un estado de reposo, la superficie ósea está cubierta por una monocapa de células de revestimiento óseo, las cuales pertenecen a la línea osteoblástica. Los osteocitos son las células óseas más abundantes; ellos también se diferencian de los osteoblastos. Los osteoclastos, las únicas células de reabsorción ósea, son células gigantes multinucleadas que se diferencian de células mononucleadas de la línea de los



monocitos/macrófagos. Los osteoblastos, células formadoras de hueso, son derivados de células madre mesenquimales (Feng and McDonald, 2011).

Los procesos de remodelación ósea implican 4 grandes fases distintas pero que se superponen (Fig. I.1):

- Fase 1: iniciación/activación de la remodelación ósea en un sitio específico.
- Fase 2: reabsorción ósea y reclutamiento simultáneo de células madre mesenquimales y osteoprogenitores.
- Fase 3: diferenciación osteoblástica y síntesis de osteoide.
- Fase 4: mineralización de osteoide y terminación de la remodelación ósea.

Los osteocitos tienen varias características que los hacen los principales candidatos para ser los elementos mecanorreceptores en el hueso. Ellos están localizados en el fondo del tejido óseo y tienen procesos celulares que son conformados para la fácil detección de deformaciones del sustrato; los procesos celulares de los osteocitos están bañados de un líquido pericanalicular que está en un espacio reducido y por lo tanto es susceptible a cambios ligeros en el flujo provocado por las perturbaciones mecánicas; y los procesos de los osteocitos están conectados el uno al otro y a los osteoblastos a través de uniones de baja resistencia que facilitan la transmisión de señales por todo el tejido (Wise and King, 2008).

Las hormonas calciotropas son los reguladores fisiológicos más importantes de la homeostasis del calcio por la acción directa en osteoblastos y osteoclastos.

Actualmente existen evidencias que muestran que tanto la calcitonina como la paratohormona poseen efectos anabólicos y catabólicos potenciales en el hueso y se han reconocido varios mecanismos moleculares y celulares involucrados en este proceso (de Paula and Rosen, 2010).

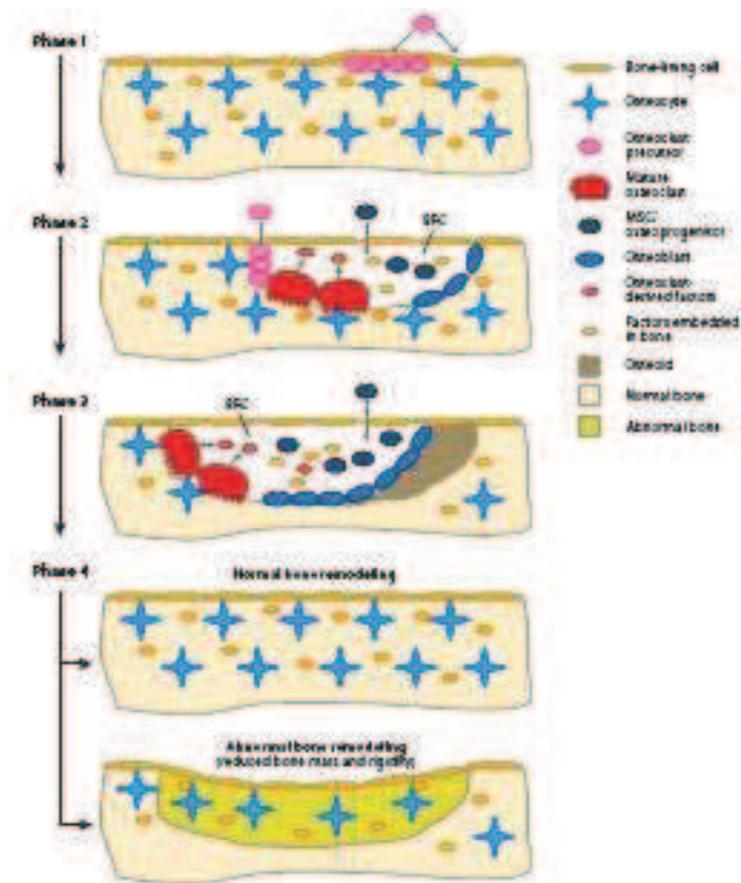


Figura I. 1. Proceso de remodelación ósea

I.1.3. Osteoclastos

Los osteoclastos tienen un papel muy importante en el proceso de remodelación ósea, ya que son las únicas células responsables de la reabsorción ósea.

I.1.3.1. Origen

Los osteoclastos derivan de la línea mieloide hematopoyética. La diferenciación de los osteoclastos implica varios pasos importantes: células madre hematopoyéticas dan lugar a unidades formadoras de colonias de



granulocitos/macrófagos, las cuales además se diferencian en células de la línea de monocitos/ macrófagos en la médula ósea. Las células mononucleadas de la línea de monocitos/macrófagos en la médula ósea o en la circulación son generalmente consideradas por ser precursoras de los osteoclastos, las cuales son atraídas a los posibles sitios de reabsorción y entonces se unen a la matriz ósea para diferenciarse en osteoclastos en respuesta al factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos (M-CSF) y al receptor activador del ligando NF- κ B (RANKL) (Feng and McDonald, 2011).

La diferenciación de los osteoclastos procedentes de precursores hematopoyéticos es en respuesta a la estimulación por RANKL. Además se han identificado otros requerimientos para la formación y activación de los osteoclastos en la reabsorción ósea. Para que los osteoclastos maduros reabsorban hueso, las señales de activación deberían estar presentes (Holliday et al., 2009).

1.1.3.2. Función

Los osteoclastos son células multinucleadas responsables de la reabsorción del hueso. Estas células han desarrollado un mecanismo eficaz para disolver la hidroxiapatita cristalina y degradar la matriz ósea orgánica rica en fibras de colágeno. Al iniciar la reabsorción ósea, los osteoclastos se polarizan y aparecen tres dominios de membrana distintos: un borde de volantes, una zona de sellado y un dominio de secreción funcional (Fig.I.2). Simultáneamente, el citoesqueleto se somete a una profunda reorganización. Durante este proceso, el citoesqueleto de actina forma un anillo de unión en la zona de sellado, el dominio de la membrana que une la célula de reabsorción a la matriz ósea (Holliday et al., 2009; Vaananen et al., 2000).

Cada osteoclasto posee varios millones de receptores para la calcitonina, un inhibidor hormonal potente de la reabsorción ósea, que inhibe la actividad de los osteoclastos (Martin and Udagawa, 1998).

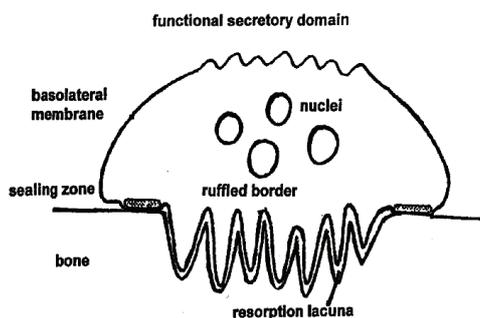


Figura I. 2. Osteoclasto

I.2. REMODELACIÓN ÓSEA PROVOCADA POR FUERZAS ORTODÓNCICAS

La ortodoncia implica una interacción continua entre la mecánica (sistema de fuerzas de ortodoncia) y la biología (respuestas del tejido a las fuerzas de ortodoncia).

Los principales objetivos de la ortodoncia son mejorar y normalizar la forma y función orofacial. En casi todos los casos, estos objetivos se consiguen, al menos en parte, por movimiento de los dientes por medio de fuerzas mecánicas sobre los dientes y/o maxilares. Estas fuerzas inician, promueven y mantienen una amplia remodelación de los tejidos dentales y paradentales, lo que facilita el movimiento de los dientes a las nuevas posiciones (Davidovitch and Krishnan, 2008).

I.2.1. Fundamento de los movimientos ortodóncicos

El movimiento dental ortodóncico ocurre por reabsorción ósea en el sitio de compresión del ligamento periodontal, por formación ósea en el sitio de tensión, y por remodelación del propio ligamento periodontal (Xie



et al., 2008) (Fig. I. 3). La velocidad de movimiento dental depende de la velocidad de reabsorción ósea (Iwasaki et al., 2009).

La remodelación ósea inducida ortodóncicamente depende de la conversión de las fuerzas ortodóncicas en señales intracelulares por las células mecanorreceptoras. Esta información debería ser comunicada a otras células no mecanorreceptoras para producir una respuesta coordinada de reabsorción y aposición ósea alveolar (Uribe et al., 2011). Investigaciones recientes llevan a la hipótesis de que existen mediadores inflamatorios que son liberados tras producirse estímulos mecánicos, activando los procesos biológicos asociados con reabsorción y aposición ósea alveolar (Yamaguchi, 2009).

La primera fase del movimiento dental ortodóncico implica una respuesta inflamatoria aguda (Dilsiz et al., 2010; Sari et al., 2009). Esta fase se caracteriza por vasodilatación periodontal y migración de leucocitos fuera de los capilares del ligamento periodontal. Los primeros eventos reconocidos y descritos fueron una serie de cambios vasculares y celulares, además de un gran número de mediadores inflamatorios, factores de crecimiento y neuropéptidos en los tejidos de soporte periodontal. El incremento de sus niveles durante el movimiento dental ortodóncico ha permitido la suposición de que interacciones entre células productoras de esas sustancias, así como células del sistema nervioso, inmune y endocrino, regulan las respuestas biológicas seguidas a la aplicación de fuerzas ortodóncicas (Yamaguchi, 2009).

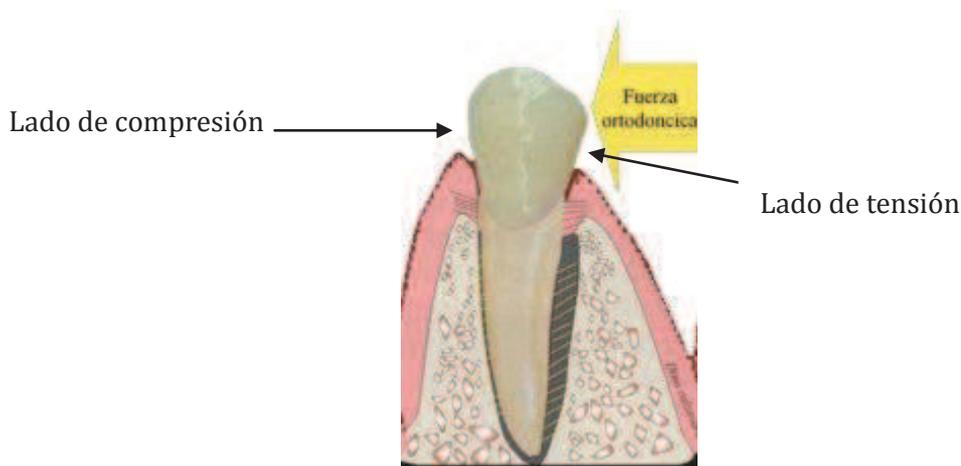


Fig. I. 3. Movimiento dental ortodóncico

I.2.2. Origen de los osteoclastos en el movimiento dental ortodóncico

La osteoclastogénesis en el movimiento dental ortodóncico es iniciada por dos cambios relacionados con la aplicación de la fuerza: el daño del tejido, con la subsecuente producción de un proceso inflamatorio en el ligamento periodontal y la deformación del proceso alveolar. Los osteoclastos y las células progenitoras de los osteoclastos aparecen en sitios de compresión después de que las fuerzas sean aplicadas. La inducción de los osteoclastos, representada por pre-osteoclastos mononucleares, primero ocurre en los espacios vasculares y medulares de la cresta alveolar, seguido de incrementos en el espacio del ligamento periodontal (Wise and King, 2008).

I.2.3. Mediadores bioquímicos del movimiento dentario

A lo largo de la historia, mediante el uso de técnicas microscópicas se ha averiguado qué elementos influyen en el mecanismo de remodelación que acompaña al movimiento dentario.

Actualmente, mediante el uso de técnicas más sofisticadas como la inmunohistoquímica, el inmunoensayo y la microscopía electrónica, puede



avanzarse más allá en el complejo proceso del movimiento dentario, esclareciéndose cómo la fuerza que aplicamos se transforma en un proceso orgánico y cómo se comunican entre sí las células que intervienen en dicho proceso de remodelación. Estos procesos, aún hoy día no son enteramente comprendidos. El proceso es muy complejo e influyen en él multitud de factores bioquímicos (Tabla I.1).

HORMONAS	Polipéptidos Hormona paratiroideas Calcitonina Insulina Hormona del crecimiento Corticoesteroides 1,25, dihidroxi Vitamina D3 Glucocorticoides Hormonas sexuales
FACTORES DE CRECIMIENTO	Factor de crecimiento “insulin-like” I y II Factor de crecimiento Beta Factor de proliferación de fibroblastos Factor de crecimiento derivado de las plaquetas Factores de crecimiento del tejido conectivo
CITOQUINAS	Interleucina 1 Interleucina 6 Interleucina 11 Factor de necrosis tumoral Factor de diferenciación osteoclástico Interleucina 4 Interleucina 13 Interleucina 18 Interferón gamma Osteoprotegerina
FACTORES ESTIMULADORES DE COLONIAS	M-CSF G-CSF GM-CSF
OTROS	Leucotrienos Óxido nítrico

Tabla I. 1. Factores bioquímicos



I.2.4. Fuerzas excesivas en ortodoncia

En la mayoría de los casos, el resultado del tratamiento de ortodoncia es predecible, siempre que los sistemas de fuerzas aplicados sean mecánicamente correctos y las raíces de los dientes se muevan dentro de las limitaciones de sus tejidos circundantes. Sin embargo, es complicado garantizar un resultado exitoso, en el cuál no aparezcan efectos adversos cuando estos criterios no sean aplicados.

Para evitar la aparición de efectos adversos en ortodoncia, el ortodoncista debe poseer un conocimiento excelente, complejo y actual en la mecánica, fisiología y biología de los movimientos ortodóncicos (Davidovitch and Krishnan, 2008).

Hay una fuerza ideal que mueve cada tipo de diente a una velocidad óptima, debido a las diferencias en la superficie de la raíz. Diversas variables, como magnitud, dirección, distribución y duración de la fuerza, tensión y cambios biológicos en el ligamento periodontal deberían ser considerados para obtener movimientos dentales óptimos.

El movimiento dental inicial debería efectuarse con fuerzas ligeras. Fuerzas elevadas tienden a incrementar la cantidad y la velocidad del movimiento, pero se producen efectos secundarios clínicos indeseables como reabsorción de la raíz. Fuerzas ligeras producen mejores movimientos dentales (en términos de control biológico y ventaja mecánica) y menos reabsorción de la raíz que fuerzas elevadas (Yee et al., 2009).

La reabsorción de la raíz es una complicación común asociada al tratamiento de ortodoncia. Este efecto secundario indeseable ha sido descrito como el resultado de un proceso inflamatorio complejo que envuelve varios componentes dispares incluyendo las fuerzas mecánicas, los



tejidos óseos y de la raíz del diente, las células de alrededor de la matriz y determinados mensajeros biológicos.

La aplicación de fuerzas ortodóncicas induce un proceso local que incluye todas las características de la inflamación (rojez, calor, hinchazón, dolor y función alterada). El proceso inflamatorio, una característica esencial del movimiento dental, es actualmente el componente fundamental responsable del proceso de reabsorción de la raíz. Este proceso de reabsorción requiere interacciones específicas entre varias células inflamatorias y tejidos duros, como el hueso, el cemento o la dentina y es un proceso de múltiples pasos. La investigación de los factores de riesgo asociados con el desarrollo de la reabsorción de la raíz durante el tratamiento ortodóncico sugiere que la susceptibilidad individual, factores sistémicos y genéticos pueden ser moduladores significativos de este proceso (Yamaguchi, 2009).

La presencia de reabsorción de la raíz antes de comenzar el tratamiento es normalmente considerado un factor predisponente fuerte para presentar reabsorción de la raíz durante el tratamiento (George and Evans., 2009). La reabsorción de la raíz tiene una importancia clínica limitada para el paciente promedio. Sin embargo, para el paciente susceptible, la reabsorción de la raíz quizás limita los resultados de un tratamiento ortodóncico exitoso (Kereshanan et al., 2008).

I.3. FLUIDO CREVICULAR

I.3.1. Concepto de fluido crevicular

El fluido crevicular es el trasudado inflamatorio que fluye por el surco gingival (Kereshanan et al., 2008). Ejerce un efecto de limpieza y protección de la unión dentogingival. Este fluido pasa desde el tejido conectivo al surco gingival a través del epitelio de unión.

El surco gingival se define como el espacio formado por la parte interna de la encía marginal y la superficie del diente. Este surco posee una pared externa (epitelio del surco), una pared interna (superficie dental) y un fondo o vértice (epitelio de unión) (Fig. I.4).

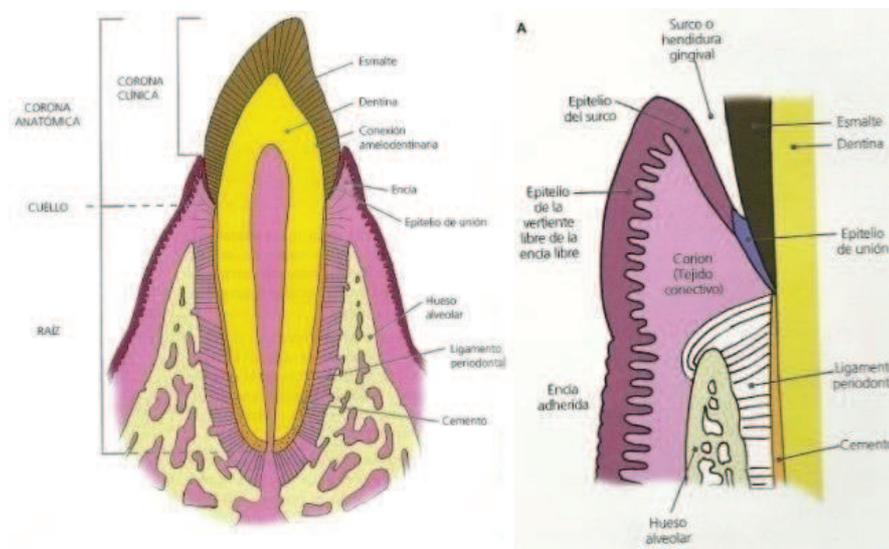


Fig. I. 4. Surco gingival del diente

I.3.2. Composición de fluido crevicular

La composición del fluido crevicular varía de acuerdo a las condiciones del tejido periodontal. El suero es la principal fuente del componente acuoso del fluido crevicular (Yamaguchi, 2009).

El fluido crevicular es conocido por contener una serie de factores celulares y bioquímicos que reflejan el estado del periodonto subyacente (Kereshanan et al., 2008). Comprende enzimas, subproductos metabólicos, proteínas del suero y otras sustancias relacionadas con el metabolismo del hueso alveolar. Los niveles de fluido crevicular pueden representar las condiciones biológicas del hueso (Rhee et al., 2009).



I.3.3. Cambios en el fluido crevicular relacionados con el movimiento ortodóncico

La aplicación de fuerzas mecánicas desplaza el diente e induce una reacción inflamatoria por la compresión del ligamento periodontal. Como resultado se producen una amplia variedad de sustancias dentro del espacio periodontal que se difunden al fluido crevicular (Giannopoulou et al., 2006).

Las fuerzas ortodóncicas pueden tener un efecto inmediato en los vasos sanguíneos resultando en un flujo aumentado del fluido crevicular (Dudic et al., 2006).

Varios estudios demostraron que el volumen del fluido crevicular gingival se incrementa durante el tratamiento ortodóncico y que éste no es sólo en relación a los niveles de placa bacteriana, inflamación gingival, o profundidad de sondaje, sino también a la cantidad de movimiento dental. Cambios en el flujo de la sangre durante el movimiento ortodóncico pueden provocar cambios locales en la temperatura del tejido gingival (Aznan et al., 2007).

I.4. SALIVA

I.4.1. Concepto de saliva

La saliva es un fluido con múltiples funciones relacionadas con la salud y homeostasis oral, con un papel muy activo en el mantenimiento de la salud oral. Entre estas funciones se encuentran (Chiappin et al., 2007):

- Ayudar a la formación del bolo alimenticio, humedeciéndolo.
- Proteger la mucosa frente a un daño de origen mecánico.
- Iniciar la digestión gracias a la presencia de la alfa amilasa y otras enzimas.
- Ayudar en la percepción gustativa.



- Amortiguar los componentes ácidos de las comidas con los bicarbonatos.
- Función defensiva contra los microorganismos patógenos, en presencia de proteínas defensivas que reaccionan de manera específica o inespecífica, inhibiendo el crecimiento de microorganismos.

Contiene algunas moléculas encontradas en el sistema circulatorio, lo que la convierte en un medio muy interesante para el diagnóstico de algunas enfermedades sistémicas (Miller et al., 2010).

Aunque el seguimiento clínico y radiográfico son la base para la evaluación de los pacientes ortodóncicos, el análisis de saliva, un fluido que contiene marcadores locales y sistémicos, pueden ofrecer la base para una detección específica de las fases del movimiento ortodóncico.

I.4.2. Composición de saliva

La saliva es un fluido hipotónico compuesto por una alta proporción de agua, electrolitos y moléculas orgánicas (aminoácidos, proteínas y lípidos). Los componentes acuosos derivan en gran parte desde el lecho de capilares locales mediante difusión intracelular, canales acuosos de aquaporinas y rutas extracelulares. Algunas moléculas neutras que proceden del suero entran por difusión pasiva desde el denso lecho de capilares circundantes y bañan las glándulas salivares. Los electrolitos introducen la saliva mediante una vía de gradiente osmótico y son reguladas por la tasa de secreción natural de estímulos y nivel de mineralocorticoides en la circulación. Los componentes orgánicos de la saliva procedentes de las glándulas salivares son derivados en gran parte de la síntesis de proteínas y se almacenan en forma de gránulos dentro de la acinares.

Hay tres glándulas salivares mayores (parótida, submandibular y sublingual) que introducen la saliva en la cavidad oral. La saliva producida por estas glándulas proporciona mezclas de fluido seroso y mucoso, que es importante para la detección de una patología glandular específica. Toda la



saliva, por el contrario, está compuesta por una mezcla de fluidos orales de las glándulas salivares mayores (65%) submandibular, (23%) parótida, (4%) sublingual, de las glándulas salivares menores (8%), y constituyentes de origen no salivar, incluido fluido crevicular, suero transudado de la mucosa y lugares de inflamación, células epiteliales e inmunes, restos de alimentos y algunos microbios (Miller et al., 2010).

El estudio del factor TNF- α en saliva, en relación con el hueso, demuestra que supone una ayuda para la identificación de personas con problemas periodontales. Éstos datos, junto con otros datos de estudios previos, señalan que la combinación de niveles elevados del panel de biomarcadores salivares (β -glucosonidasa, CRP, IL-1 β , MMP-8, TNF- α , y la posibilidad de OPG y ICTP) ofrece una sensibilidad y especificidad para el screening de problemas periodontales. Ésto corresponde a una interesante área de investigación, aunque hace falta más evidencia para identificar los biomarcadores con la combinación más favorable de sensibilidad, especificidad, valores positivos y negativos.

I.4.3. Aplicaciones clínicas de saliva

La saliva es frecuentemente estudiada porque el método de recogida es fácil, no invasivo, rápido y además no es necesario un equipo especializado (Florez-Moreno et al., 2012).

La saliva es considerada para algunos autores un *“espejo de nuestro cuerpo”* (Lee et al., 2009); se podría utilizar para controlar el estado de salud y de enfermedad, como una importante meta para la prevención y promoción de la salud.

Recientemente ha habido una creciente apreciación de la saliva como elemento que puede reflejar virtualmente el estado de salud y de enfermedad general. Esto incluye niveles tisulares de sustancias naturales y una amplia variedad de moléculas introducidas por terapéutica,



dependencia, o propósitos recreativos, estado emocional, estado hormonal, estado inmunológico, efectos neurológicos e influencia nutritiva y metabólica.

Prácticamente todo lo que podemos medir en suero, puede medirse en saliva. La saliva ha sido usada como un método seguro para la detección de VIH, Hepatitis A, B y C, drogas como la marihuana, cocaína y alcohol. Son muchas las ventajas sobre el suero sanguíneo: es fácil de tomar, almacenar y enviar, puede obtenerse por un coste reducido y en suficiente cantidad para los análisis. Para los pacientes, este método no invasivo, reduce dramáticamente la ansiedad y el malestar, así pues, simplifica el procedimiento para la toma repetida de muestras en un estudio longitudinal durante el tiempo de duración del mismo (Lee et al., 2009).

I.5. CALCITONINA

I.5.1. Concepto de calcitonina

La calcitonina fue descrita por primera vez en 1961 por Copp y Cameron quienes sugirieron que era una hormona hipocalcémica. Su estructura química fue establecida en 1968 por Neher (Paula and Rosen, 2010).

La calcitonina es un péptido de 32 aminoácidos implicado en diversos procesos fisiológicos. La calcitonina endógena es secretada principalmente por las células C del tiroides en respuesta a niveles de calcio elevados en el suero. El receptor de la calcitonina es un receptor de superficie celular unido a la proteína G que es expresado a altos niveles por los osteoclastos, las células neuronales y renales (Turner et al., 2011).



I.5.2. Glándula tiroides

La glándula tiroides está situada en la parte frontal del cuello, debajo de la laringe. La glándula es pequeña y está formada por dos lóbulos, uno a cada lado de la tráquea, conectados por un tejido llamado istmo.

La glándula tiroides juega un papel importante en la regulación del metabolismo del cuerpo y el equilibrio del calcio. Contiene dos poblaciones diferentes de células endocrinas: Las células foliculares, las células endocrinas más abundantes en la glándula y responsables de secretar triyodotironina (T3) y tiroxina (T4), que son las hormonas que controlan el metabolismo basal; y las células C, o células parafoliculares, que son muy escasas y conocidas sobre todo por la producción de calcitonina, hormona hipocalcémica e hipofosfatémica (Martin-Lacave et al., 2009). Los dos tipos de células tienen diferente origen embrionario, las células foliculares proceden del endodermo y las células C de la cresta neural.

La secreción de las hormonas tiroideas por las células foliculares es principalmente regulada por la hormona estimulante del tiroides (TSH) de la glándula pituitaria, la cual en cambio es controlada por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) de origen hipotalámico. A pesar de su regulación principalmente extratiroidal, la función y desarrollo del tiroides está bajo la influencia de péptidos intratiroides. En concreto, además de su función relacionada con la calcitonina, las células C producen y secretan una serie de diferentes péptidos reguladores, algunos de los cuales parecen estar involucrados como estimuladores locales de la función del tiroides (serotonina, péptido liberador de gastrina ó GRP), mientras que otros son inhibidores (somatostatina, TRH, gen del péptido relacionado con la calcitonina ó CGRP). Para cualquiera de los péptidos, el requisito para ejercer una regulación paracrina efectiva en las células foliculares es la presencia de sus receptores específicos en esta población de células. Se ha descrito la existencia de algunos de estos receptores en las células



foliculares, como la serotonina o los receptores de somatostatina (Morillo-Bernal et al., 2009).

En resumen, las células C no se dedican exclusivamente a la regulación del calcio independientemente de la actividad de las células foliculares, por el contrario, estas células interactúan con las células foliculares circundantes, lo que permite funciones de coordinación más eficaces entre las dos poblaciones endocrinas (Martin-Lacave et al., 2009).

I.5.3. Función de calcitonina

I.5.3.1. Función antireabsortiva

Las principales acciones reconocidas de la calcitonina en la homeostasis del calcio son inhibir la reabsorción ósea, disminuir la reabsorción tubular del calcio y regular la producción de 1,25-dihidroxitamina D₃ en el riñón (Paula and Rosen, 2010; Qin and Yang, 2008; Turner et al., 2011).

Los receptores de la calcitonina son más fuertemente expresados en osteoclastos maduros, por lo tanto el papel primario de la calcitonina es inhibir la actividad de reabsorción ósea de los osteoclastos. La calcitonina inhibe la motilidad, la formación de anillos de actina y los mecanismos de reabsorción ósea de los osteoclastos (Qin and Yang, 2008; Qin et al., 2009).

La calcitonina parece proteger a los osteoclastos de la apoptosis inducida por fármacos. Lo más probable es que ésto se deba a la rápida desorganización del citoesqueleto de actina por la calcitonina, ya que un citoesqueleto intacto parece ser un requisito necesario para la inducción de la muerte celular programada (Qin and Yang, 2008; Qin et al., 2009).

El hueso es un tejido complejo cuya función principal es resistir los esfuerzos mecánicos y las fracturas. La resistencia ósea depende no solo de



la cantidad de tejido óseo, sino también de la calidad, que se caracteriza por la geometría y la forma de los huesos, la microarquitectura del hueso trabecular, la remodelación, la mineralización y el colágeno. La calcitonina conduce a un aumento de la densidad mineral ósea y de la resistencia ósea (Ezzat, 2010).

1.5.3.2. Función analgésica

La calcitonina posee un efecto analgésico, que ha sido documentado como un alivio del dolor óseo (Karsdal et al., 2008b; Ofluoglu et al., 2007). Aunque el mecanismo por el cual produce el efecto analgésico todavía no es bien conocido, hay varias hipótesis que describen el mecanismo analgésico de la calcitonina.

La hipótesis más antigua es que inhibe la síntesis de prostaglandina E₂ (PGE₂) y de tromboxano como resultado de la actividad antiinflamatoria (Ofluoglu et al., 2007; Qin et al., 2009). Aunque la mayoría de los investigadores creen que el efecto analgésico se debe a una estimulación de la liberación de β-endorfinas al plasma, que reducen el dolor óseo durante un periodo corto de tiempo (Knopp-Sihota et al., 2012; Ofluoglu et al., 2007; Qin et al., 2009).

Otra hipótesis importante indica una acción directa de la calcitonina a nivel del sistema nervioso central (Karsdal et al., 2008b; Knopp-Sihota et al., 2012; Visser and Kwei, 2006) . En neuronas nociceptivas, la transmisión de la señal por estímulos nocivos en el botón presináptico depende principalmente de la apertura de los canales de calcio voltaje dependientes, que al abrirse y entrar calcio permiten la activación de enzimas, las cuales están vinculadas a la liberación de neurotransmisores. La aplicación de la calcitonina reduce las corrientes de los canales de calcio voltaje dependientes, que no se abren permitiendo una inhibición de la excitabilidad neuronal y además un deterioro de la liberación de neurotransmisores resultando en una transmisión reducida de las señales

del dolor. La modulación de las corrientes de los canales de calcio voltaje dependientes sería una posible explicación para las propiedades analgésicas de la calcitonina (Hagenacker et al., 2011).

I.5.4. Aplicaciones clínicas de la calcitonina

La calcitonina está aprobada para el tratamiento de la osteoporosis, hipercalcemia asociada a malignidad, enfermedad de Paget y para todas aquellas enfermedades que impliquen un recambio óseo acelerado. Normalmente, los tratamientos utilizados para estas enfermedades conllevan una reducción secundaria en la formación ósea, limitando así la eficacia de los diferentes tratamientos. La reducción en la formación ósea en pacientes tratados con calcitonina es casi ausente. Los tratamientos que no afectan fuertemente a la formación ósea, como la calcitonina, quizás mantengan una mejor calidad ósea, permitiendo la restauración de la pérdida ósea (Karsdal et al., 2008b).

La calcitonina se ha usado como un agente terapéutico en el tratamiento de la enfermedad ósea, pero su uso a largo plazo está a menudo limitado por el desarrollo de anticuerpos. Se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* que las acciones inhibitorias de la calcitonina en los osteoclastos pueden reducirse de manera dosis y tiempo dependiente (Turner et al., 2011).

La reabsorción ósea es conocida por presentar una variación circadiana marcada: En humanos, la reabsorción ósea alcanza su punto máximo durante el descanso nocturno y el punto más bajo es observado al mediodía. La inhibición reversible de la reabsorción ósea quizás presente la mejor eficacia posible durante su punto máximo de reabsorción (Karsdal et al., 2008a).



I.6. Dolor relacionado con el movimiento dental ortodóncico

I.6.1. Etiología del dolor

Las molestias asociadas con el movimiento dental ortodóncico pueden ser consecuencia de la presión, isquemia, inflamación y edema del ligamento periodontal (Otasevic et al., 2006).

El dolor asociado con el tratamiento dental, es una reacción subjetiva fuertemente influenciada por factores como el sexo, la personalidad y especialmente la experiencia general y dental previa al dolor. Además, la experiencia dolorosa está influenciada tanto por factores emocionales como medioambientales, incluyendo la cultura, la edad y el estrés (Giannopoulou et al., 2006).

I.6.2. Intensidad del dolor

Aunque fuerzas iniciales intensas a menudo producen dolor, los investigadores no han encontrado una relación directa entre el nivel de fuerza aplicada y el dolor experimentado, o entre la cantidad inicial de apiñamiento y el dolor experimentado. Cuando una fuerza es aplicada a un diente, el paciente normalmente experimenta de 1 a 3 días de dolor. El dolor empieza a las 4 horas, y el pico máximo de dolor se alcanza a las 24 horas, después el dolor disminuye progresivamente durante los siguientes 7 días (Otasevic et al., 2006).

Durante la infancia, las experiencias de dolor ocurren con la misma frecuencia en hombres y mujeres. Después de la infancia, las diferencias de sexo emergen, y las chicas empiezan a dominar en la incidencia y en la intensidad del dolor en comparación con los chicos (Bergius et al., 2002).



Capítulo 2

JUSTIFICACIÓN



La calcitonina tiene un papel fundamental en el metabolismo óseo y es secretada bajo condiciones de incremento de la reabsorción ósea (Turner et al., 2011), pero hasta donde nuestro conocimiento alcanza, los niveles de calcitonina durante el movimiento dental ortodóncico no han sido explorados todavía.

El análisis de los componentes del fluido crevicular gingival es un método no invasivo para estudiar la respuesta celular del ligamento periodontal durante el movimiento dental ortodóncico (Giannopoulou et al., 2006). Además el análisis de estos componentes quizás nos proporcione una serie de indicadores bioquímicos cuantitativos para evaluar el metabolismo celular local, reflejando el estado de salud periodontal y el proceso de remodelación ósea durante el movimiento dental ortodóncico (Ren and Vissink, 2008).

Por otro lado, la toma de muestras de saliva para su posterior análisis presenta numerosas ventajas, destacando que es un método inocuo, rápido, indoloro y sin efectos adversos. El interés por las investigaciones sobre la saliva se ha ido incrementando en los últimos años: Se utiliza para detectar distintas sustancias como drogas, hormonas, marcadores biológicos y mediadores químicos.

En el contexto que nos ocupa, es decir el movimiento dentario generado por aparatología ortodóncia fija multibrackets, el estudio del fluido crevicular y de la saliva puede ayudarnos a profundizar un poco más en los mecanismos que lo producen y median, abrirnos nuevas vías diagnósticas y ayudarnos a aclarar algunos fenómenos a nivel bioquímico.



Capítulo 3

OBJETIVOS



En el presente trabajo nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Determinar si la calcitonina puede detectarse en el fluido crevicular gingival y evaluar los cambios producidos en sus niveles en los lados de tensión y compresión durante los estadios iniciales del movimiento dentario ortodóncico con aparatología fija.
2. Valorar posibles asociaciones entre los cambios en los niveles de calcitonina en el fluido crevicular gingival y la intensidad de dolor percibida por el paciente durante los estadios iniciales del tratamiento ortodóncico con aparatología fija.
3. Evaluar si la calcitonina puede detectarse en saliva y analizar los cambios producidos en sus niveles durante los estadios iniciales del movimiento dentario ortodóncico con aparatología fija.



Capítulo 4

MATERIAL Y
MÉTODO



IV.1. ESTUDIO CLÍNICO 1

IV.1.1. Selección de la población de estudio

Se seleccionaron 15 pacientes jóvenes (8 mujeres y 7 hombres; edad media: 12,6 años) que presentaban un diastema interincisivo superior e iban a ser tratados con ortodoncia fija. Los criterios utilizados en la selección muestral fueron:

Criterios de inclusión:

- Edad entre 10-15 años.
- Origen caucásico.
- Presencia de diastema entre los incisivos centrales superiores \geq 1,5 mm.

Criterios de exclusión:

- Pacientes en tratamiento con antibióticos en los seis meses anteriores al inicio del estudio.
- Pacientes en tratamiento con antiinflamatorios en el mes anterior al inicio del estudio.
- Pacientes con algún tipo de enfermedad sistémica o alteraciones metabólicas o endocrinas.
- Pacientes con enfermedad gingival o periodontal, demostrable mediante una profundidad de sondaje \geq 3 mm o evidencia radiográfica de pérdida ósea.
- Pacientes con mala higiene bucodental.

Los padres de todos los pacientes fueron informados de las características del estudio y se obtuvo su consentimiento informado para que sus hijos participaran en el mismo.

IV.1.2. Diseño del estudio

Dos semanas antes del inicio de este estudio longitudinal prospectivo, cada participante recibió una profilaxis e instrucciones de higiene oral. Todos los participantes mostraron su consentimiento para seguir estrictamente dichas indicaciones. Los pacientes fueron instruidos para no tomar ninguna medicación, incluyendo antiinflamatorios no esteroideos, durante el periodo del estudio. Se realizaron controles de placa y motivación durante todo el estudio.

IV.1.2.1. Movimiento ortodóncico

Se cementaron brackets (0.022 x 0.028 pulgadas, Mini Master, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA) en la cara vestibular de los incisivos centrales superiores. El diastema interincisivo fue cerrado aplicando una fuerza de 100 g por medio de una cadeneta elástica (American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA) (Fig. IV. 1). Para evitar movimientos de alineación verticales, no se introdujo ningún arco en la ranura del bracket durante el estudio.

El diente experimental fue el incisivo central superior derecho. El diente control fue el primer premolar superior derecho o izquierdo, que no llevó ningún tipo de aparatología ortodóncica, ni recibió ningún tipo de fuerza.



Figura IV. 1. Cierre del diastema interincisivo

IV.1.2.2. Visitas

Se recogieron muestras de fluido crevicular en mesial (compresión) y distal (tensión) del diente experimental y en mesial del diente control en los siguientes momentos (Fig. IV. 2– IV. 4):

- 0 horas: justo antes de activar el movimiento.
- 1 hora después de haber iniciado el movimiento.
- 24 horas después de haber iniciado el movimiento.
- 7 días después de haber iniciado el movimiento.
- 15 días después de haber iniciado el movimiento.



Figura IV. 2. Recogida de fluido crevicular en mesial del diente experimental



Figura IV. 3. Recogida de fluido crevicular en distal del diente experimental



Figura IV. 4. Recogida de fluido crevicular en mesial del diente control

IV.1.2.3. *Parámetros clínicos*

En cada cita se evaluaron los siguientes parámetros clínicos en el diente experimental y control, y en los dos dientes adyacentes a éstos:

- *Índice de placa (PI)*: se observó de manera visual y mediante una sonda periodontal la presencia o no de placa en 3 localizaciones por diente y se le asignó un valor de 0 a 3 según el Índice de Sillnes y Loe (Silness and Loe, 1964).
- *Índice gingival (GI)*: el estado gingival se evaluó en función de dos criterios. Primero se determinó la condición gingival en tres localizaciones por diente, siguiendo los criterios del Índice Gingival Modificado de Lobene (Lobene et al., 1986).
- *Índice de sangrado al sondaje (BOP)*: en segundo lugar, se valoró el sangrado al sondaje mediante una sonda periodontal en tres localizaciones por diente según los criterios de Mühlemann y Son (Mühlemann and Son, 1971).

Estos parámetros clínicos se midieron tras las tomas de fluido crevicular gingival para no alterar los parámetros del fluido.

El disconfort o dolor se midió mediante una escala análoga visual (VAS) en cada momento del estudio, previo a la recogida del fluido crevicular y a las medidas de los índices periodontales.

IV.1.3. *Recogida del fluido crevicular gingival*

Las muestras de fluido crevicular se tomaron con puntas de papel tipo Periopaper[®], según protocolo descrito anteriormente (Toygar et al., 2008; Dilsiz et al., 2010).

Los dientes seleccionados se aislaron con rollos de algodón, se eliminó la placa bacteriana y se secaron cuidadosamente con aire. Se introdujeron



las tiras de papel 1 mm subgingivalmente, y se mantuvieron in situ durante 30 segundos. Si alguna de las muestras resultó contaminada por saliva o sangre, se desechó y se esperó al menos 10 minutos para la toma de una nueva muestra en la misma localización.

Cada muestra fue colocada en un tubo tipo Eppendorf de 1,5 ml y almacenada a -80° C, para posteriormente procesarlas todas juntas, una vez terminada la fase clínica del estudio.

IV.1.4. Evaluación del discomfort o dolor

En la visita basal el paciente relleno un breve cuestionario para evaluar la experiencia previa con el dolor general y dental. La experiencia previa del dolor general fue evaluada con una escala analógica visual (VAS) de 100 mm, con dos puntos finales, etiquetados como "no dolor" en la izquierda y "máximo dolor" en la derecha. La misma escala fue usada para medir el dolor dental relativo a situaciones experimentadas previamente.

Las molestias o dolor durante el periodo del estudio también fue evaluado con la VAS. Los pacientes indicaron su nivel actual de intensidad de dolor espontáneo y de dolor experimentado mientras apretaban rollos de algodón con el diente experimental y control.

IV.1.5. Análisis de Western- Blot

IV.1.5.1. Preparación de las muestras

Los niveles de calcitonina del diente experimental y del diente control fueron analizados mediante un análisis de Western-blot con anticuerpos específicos frente a la calcitonina.



El día del análisis cada muestra fue diluida en 100µl de buffer al 1% Triton X-100 en 50 mM Tris-HCL (pH 7.5) (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) y centrifugada a 12500 rpm durante 5 minutos.

Se preparó una dilución con tampón de carga (20µl de muestra + 20µl de tampón de carga). Se calentó la dilución 5 minutos a 95 °C.

Tampón de carga 5x: se disolvieron 6,05 g Tris en 80 ml de agua, se ajustó el pH a 6,8 con HCl; se añadieron 0,4 g SDS y se completó hasta 100 ml con agua. Se tomaron 12,5 ml de la solución anterior y se le añadieron 10 ml de glicerol, 2 g de SDS y 0,0005 g de azul de bromofenol, y se completó con agua hasta un volumen final de 25ml. Después se hicieron alícuotas de 800 µl y se congelaron.

Cada vez que se repetía la técnica se descongelaba una alícuota y se le añadían 200 µl de mercaptoetanol (en la campana de gases). Finalmente se completaba con agua hasta obtener un volumen de 5 ml (tampón de carga 1x).

IV.1.5.2. Electroforesis

Se realizó la electroforesis de las proteínas en geles con una matriz de poliacrilamida. La electroforesis en poliacrilamida es un método conveniente, rápido y económico; además la cantidad de muestra que se requiere es solo del orden de microgramos de proteínas.

Las proteínas presentan una carga eléctrica neta si se encuentran en un medio que tenga 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 emigración es proporcional a la relación entre las cargas de la proteína y su masa. Una ventaja importante de los geles de poliacrilamida es que son químicamente inertes, transparentes y estables en un amplio rango de pH, temperatura y fuerza iónica.



La electroforesis en geles de poliacrilamida se puede realizar empleando sistemas de uno o más geles, en estos casos se habla de sistema continuo o discontinuo. En los sistemas discontinuos el primer gel asegura la migración de todas las proteínas en el frente de migración, provocándose la acumulación de todas las proteínas que se han cargado en el pocillo. La separación realmente comienza a partir del momento en el que el frente de migración alcanza la frontera del segundo gel. Este sistema es especialmente adecuado para analizar muestras diluidas sin perder resolución, en general, se emplean sistemas de dos geles (discontinuos). A continuación, se puede determinar el peso molecular aparente de cualquier proteína por comparación con un patrón de proteínas de pesos moleculares conocidos.

Se prepararon los geles a una concentración del 10% (Fig. IV. 5). Una vez habían gelificado se situaron en la cubeta de electroforesis (tabla IV. 1 y IV. 2). Se colocaron 40 μ l de dilución (20 μ l de muestra + 20 μ l de solución tampón) en cada pocillo, excepto en dos pocillos donde en uno se puso 12 μ l de peso molecular y en otro se puso calcitonina pura (control positivo). Se añadió el tampón de electroforesis 1x a la cubeta. La electroforesis se mantuvo constante a 80 V durante 2 ó 3 horas (Fig. IV. 6 y IV. 7). Pasado este tiempo la línea del frente de migración estaba aproximadamente a 1 cm del borde de la cámara.

RUNNING GEL	2 GELES 10%
Acrilamida 30%	3.1 ml
Running buffer 4x	2.3 ml
SDS 10%	90 μ l
Glicerol 50%	0.9 ml
Agua	2.7 ml
APS 10%	100 μ l
TEMED	20 μ l

Tabla IV. 1. Running gel al 10%

GEL SUPERIOR	2 GELES 10%
Acrilamida 30%	0.8 ml
Stacking buffer 4x	2 ml
SDS 10%	80 μ l
Agua	5.12 ml
APS 10%	100 μ l
TEMED	20 μ l

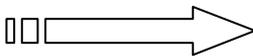
Tabla IV. 2. Gel superior al 10%

- *Running buffer 4x*: Se disolvieron 18,5 g de Tris en 80 ml de agua, se ajustó el pH a 8.0 y después se completó hasta 100 ml con agua.
- *Stacking buffer 4x*: Se disolvieron 6 g de Tris en 80 ml de agua, se ajustó el pH a 6.8 y después se enrasó a 100 ml con agua.
- *SDS 10%*: Se disolvieron 5 g de SDS en 50 ml de agua.
- *Glicerol 50%*: Se disolvieron 50 ml glicerol en 50 ml de agua.
- *APS 10%*: Se disolvió 1 g APS en 10 ml de agua.
- *Tampón de electroforesis 5x* :

15g de Tris

72g de Glicina

5g de SDS



Se completó hasta 1000 ml con agua. Finalmente se llevó a 1x: se tomaron 200 ml de tampón 5x y se le añadieron 800 ml de agua.



Figura IV. 5. Geles de poliacrilamida al 10%



Figura IV. 6 y IV. 7. Proceso de electroforesis

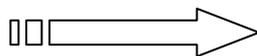
IV.1.5.3. Transferencia

La transferencia de proteínas o “blotting” supone la inmovilización de las proteínas sobre membranas sintéticas. Una vez que las proteínas fueron separadas mediante electroforesis se transfirieron a una membrana electroforéticamente. El procedimiento consistió en poner en este orden: papel de filtro, la membrana de nitrocelulosa, el gel y otro papel de filtro, todo empapado en tampón de transferencia sobre un tanque en el que se encontraban dos electrodos planos. Se dispuso de forma que el gel quedaba hacia el ánodo (-) y la membrana hacia el cátodo (+)(Fig. IV. 8).

La transferencia se realizó a 15V y 0,30A durante 20 minutos.

▪ Tampón de transferencia:

5,82 g Tris
2,9 g Glicina
937 μ l SDS 10%



Se completó hasta 800 ml con agua. De los 800 ml se tomaron 200 ml y se le añadieron 50 ml de metanol.

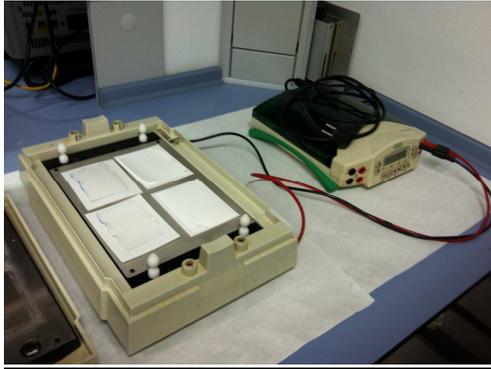


Figura IV. 8. Proceso de transferencia

IV.1.5.4. Bloqueo

Una vez que teníamos las proteínas en nuestra membrana de nitrocelulosa ya transferidas, la pusimos durante una hora en una solución de bloqueo (PBS + leche al 5%) a temperatura ambiente (Fig. IV. 9).

Tras la incubación se realizaron tres lavados de 5 minutos con PBS.



Figura IV. 9. Bloqueo de la membrana

IV.1.5.5. Incubación

IV.1.5.5.1. Anticuerpo primario

Tras el bloqueo, la membrana de nitrocelulosa fue incubada con el



anticuerpo primario Calcitonin mouse monoclonal IgG1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) a una concentración de 1:100 y debió permanecer en movimiento- agitación durante toda la noche en el frigorífico a 4°C.

Tras la incubación se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS también en movimiento para facilitar la retirada del anticuerpo primario.

IV.1.5.5.2. Anticuerpo Secundario

A continuación, la membrana de nitrocelulosa fue incubada ahora con el anticuerpo secundario Anti-Mouse IgG peroxidase conjugate (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) a una concentración 1:200 durante una hora en movimiento a temperatura ambiente.

Tras este periodo se realizaron tres lavados de 10 minutos cada uno con PBS en movimiento para facilitar la retirada del anticuerpo secundario.

IV.1.5.6. Detección

Una vez que teníamos la membrana lavada procedimos a la detección de la proteína por quimioluminiscencia. Se colocó la membrana en un recipiente y se le añadió 1 ml de cada uno de los dos componentes del revelador (ECL Western Blotting Analysis System (Amersham, GE Healthcare, Ballardvale St, Wilmington, MA 01887, USA). Se agitó suavemente para que toda la superficie de la membrana entrara en contacto con el reactivo quimioluminiscente, posteriormente se dejó en oscuridad durante 2 minutos. Después se utilizó un software de tratamiento de imagen (Imagen Reader Las 400 Fujifilm) y se realizó el estudio de las imágenes guardándolas toda en formato tif; así después se abrieron dichas imágenes desde el software que nos permitió identificar las imágenes escaneadas.

Este procedimiento se repitió para todas y cada una de las membranas (Fig. IV. 10).

Con este procedimiento obtuvimos imágenes digitales formadas por 10 pocillos, de los cuales uno de ellos en todas las imágenes pertenecía al control positivo (calcitonina pura) y otro al peso molecular, quedándonos así 8 pocillos para las muestras de los sujetos analizados.

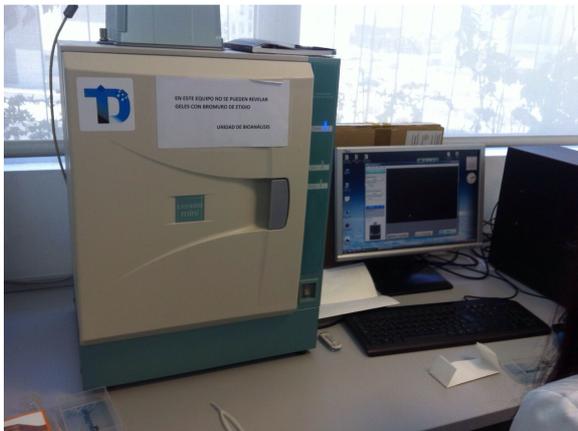


Figura IV. 10. Detección de las proteínas

IV. 1.6. Análisis densitométrico

Mediante el software Quantity one 1-D Analysis software, de análisis densitométrico de imagen (BIO-RAD, Hercules, CA, USA), se realizó una comparación entre los distintos pocillos de los pacientes referidos al control positivo al cual le dimos un valor determinado y calculado. Así se determinaron los valores absolutos de calcitonina en todas las muestras procesadas.

Además, obtuvimos una recta de regresión que se realizó mediante un Western- blot con concentraciones de calcitonina pura conocidas y las bandas obtenidas fueron también cuantificadas densitométricamente. Se efectuaron Western-blot con concentraciones de 8 µg, 17 µg, 20 µg, 25 µg y



30 μg de calcitonina pura (Fig. IV. 11).

Para obtener la recta se cargó la calcitonina pura en diferentes concentraciones junto con el peso molecular para comprobar que la banda de la calcitonina coincide con la altura de su peso molecular control (peso molecular de la calcitonina: 14,5 KDa).

Para calcular las concentraciones problema de las diferentes muestras, se realizó una recta de regresión representado la densidad de diferentes concentraciones conocidas de calcitonina pura (Sigma Aldrich).

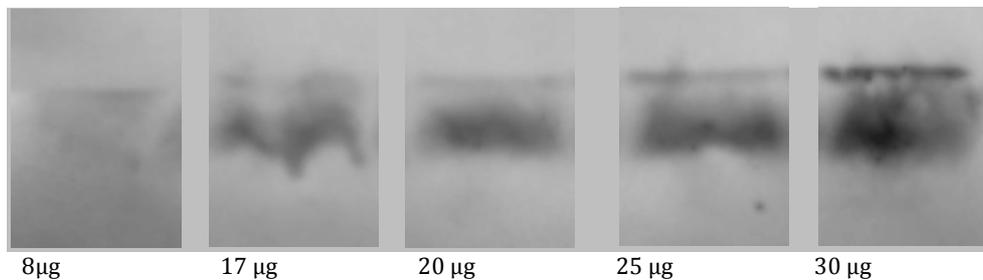


Figura IV. 11. Diferentes concentraciones de calcitonina pura

IV.1.7. Análisis estadístico

IV.1.7.1. Estadística descriptiva

Para todas las variables del estudio se calcularon las medias, desviaciones estándar e intervalos de confianza para cada grupo en todos los momentos analizados. Para describir las variables categóricas, se utilizaron frecuencias (porcentajes).

IV.1.7.2. Estadística analítica

Los cambios longitudinales detectados en los niveles de calcitonina en el fluido crevicular se expresaron como porcentajes de los valores basales (0

h). Tras evaluar la normalidad de las muestras, se efectuó un análisis de ANOVA para medidas repetidas y con tests post hoc para comparar diferencias entre las zonas (tensión, compresión y control) y para analizar las diferencias intragrupo entre los diferentes momentos del estudio (1h a 24h, 7d, o 15d; 24h a 7d o 15d; y 7d a 15d). Para estudiar las posibles correlaciones entre el nivel de calcitonina en el fluido crevicular gingival y la intensidad de dolor, y entre la intensidad de dolor y el dolor dental y general experimentado previamente se realizó un análisis de regresión lineal múltiple. Se utilizó el software SPSS 19.0 (SPSS Inc, Chicago, IL, USA) para el análisis estadístico.

IV.2. ESTUDIO CLÍNICO 2-ESTUDIO PILOTO

IV.2.1. Selección de la población de estudio

Se realizó un estudio piloto prospectivo longitudinal con dos grupos: un grupo de estudio, formado por 5 pacientes que iban a iniciar su tratamiento de ortodoncia con aparatología fija en la arcada superior y un grupo control, formado también por 5 sujetos de similares características en cuanto a sexo, edad, origen, nivel socio-económico y cultural, pero que no recibió ningún tipo de tratamiento ortodóncico (Fig. IV. 12 y IV. 13)

Los individuos que participaron en el estudio fueron informados del mismo y de sus implicaciones de forma oral y mediante un consentimiento informado que todos firmaron.

Se enumeran a continuación los criterios empleados para la selección muestral:

Criterios de inclusión:

- Sexo masculino.



- Edad comprendida entre los 20 y 35 años.
- Origen caucásico.
- Pacientes diagnosticados de maloclusión que requerían tratamiento de ortodoncia con aparatología fija al menos en la arcada superior.
- Uso de brackets metálicos o estéticos (zafiro) por vestibular, en todos los dientes de la arcada superior.

Criterios de exclusión:

- Pacientes en tratamiento con antibióticos en los seis meses anteriores al inicio del estudio.
- Pacientes en tratamiento con antiinflamatorios en el mes anterior al inicio del estudio.
- Pacientes con algún tipo de enfermedad sistémica o alteraciones metabólicas o endocrinas.
- Fumadores.
- Pacientes con enfermedad periodontal.
- Pacientes con mala higiene bucodental.



Figura IV. 12. Grupo de estudio



Figura IV. 13. Grupo control



IV.2.2. Diseño del estudio

IV.2.2.1. Visitas

Se obtuvieron cuatro muestras de saliva de cada sujeto en los siguientes momentos:

- *T0*: justo antes de la colocación de aparatología fija.
- *T1*: 24 horas después del inicio del tratamiento.
- *T2*: una semana después del inicio del tratamiento.
- *T3*: cuatro semanas después del inicio del tratamiento.

IV.2.2.2. Parámetros clínicos

Una vez tomada la muestra de saliva se determinaron tres índices:

- *Índice de placa (P.I)*: Se valoró la presencia de placa según el Índice de Silness y Loe (Silness and Loe, 1964).
- *Índice gingival (G.I)*: Se determinó la condición gingival siguiendo los criterios del Índice Gingival Modificado de Lobene (Lobene et al., 1986).
- *Índice de sangrado (BOP)*: Se registró la presencia de sangrado según los criterios de Mühleman and Son (Mühleman and Son, 1971).

En todos los casos se tomaron en todos los dientes permanentes de la arcada superior.

IV.2.3. Recogida de la saliva

Para la recogida de la muestra de saliva se estimuló su secreción mediante un trozo de parafina. Los pacientes la masticaron y durante los dos primeros minutos la saliva generada se deshechó. Durante los siguientes cinco minutos el paciente la depositaba en un tubo de recogida.



Una vez obtenidas las muestras de saliva se congelaron a -20° para su almacenaje.

IV.2.4. Análisis de Western-Blot

IV.2.4.1. Preparación de las muestras

Posteriormente se descongelaron las muestras de saliva y se recogieron 1000 μ l de saliva usando una pipeta (Sorderex, modelo Acura 825) (Fig. IV. 14 y IV. 15), colocándola en tubos Eppendorf.

A continuación se centrifugaron las muestras de saliva preparadas, en una centrifugadora Sigma 4K10 durante 10 minutos a 3000 rpm (3000 G) (Fig. IV.16).

Tras el centrifugado se obtuvo un sobrenadante del cual se pipeteó la saliva, se desechó el pellet, es decir, la parte del fondo del tubo, que contenía células muertas, materia orgánica, biofilm y otras sustancias que no se precisaban para el estudio e incluso podían influir en los resultados, y se almacenó en tubos Eppendorf para su posterior análisis clínico (fig. IV. 17). Se recogieron 650 μ l de saliva y se almacenaron a -20° para su posterior análisis.

Para detectar la presencia de calcitonina en saliva se llevó a cabo un análisis Western-blot sobre alícuotas de 20 μ l de saliva de cada visita.

Conocida la concentración de proteínas totales se preparó una dilución con tampón de carga (20 μ l de muestra + 20 μ l de tampón de carga). Seguidamente se calentaron 95°C durante 5 minutos.



Figura IV. 14. Pipeta empleada en el estudio (Sorderex, modelo Acura 825)



Figura IV. 15. Obtención de la muestra de saliva

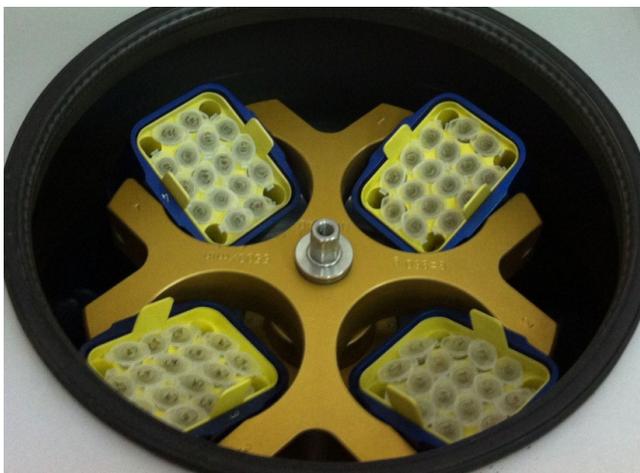


Figura IV. 16. Centrifugadora empleada(Sigma 4K10)



Figura IV. 17. Detalle del sobrenadante y el pellet

IV.2.4.2. Electroforesis, transferencia, bloqueo, incubación, detección y análisis densitométrico

Estos procesos del análisis de Western- Blot son los descritos anteriormente para el estudio clínico 1.

IV.2.5. Análisis estadístico

IV.2.5.1. Estadística descriptiva

Para todas las variables del estudio se calcularon las medias, desviaciones estándar e intervalos de confianza para cada grupo en todos los momentos analizados. Para describir las variables categóricas, se utilizaron frecuencias (porcentajes).

IV.2.5.2. Estadística analítica

Se planificó analizar las diferencias intra e intergrupo en cada momento tras comprobar si cumplían o no el supuesto de normalidad (test de Shapiro Wilks). Seguidamente, al no cumplir el supuesto de normalidad, se analizaron las diferencias intra e intergrupo utilizando un test de Anova



no paramétrico de dos vías para medias repetidas (Friedmann test con contrastes a posteriori de Dunn's).

Los análisis se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS versión 19. El nivel de significación estadística se estableció en $P < 0.05$. al 95%.



Capítulo 5

RESULTADOS



V.1.RESULTADOS DEL ESTUDIO 1

V.1.1. Cambios en los niveles de calcitonina en el fluido crevicular gingival

El volumen de las muestras de fluido crevicular oscilaba entre los 0,1 y los 0,9 μ l.

La tabla V.1 muestra la estadística descriptiva de los niveles de calcitonina expresados como la cantidad total por 30 segundos de recogida de la muestra, en el lado de tensión y compresión del diente experimental y en el lado mesial del diente control. Se encontró un pronunciado incremento en el porcentaje de los niveles de calcitonina en el intervalo de tiempo comprendido entre desde 1 hora a 7 días en la zona de compresión ; estos niveles permanecieron bastante estables en las zonas de tensión y control (Fig. V.1-V.4). En la tabla V.2 se muestran diferencias longitudinales en los cambios de calcitonina entre las zonas de estudio, expresadas como el porcentaje de cambio con respecto a los niveles basales respectivos. Se detectó un incremento en el porcentaje de los niveles de calcitonina en la zona de compresión comparada con la zona control a los 7 días ($p=0.014$). Además, se realizaron comparaciones entre los diferentes momentos del estudio, que indicaron un incremento en el porcentaje de los niveles de calcitonina entre 1 hora y 7 días en la zona de compresión. Sin embargo, no se hallaron diferencias significativas en el porcentaje entre las zonas de tensión y control a lo largo del tiempo (Tabla V.3).

	Tensión			Compresión			Control		
	Media	DS	IC	Media	DS	IC	Media	DS	IC
Basales	23,0	34,4	13,5	5,7	4,4	6,0	25,9	25,9	18,0
1 h	29,9	24,7	21,0	6,7	6,9	4,8	33,8	45,1	17,3
24 h	36,3	44,4	18,9	11,2	17,0	2,9	25,8	27,5	13,8
7 d	43,7	64,4	14,3	38,2	32,0	26,0	21,8	23,6	12,9
15 d	31,7	31,8	16,8	27,7	22,6	22,1	27,8	23,7	19,8

Tabla V. 1. Estadística descriptiva de los niveles de calcitonina expresados como la cantidad total por 30 segundos de recogida de muestra en el lado de tensión, compresión y control durante el estudio. DS: desviación estándar. IC: intervalo de confianza

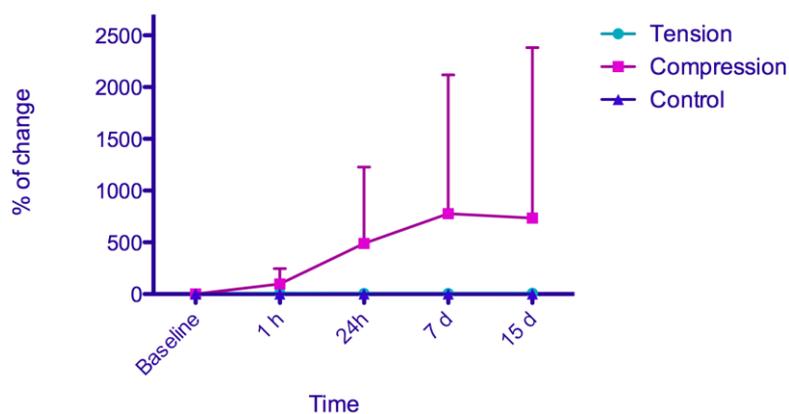


Figura V. 1. Evolución de los valores de calcitonina medios en los sitios de tensión, compresión y control durante el estudio

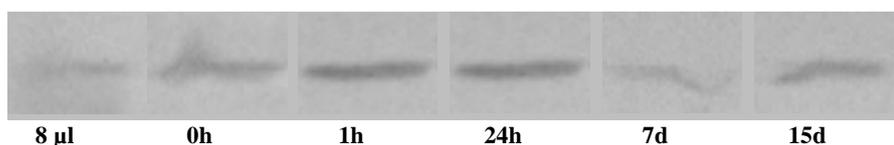


Figura V. 2. Ejemplo de imagen del Western-blot de un diente experimental (calcitonina pura y lado de tensión)

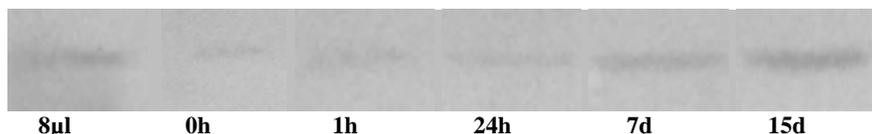


Figura V. 3. Ejemplo de imagen del Western-blot de un diente experimental (calcitonina pura y lado de compresión)

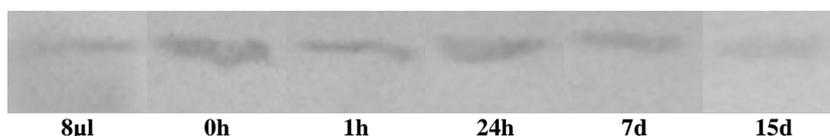


Figura V. 4. Ejemplo de imagen del Western-blot de un diente control (calcitonina pura y mesial de diente control)



	Tensión-Compresión			Tensión-Control			Compresión-Control		
	Dif media	DS	Valor P	Dif media	DS	Valor P	Dif media	DS	Valor P
1 h	-87,9	213,9	0,643	7,3	18,6	0,160	95,3	209,8	0,770
24 h	-484,8	1032,4	0,492	3,6	7,4	0,059	488,5	1031,2	0,770
7 d	-772,4	1876,7	0,131	4,2	9,9	0,123	776,7	1874,8	0,014
15 d	-727,5	2305,6	0,770	4,9	12,0	0,432	732,5	2301,1	0,160

Tabla V. 2. Diferencias entre las zonas para los niveles de calcitonina expresados como porcentajes con respecto a los niveles basales en las zonas de tensión, compresión y control

	TENSIÓN			COMPRESIÓN			CONTROL		
	Media	DS	Valor P	Media	DS	Valor P	Media	DS	Valor P
1h-24h	4,0	15,7	0.322	-392,7	828,9	0.547	0,4	0,9	0.160
1h-7d	3,6	8,9	0.492	-680,8	1672,6	0.010	95,8	209,7	0.375
1h-15d	1,8	8,7	0.557	-637,7	2129,6	0.131	-0,5	1,8	1
24h-7d	-0,4	9,2	1	-288,0	1081,1	0.193	0,1	0,4	0.275
24h-15d	-2,2	9,2	0.846	-244,9	1756,6	0.160	-0,9	2,5	0.846
7d-15d	-1,7	3,4	0.129	43,1	782,7	0.695	-1,0	2,7	0.426

Tabla V. 3. Diferencias entre los diferentes momentos del estudio entre los niveles del calcitonina, expresados como porcentajes con respecto a los niveles basales, en los lados de tensión, compresión y control

V.1.2. Evaluación del disconfort o dolor

El cuestionario basado en una entrevista reveló que el dolor general más fuerte experimentado previamente fue asociado con “torcerse un tobillo”, seguido por “cortarse un dedo”. El dolor dental más fuerte experimentado previamente fue asociado con “inyección” y “perforación”. Se observó una diferencia sustancial entre el dolor dental y general experimentado previamente por los sujetos.

La figura V.5 muestra la evolución de la puntuación VAS media para el diente control y experimental durante el estudio. En el diente experimental la intensidad del dolor espontáneo se incrementó en el intervalo de tiempo entre 1 hora a 24 horas, mientras la intensidad del dolor cuando estaban apretando rollos de algodón se incrementó sustancialmente a partir de la

aplicación de fuerzas ortodóncicas, 0 h, a las 24 horas. La intensidad del dolor volvió a los valores iniciales después de 7 y 15 días, respectivamente. Sin embargo, en el diente control la intensidad del dolor no cambió en ningún momento. No se encontró ninguna correlación entre la intensidad del dolor experimentada durante el estudio y el dolor dental y general experimentado previamente.

Se encontró una asociación negativa entre el incremento de los niveles de calcitonina y la puntuación VAS en el diente experimental cuando se apretaban rollos de algodón en el periodo de las 24 horas a los 15 días.

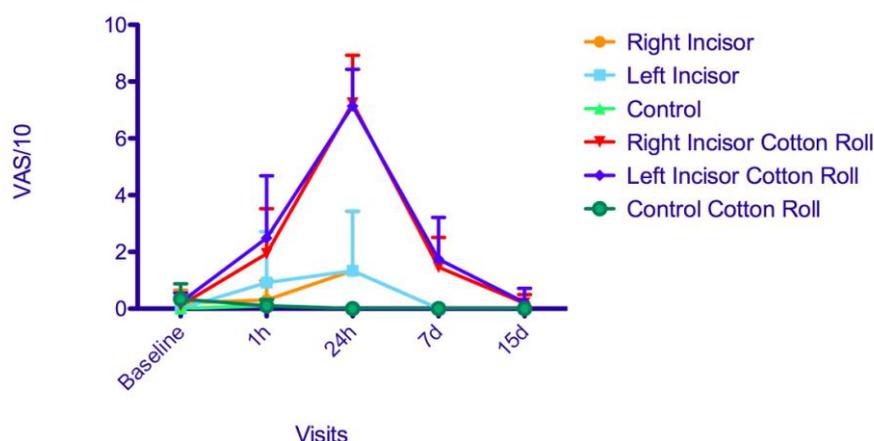


Figura V. 5. Evolución del dolor

V.1.3. Índice de Gingivitis, Placa y Sangrado

Todos los pacientes mantuvieron una buena higiene oral durante el estudio. No hubo ningún cambio significativo en los índices PI, GI ni BOP en ninguna zona ni en ningún momento del estudio (Fig. V.6-V.8).

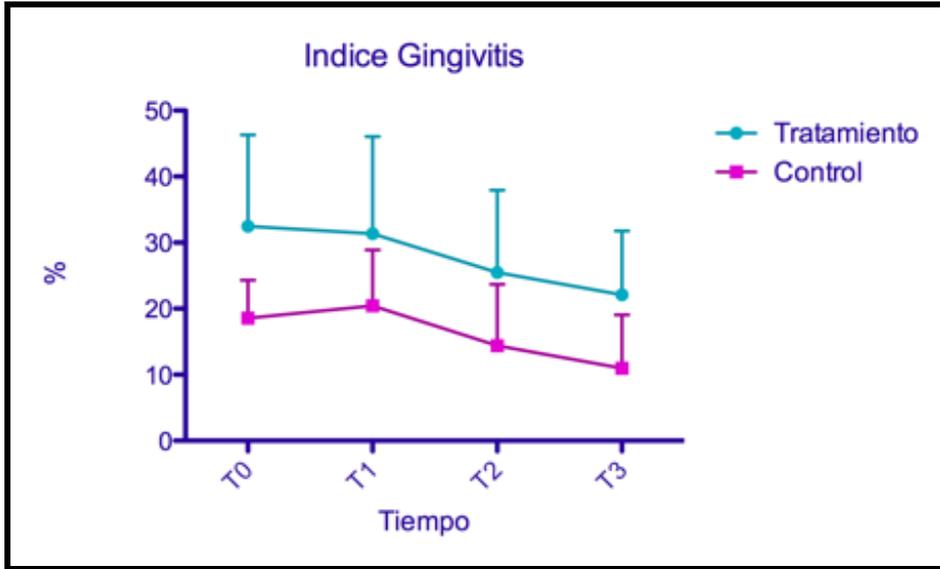


Figura V. 6. Índice de gingivitis a lo largo del tiempo en el grupo tratado y en el control

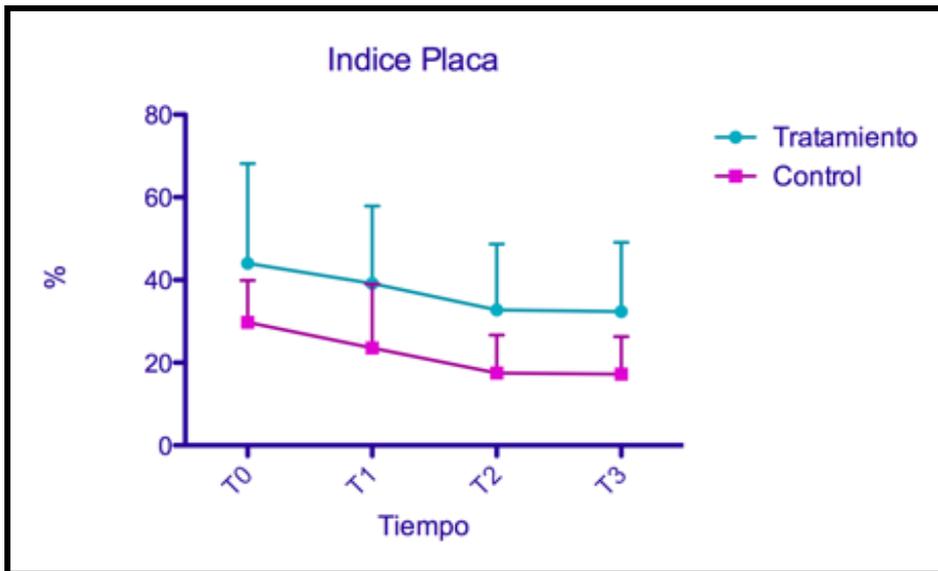


Figura V. 7. Índice de placa a lo largo del tiempo en el grupo tratado y en el control

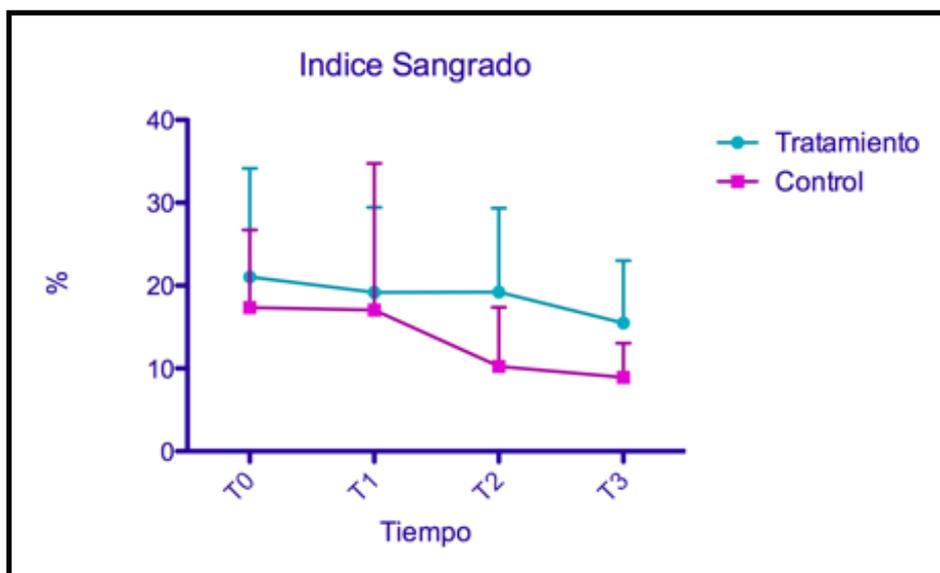


Figura V. 8. Índice de sangrado a lo largo del tiempo en el grupo tratado y en el control

V.2. RESULTADOS DEL ESTUDIO 2- ESTUDIO PILOTO

V.2.1. Cambios en los niveles de calcitonina en la saliva

Los resultados obtenidos, tanto en el grupo experimental como en el grupo control fueron 0 pg/ml en todos los casos y en todas las visitas, como se expone en las tablas V.4, V.5 y en la figura V.9.

Estos resultados indican que el Western-blot no detectó calcitonina en saliva, bien porque no había o bien porque la cantidad era tan mínima que no podía detectarla.

A lo largo del primer mes del tratamiento de ortodoncia con aparatología fija tampoco aparece calcitonina en saliva detectable mediante Western-blot.

Por tanto no hubo diferencias entre ambos grupos ni el tratamiento de ortodoncia con aparatología fija influyó en la aparición de calcitonina en



saliva durante el primer mes. Al no detectarse calcitonina en ningún paciente no se prosiguió con los análisis estadísticos previstos.

GRUPO EXPERIMENTAL				
	0 horas	24 horas	7 días	1 mes
Paciente 1	0	0	0	0
Paciente 2	0	0	0	0
Paciente 3	0	0	0	0
Paciente 4	0	0	0	0
Paciente 5	0	0	0	0

Tabla V.4. Niveles de calcitonina en saliva a lo largo del estudio en los pacientes del grupo experimental (pg/ml)

GRUPO CONTROL				
	0 horas	24 horas	7 días	1 mes
Paciente 1	0	0	0	0
Paciente 2	0	0	0	0
Paciente 3	0	0	0	0
Paciente 4	0	0	0	0
Paciente 5	0	0	0	0

Tabla V.5. Niveles de calcitonina en saliva a lo largo del estudio en los sujetos del grupo control (pg/ml)



Figura V.9. Resultados del Western-blot en saliva para la detección de calcitonina

V.2.2. Índices de Gingivitis, Placa y Sangrado

Las figuras V.10-V.12 muestran la evolución de los tres índices determinados, gingivitis, índice de placa e índice de sangrado, respectivamente, en los dos grupos de estudio. En ningún momento hubo diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos de estudio.

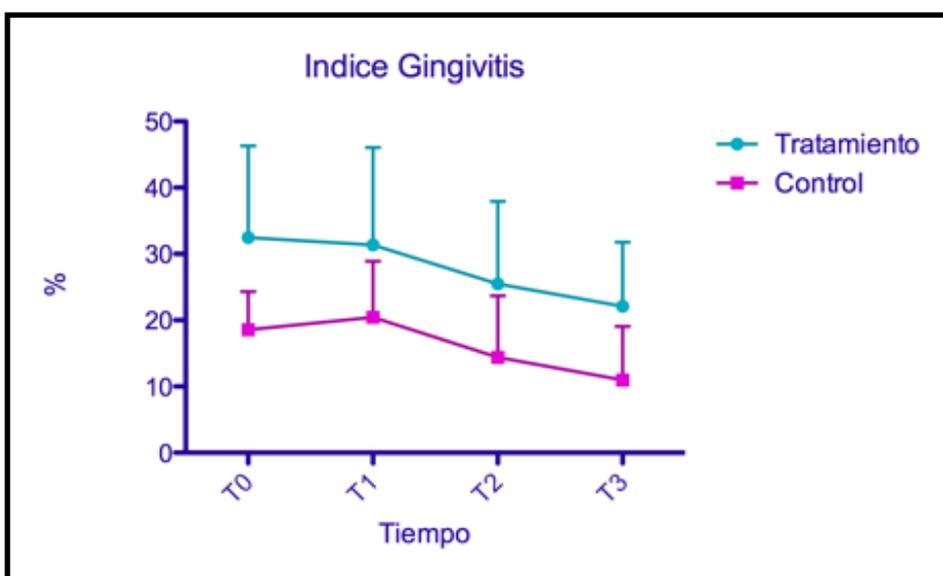


Figura V.10. Índice de gingivitis a lo largo del tiempo en el grupo tratado y en el control

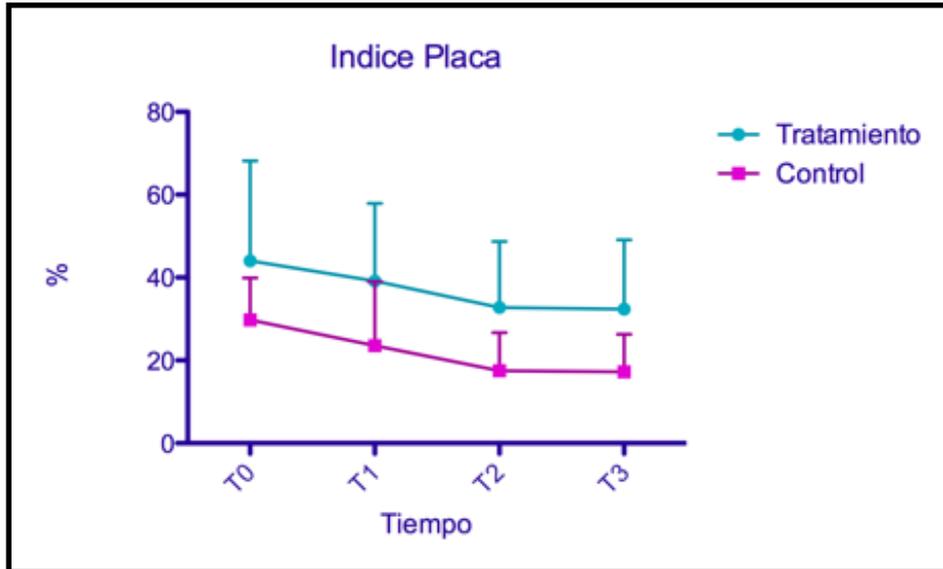


Figura V.11. Índice de placa a lo largo del tiempo en el grupo tratado y en el control

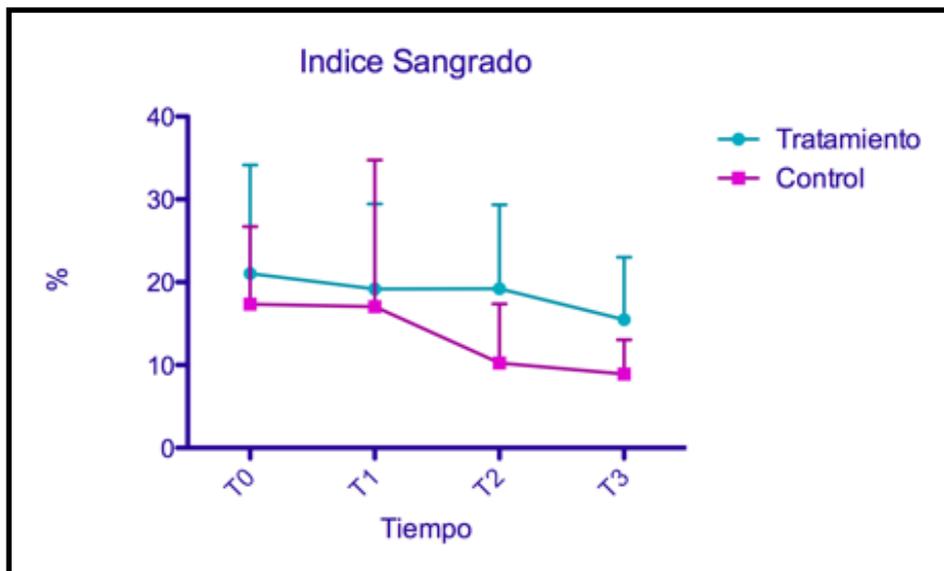
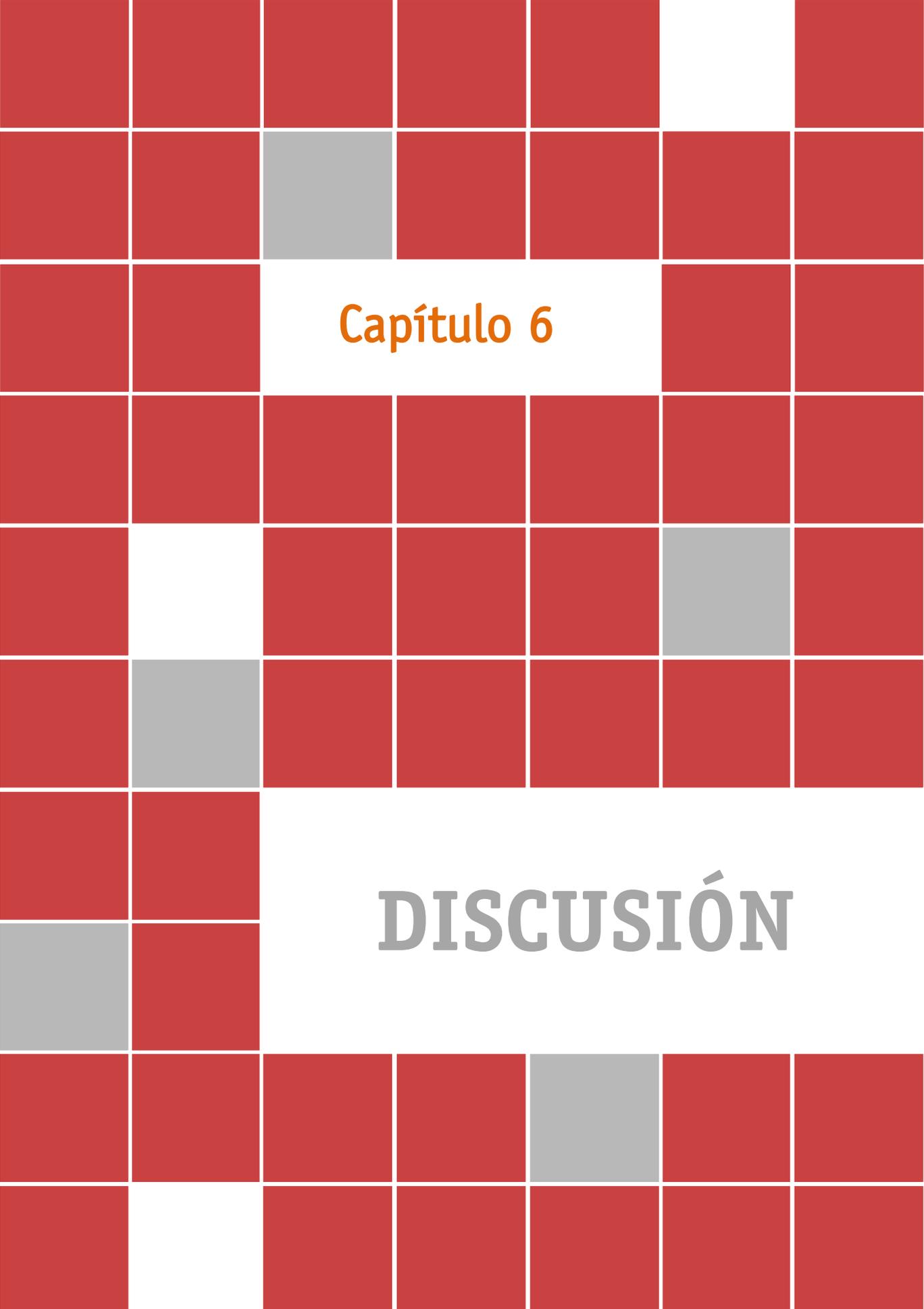


Figura V.12. Índice de sangrado a lo largo del tiempo en el grupo tratado y en el control



Capítulo 6

DISCUSIÓN



VI.1. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO 1

VI.1.1. Discusión de la técnica: Western-Blot

El Western-blot es una técnica usada para identificar, cuantificar y determinar el tamaño de proteínas específicas en un tejido completo o en extractos del tejido (Jensen, 2012). Este proceso implica la separación de proteínas de una célula de acuerdo a su tamaño, la inmovilización de éstas en una membrana, y la utilización de un anticuerpo para detectarlas (Elliotts et al., 2014).

Es una técnica ampliamente usada en biología molecular, bioquímica, inmunogenética y otras disciplinas (Pan et al., 2010). Su amplio uso se debe a que es fácil de realizar, presenta una sensibilidad moderada, gran especificidad, resolución y rendimiento, además de ser una técnica semi-cuantitativa (Campanella and Bramanti, 2014; Elliott et al., 2014; Zlotoryski, 2014).

En el Western-blot resulta esencial la utilización de anticuerpos específicos y de alta calidad para que se unan específicamente a la proteína que se desea analizar, entre una mezcla de cientos de proteínas. La mayoría de los anticuerpos son obtenidos fácilmente de fuentes comerciales, pero son relativamente caros e inasequibles para algunos laboratorios. Se está intentando la aplicación de métodos que usen la mínima cantidad de anticuerpo sin comprometer los resultados, lo que sería muy ventajoso. Hasta el momento, se ha realizado la incubación de la membrana en bolsas de plástico selladas o la aplicación de reactivos directamente en un solo lado de la membrana para reducir el coste de los anticuerpos y de los reactivos, sin embargo, usar este proceso requiere bolsas especiales y un cuidado extremo para prevenir pliegues en la membrana. El reactivo se agota con mucha facilidad y la membrana quizás se seque cuando aplicamos el reactivo en un solo lado de la membrana. La principal ventaja de este método de incubación económico es el ahorro de aproximadamente del 80%

del anticuerpo primario y secundario, y del reactivo, sin comprometer la sensibilidad de la técnica de Western- blot (Pan et al., 2010).

Entre los inconveniente del Western-blot destacan que es una técnica cara, consume mucho tiempo, necesita anticuerpos validados y no puede determinar la ubicación de la expresión de la proteína en la célula (proteínas intracelulares o proteínas de superficie) (Campanella and Bramanti, 2014; Elliott et al., 2014; Zlotoryski, 2014). Además, durante la realización del Western-blot puede ocurrir que los anticuerpos reaccionen con proteínas que no son el objetivo de nuestro estudio, particularmente si éstas contienen una región con estructura similar a la proteína que queremos estudiar. Este problema ocurre frecuentemente con anticuerpos policlonales, pero incluso anticuerpos monoclonales pueden mostrar reacciones no específicas con proteínas que no deseamos estudiar (Elliotts et al., 2014).

Estas limitaciones, junto con la gran cantidad de proteínas nuevas que se están descubriendo, para las cuales esta técnica está limitada por la falta de disponibilidad de anticuerpos con una alta especificidad para éstas; han creado la necesidad de desarrollar nuevas técnicas para la cuantificación de proteínas (Campanella and Bramanti, 2014).

VI.1.2. Relación entre niveles de calcitonina y movimiento dental ortodóncico

El análisis bioquímico de los componentes del fluido crevicular nos ha provisto de un modelo no invasivo para investigar la respuesta celular del ligamento periodontal durante el movimiento dental ortodóncico en vivo (Dilsiz et al., 2010)

En el fluido crevicular existen una serie de factores celulares y bioquímicos que reflejan el estado del periodonto subyacente (Kereshanan et al., 2008). En él se han encontrado varios marcadores bioquímicos



relacionados con la reabsorción ósea, como IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , sustancia P ó β -glucuronidasa, y con la formación ósea, como osteocalcina ó leptina (Dilsiz et al., 2010; Dudic et al., 2006; Ren and Vissink, 2008; Uematsu et al., 1996).

Actualmente existen pocos indicadores bioquímicos que nos indiquen la cantidad de movimiento dental cuando un diente se somete a fuerzas ortodóncicas.

La calcitonina inhibe la reabsorción ósea en estados de hipercalcemia, ya que inhibe la motilidad, la formación de anillos de actina y los mecanismos de reabsorción ósea de los osteoclastos (de Paula and Rosen, 2010; Qin and Yang, 2008; Qin et al., 2009; Turner et al., 2011). Por lo tanto, la calcitonina podría servirnos como un indicador bioquímico que nos reflejaría de forma cuantitativa el proceso de remodelación ósea durante el tratamiento ortodóncico.

En esta investigación nos planteamos una serie de interrogantes, el primero de ellos era ¿existe calcitonina en el fluido crevicular en los sitios de compresión y de tensión de un diente sometido a fuerzas ortodóncicas? Otra interrogante que nos planteamos era ¿está asociada la calcitonina a cambios que ocurren durante la fase temprana del movimiento ortodóncico? Y finalmente, ¿los niveles de calcitonina están relacionados con la intensidad de dolor percibida durante el tratamiento ortodóncico?

Nuestros datos mostraban que en los dientes control no se encontraban cambios significativos en los niveles de calcitonina. Los dientes control no estaban sometidos a ninguna fuerza ortodóncica, sino a un proceso de remodelación óseo fisiológico. Por lo tanto no existía ningún proceso de hipercalcemia, y la calcitonina se mantuvo constante.

En el lado de tensión, donde ocurría un proceso de aposición ósea, no se produjo ningún cambio significativo en las concentraciones de

calcitonina. Probablemente esto se explique porque el proceso de aposición ósea está regulado por otros mecanismos en los cuales la calcitonina no tiene ninguna función, puesto que no se produce un estado de hipercalcemia, y por lo tanto no se estimula la producción de calcitonina.

En el lado de compresión se halló un incremento significativo en los niveles de calcitonina del diente experimental en el intervalo de tiempo comprendido entre 1 hora a 7 días después de la aplicación de fuerzas ortodóncicas. Este incremento fue probablemente debido a un cambio en la homeostasis del calcio en el hueso inducido por las fuerzas ortodóncicas. En otras palabras, un incremento en los niveles de calcio en el suero en el lado de compresión, donde se produce un proceso de reabsorción, podría provocar un incremento inmediato en la liberación de calcitonina.

A partir de los 7 días hasta los 15 días, la calcitonina se mantuvo constante o incluso disminuyó ligeramente en el lado de compresión; ésto puede deberse a que se para el proceso de reabsorción inicial y empieza un proceso de aposición en un estadio más posterior. Estas fluctuaciones podrían explicarse por las actividades biológicas de la calcitonina, que incluyen bajar las concentraciones de calcio del suero en estados de incremento marcado de la reabsorción ósea, principalmente por inhibir la actividad de reabsorción ósea de los osteoclastos (Marzia et al., 2006; Nakamura et al., 2005; Turner et al., 2011).

Los niveles de calcitonina medidos mediante la técnica de Western-blot se expresaron como la cantidad total de calcitonina contenida en una muestra tomada durante 30 segundos, al igual que otros autores que también usaron cantidades totales contenidas en una muestra tomada durante 30 segundos en lugar de concentraciones de parámetros bioquímicos debido a los problemas inherentes en la determinación precisa del volumen de fluido crevicular (Giannopoulou et al., 2006). No obstante, no podemos descartar que el incremento en el porcentaje en los niveles de calcitonina encontrado estuviera influenciado por un incremento potencial



en el volumen de fluido crevicular gingival asociado al tratamiento ortodóncico (Samuels et al., 1993).

El hueso es un tejido complejo que se remodela continuamente a través de la reabsorción de hueso antiguo dañado por los osteoclastos y la subsecuente formación de hueso nuevo por los osteoblastos. El sistema OPG/RANKL/RANK juega un papel crucial en esta remodelación ósea (Chen et al., 2012).

El receptor activador para el factor nuclear KB (RANK) es un péptido de 616 aminoácidos que se encuentra en la superficie celular de precursores de los osteoclastos. El ligando de receptor activador para el factor nuclear KB (RANKL) es un péptido de 317 aminoácidos que está producido por células de linaje osteoblástico y células T activadas. La osteoprotegerina (OPG) representa una proteína de 380 aminoácidos que es secretada por células osteoblásticas y de otros linajes. Se conocen dos tipos de receptores para RANKL: RANK y OPG.

Las mayores acciones biológicas de la OPG son la inhibición de la diferenciación de los osteoclastos, inhibición de la función reabsortiva de los osteoclastos y la estimulación de la apoptosis de los osteoclastos, ya que actúa como un receptor de unión de RANKL inhibiendo la interacción entre RANKL y su receptor RANK en la superficie de los osteoclastos. La diferenciación y activación de las células precursoras de osteoclastos en osteoclastos maduros requiere la unión de RANKL a RANK. El papel de RANKL es promover la formación, fusión, diferenciación, activación y supervivencia de los osteoclastos, además de mejorar la reabsorción ósea.

Diferentes estudios clínicos han mostrado la presencia de RANKL Y OPG en el fluido crevicular gingival durante movimientos dentales ortodóncicos. Entre éstos se encuentra el estudio de Toygar et al. (2008), que confirmaron la presencia de OPG en el fluido crevicular gingival en pacientes con aparatología ortodóncica y concluyeron que la OPG es uno de

los mediadores clave responsable de la remodelación ósea alveolar durante el movimiento dental ortodónico.

El sistema OPG/RANKL/RANK regula la remodelación ósea en el movimiento dental ortodónico. Una fuerza de tensión induce un incremento dependiente de magnitud en la síntesis de OPG y una disminución asociada en la expresión de RNAm de RANKL y liberación de RANKL de los osteoblastos. En resumen, la relativa expresión de OPG y RANKL en los lados de compresión y tensión en los dientes regula la remodelación ósea durante el movimiento dental ortodónico (Tyrovola et al., 2008).

Los papeles multifuncionales de RANK, OPG y RANKL quizás proporcionen una importante conexión entre la remodelación ósea, el movimiento dental ortodónico y la reabsorción de la raíz junto a otras condiciones locales y sistémicas (Yamaguchi, 2009).

Además de la regulación de la reabsorción ósea en el lado de compresión mediante el sistema RANKL-RANK-OPG, descrito en la literatura, por los resultados de nuestro estudio podemos decir que la calcitonina también interviene en situaciones de hipercalcemia tal y como ocurre en el lado de compresión cuando se aplica una fuerza ortodónica. Así pues la calcitonina también jugaría un papel importante en el proceso bioquímico implicado en el movimiento dentario ortodónico.

VI.1.3. Relación entre los niveles de calcitonina en el fluido crevicular y la intensidad de dolor percibida

La calcitonina también tiene propiedades analgésicas, especialmente en el dolor óseo (Blau and Hoehns, 2003; Knopp-Sihota et al., 2012; Ofluoglu et al., 2007), pero su mecanismo analgésico todavía no está bien definido.



Otro objetivo de nuestro estudio era investigar la posible relación entre los niveles de calcitonina presentes en el fluido crevicular y el grado de discomfort/dolor percibido por el paciente, relativo a una posible función analgésica de la calcitonina.

Nuestros resultados muestran que la mayor intensidad de dolor dental fue percibida a las 24 horas del inicio del tratamiento ortodóncico, de modo similar a los resultados de estudios previos de igual temática (Giannopoulou et al., 2006; Luppapanornlarp et al., 2010; Polat and Karaman, 2005). Como novedad, en el presente estudio se introdujo una tarea funcional en la evaluación del dolor dental percibido: apretar un rollo de algodón. En este caso se encontró una asociación negativa entre los niveles de calcitonina y los cambios en las puntuaciones del dolor del VAS en los dientes experimentales en el periodo comprendido entre las 24h y los 15 días tras la aplicación de fuerzas ortodóncicas. Estos resultados indicaron que, cuando los niveles de calcitonina alcanzan su máximo pico, el dolor dental disminuye.

La calcitonina necesita alcanzar una determinada concentración para ejercer su efecto analgésico, esta concentración debería determinarse en estudios posteriores (Knopp et al., 2005).

Estos resultados podrían reflejar un efecto analgésico de la calcitonina en el dolor dental inducido ortodóncicamente, pero el mecanismo por el cual se produce este efecto todavía no está aclarado.

Como se mencionó en el apartado de introducción se han propuesto tres hipótesis para explicar este efecto analgésico de la calcitonina. Una acción central (Azria, 2002; Nakamoto et al., 2000), posiblemente debida a una acción moduladora de la calcitonina sobre las corrientes de calcio voltaje dependientes, a nivel neuronal (Hagenacker et al., 2011); tal vez sea una de las hipótesis más importantes. Otra opción es una estimulación de la liberación de β -endorfinas al plasma en la glándula pituitaria (Franceschini

et al., 1989; Ofluoglu et al., 2007; Pecile, 1992), que reduce el dolor óseo durante un periodo corto de tiempo. La hipótesis más antigua es que inhibe la síntesis de PGE₂ y tromboxano (Ceserani et al., 1979; Pecile, 1992). En otros estudios sobre el dolor dental ortodóncico, la intensidad inicial de dolor (1 hora después del inicio del tratamiento ortodóncico) estaba asociada con niveles incrementados de PGE₂ en el fluido crevicular, y el incremento de IL-1 β en el fluido crevicular estaba asociado con una intensidad de dolor 1 día después del inicio del tratamiento ortodóncico (Giannopoulou et al., 2006; Luppanapornlarp et al., 2010).

A medida que se avanza en la investigación sobre el efecto analgésico de la calcitonina se confirma que la calcitonina tiene un efecto analgésico posiblemente mediado a través de las β -endorfinas (aumento de los niveles de β -endorfinas en el plasma) y de la modulación central de la percepción del dolor, probablemente por receptores de unión de la calcitonina en el sistema nervioso central (Knopp et al., 2005; Hamdy and Daley, 2012).

VI.2. DISCUSIÓN DEL ESTUDIO 2-ESTUDIO PILOTO

El principal objetivo de este estudio fue el análisis de los niveles de calcitonina en saliva durante los estadios iniciales del tratamiento ortodóncico con aparatología fija. Este objetivo se estableció tras haber evaluado la presencia y los cambios en los niveles de calcitonina en fluido crevicular en dientes sometidos a movimiento dentario ortodóncico, analizando tanto el lado de tensión como el de compresión.

En el seno de la misma línea de investigación nos propusimos investigar si tales cambios en los niveles de calcitonina podrían manifestarse también en la saliva, que es un medio más accesible con fines tanto de investigación como de una posible aplicación clínica posterior.

La saliva es un fluido que está ganando popularidad en el análisis de numerosas sustancias, con la ventaja de que la concentración de múltiples



factores que se encuentran en los niveles plasmáticos, también se encuentran en ella. La recogida de muestras de saliva es un método no invasivo, fácil, rápido y que no requiere una formación especializada por parte del personal encargado de su toma. Pese a ello, hay un número muy limitado de estudios que valoren la saliva como un método de diagnóstico ideal (Alvarez-Sanchez et al., 2012).

La saliva constituye actualmente un fluido de referencia para estandarizar nuevos biomarcadores que reflejen algunos fenómenos fisiológicos como la inflamación de los tejidos paradentales, el movimiento dentario o la capacidad de reacción al ataque de los radicales libres. Todas estas cuestiones son de gran interés en ortodoncia.

En algunas investigaciones incluso se propone el análisis de la saliva como alternativa para el diagnóstico de algunas enfermedades, como elemento para monitorizar la evolución de determinadas patologías o la dosificación de medicamentos. Boras et al., (2010) midieron los niveles del gen de la calcitonina asociado al síndrome de boca ardiente en saliva y sangre, concluyendo que los niveles eran idénticos en ambos medios.

Otros estudios semejantes también miden diferentes sustancias en saliva en relación con el tratamiento ortodóncico. Alarcón et al., (2012) midieron los niveles de Oxido Nítrico (ON) en saliva, justificado porque otros autores habían comunicado en sus publicaciones que el ON es producido por los osteocitos y es un importante regulador de la actividad de remodelación ósea (Tang et al., 2009). Concluyeron que, en este caso, los niveles de ON en saliva podrían constituir un indicador indirecto del grado de movimiento dentario.

En otro estudio de diseño similar se evaluaron los niveles de melatonina en saliva durante el primer mes de tratamiento ortodóncico. Los resultados demostraron el aumento de la melatonina en mujeres adultas jóvenes a las 24 horas de iniciar el tratamiento de ortodoncia con

aparatología fija, y a partir de ahí, se mantenían estables. Los trabajos más recientes sobre este tema, apuntan a la capacidad de la melatonina para mejorar la osteointegración de implantes dentales endoóseos y su efecto protector frente a la enfermedad periodontal (Cutando et al., 2008; Gomez-Moreno et al., 2007).

Nuestros resultados se limitan a lo que acontece en pacientes adultos jóvenes, pues se llevó a cabo en varones de edades comprendidas entre los 20 y 35 años. La edad es un factor que influye en el movimiento ortodóncico dentario. Esto es debido a que al aumentar la edad la actividad celular disminuye y los tejidos se hacen más ricos en colágeno, afectando la respuesta de los tejidos adultos a las fuerzas ortodóncica. Por consiguiente, los tejidos periodontales en individuos jóvenes reaccionen más rápidamente a la carga ortodóncica que los tejidos periodontales del adulto. Con el diseño experimental desarrollado no podemos saber si se obtendrían resultados similares en niños.

Todos los pacientes de nuestro estudio mantuvieron una buena higiene oral a lo largo del periodo evaluado, tal como reflejan los índices de placa, gingival y de sangrado al sondaje. Así pues, los hipotéticos cambios registrados en los niveles de calcitonina no se verían afectados por estos parámetros ligados a la presencia de placa bacteriana.

Los resultados obtenidos en el presente estudio piloto indican que la calcitonina no se detecta en saliva por medio de la técnica Western-blot ni antes ni durante los estadios iniciales del tratamiento ortodóncico con aparatología fija. Este resultado puede tener una doble explicación: que realmente no hay calcitonina en saliva, o a unos niveles tan bajos que incluso una técnica tan sensible como el análisis Western-blot es incapaz de detectarla, o bien que realmente la técnica empleada no es adecuada para la evaluación de los niveles de calcitonina en saliva. Dada la amplia literatura existente que avala las numerosas ventajas del análisis Western-blot nos inclinamos a pensar que no es una cuestión metodológica, sino que



realmente, la calcitonina no se expresa en el flujo salival. Ante estos resultados consideramos que la calcitonina en saliva no puede considerarse un biomarcador del remodelado óseo que acontece durante el movimiento dentario ortodóncico, aunque es necesario realizar más estudios en los cuales el grupo control y experimental sean más amplios para confirmar nuestros resultados del estudio piloto. Así pues las investigaciones sobre calcitonina en relación al proceso de remodelación ósea que acontece a nivel alveolar durante el movimiento dentario ortodóncico, quizás deberían centrarse más en el estudio del fluido crevicular, donde la calcitonina si se expresa a niveles suficientes como para permitir su análisis.



Capítulo 7

CONCLUSIONES



Tras analizar los resultados obtenidos hemos llegado a las siguientes conclusiones:

1. La calcitonina está presente en el fluido crevicular gingival y puede detectarse y cuantificarse mediante la técnica de Western-blot.
2. Los niveles de calcitonina en el fluido crevicular gingival aumentaron significativamente en el lado de compresión en el periodo comprendido entre 1 hora y 7 días después de la aplicación de fuerzas ortodóncicas. Por el contrario, en el lado de tensión no se detectaron cambios en los niveles de calcitonina.
3. El aumento en los niveles de calcitonina en el lado de compresión mostró una asociación negativa con la intensidad de dolor percibida por el paciente durante el apretamiento con rollo de algodón en el periodo comprendido entre 24 horas y 15 días después de la aplicación de fuerzas ortodóncicas.
4. La calcitonina no se expresa en la saliva, o al menos, no en cantidades suficientes como para poder ser detectadas por la técnica de Western-blot. La saliva no puede considerarse, por tanto, un medio adecuado para el análisis de los cambios en los niveles de calcitonina durante las primeras fases del movimiento dentario ortodóncico, mediante esta técnica.



Capítulo 8

BIBLIOGRAFÍA



Alarcón JA, Martín C, Nuñez A, Aguilar-Salvatierra A, Guardia J, Gómez-Moreno G (2012). Nitric oxide levels in saliva during early orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 91 (Spec Iss B): 1217.

Alvarez-Sanchez B, Priego-Capote F, Luque de Castro MD (2012). Study of sample preparation for metabolomic profiling of human saliva by liquid chromatography-time of flight/mass spectrometry. *J Chromatogr A* 1248: 178-181.

Aznan K, Khan M, Benson PE (2007). Gingival temperature measurements with fluoride and nonfluoride elastomeric ligatures. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 131 (3): 378-383.

Azria M (2002). Possible mechanisms of the analgesic action of calcitonin. *Bone* 30 (5 Suppl): 80S-83S.

Bergius M, Berggren U, Kiliaridis S (2002). Experience of pain during an orthodontic procedure. *Eur J Oral Sci* 110 (2): 92-98.

Blau LA, Hoehns JD (2003). Analgesic efficacy of calcitonin for vertebral fracture pain. *Ann Pharmacother* 37 (4): 564-570.

Boras VV, Savage NW, Brailo V, Lukac J, Lukac M, Alajbeg IZ (2010). Salivary and serum levels of substance P, neurokinin A and calcitonin gene related peptide in burning mouth syndrome. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 15 (3): e427-431.

Campanella, Bramanti E (2014). Detection of proteins by hyphenated techniques with endogenous metal tags and metal chemical labelling. *Analyst*. Jun (in press).

Ceserani R, Colombo M, Olgiati VR, Pecile A (1979). Calcitonin and prostaglandin system. *Life Sci* 25 (21): 1851-1855.

Cutando A, Gómez-Moreno G, Arana C, Muñoz F, Lopez-Peña M, Stephenson J, Reiter RJ (2008). Melatonin stimulates osteointegration of dental implants. *J Pineal Res* 45 (2): 174-179.



Chen J, He JQ, Zhen SY, Huang LQ (2012). OPG inhibits gene expression of RANK and CAII in mouse osteoclast-like cell. *Rheumatol Int* 32 (12): 3993-3998.

Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF (2007). Saliva specimen: a new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 383 (1-2): 30-40.

Davidovitch Z, Krishnan V (2008). Adverse effects of orthodontics: a report of 2 cases. *World J Orthod* 9 (3): e18-31.

de Paula FJ, Rosen CJ (2010). Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling. *Horm Metab Res* 42 (5): 299-306.

Del Fattore A, Teti A, Rucci N (2012). Bone cells and the mechanisms of bone remodelling. *Front Biosci (Elite Ed)* 4: 2302-2321.

Dilsiz A, Kilic N, Aydin T, Ates FN, Zihni M, Bulut C (2010). Leptin levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod* 80 (3): 504-508.

Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C (2006). Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci* 114 (5): 416-422.

Elliott S, Sinclair A, Collins H, Rice L, Jelkmann W (2014). Progress in detecting cell-surface protein receptors: the erythropoietin receptor example. *Ann Hematol* 93 (2): 181-192.

Ezzat BA (2010). Validity of prevention of glucocorticoid-induced alveolar bone loss in rat by either calcitonin or alendronate administration. *Arch Oral Biol* 55 (10): 788-796.

Feng X, McDonald JM (2011). Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol* 6: 121-145.



Florez-Moreno GA, Marin-Restrepo LM, Isaza-Guzman DM, Tobon-Arroyave SI (2012). Screening for salivary levels of deoxypyridinoline and bone-specific alkaline phosphatase during orthodontic tooth movement: a pilot study. *Eur J Orthod* 35 (3): 361-368.

Franceschini R, Cataldi A, Barreca T, Salvemini M, Rolandi E (1989). Plasma beta-endorphin, ACTH and cortisol secretion in man after nasal spray administration of calcitonin. *Eur J Clin Pharmacol* 37 (4): 341-343.

George A, Evans CA (2009). Detection of root resorption using dentin and bone markers. *Orthod Craniofac Res* 12 (3): 229-235.

Giannopoulou C, Dudic A, Kiliaridis S (2006). Pain discomfort and crevicular fluid changes induced by orthodontic elastic separators in children. *J Pain* 7 (5): 367-376.

Gómez-Moreno G, Cutando-Soriano A, Arana C, Galindo P, Bolaños J, Acuña-Castroviejo D, Wang HL (2007). Melatonin expression in periodontal disease. *J Periodontal Res* 42 (6): 536-540.

Hagenacker T, Ledwig D, Büsselberg D (2011). Additive inhibitory effects of calcitonin and capsaicin on voltage activated calcium channel currents in nociceptive neurones of rat. *Brain Res Bull* 85 (1-2): 75-80.

Hamdy RC, Daley DN (2012). Oral calcitonin. *Int J Womens Health* 4:471-479.

Holliday LS, Ostrov DA, Wronski TJ, Dolce C (2009). Osteoclast polarization and orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 12 (2): 105-112.

Iwasaki LR, Chandler JR, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC (2009). IL-1 gene polymorphisms, secretion in gingival crevicular fluid, and speed of human orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 12 (2): 129-140.

Jensen EC (2012). The basics of western blotting. *Anat Rec (Hoboken)* 295 (3): 369-371.



Karsdal MA, Byrjalsen I, Riis BJ, Christiansen C (2008a). Investigation of the diurnal variation in bone resorption for optimal drug delivery and efficacy in osteoporosis with oral calcitonin. *BMC Clin Pharmacol* 8: 12.

Karsdal MA, Henriksen K, Arnold M, Christiansen C (2008b). Calcitonin: a drug of the past or for the future? Physiologic inhibition of bone resorption while sustaining osteoclast numbers improves bone quality. *BioDrugs* 22(3):137-144.

Kereshanan S, Stephenson P, Waddington R (2008). Identification of dentine sialoprotein in gingival crevicular fluid during physiological root resorption and orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* 30 (3): 307-314.

Knopp-Sihota JA, Newburn-Cook CV, Homik J, Cummings GG, Voaklander D (2012). Calcitonin for treating acute and chronic pain of recent and remote osteoporotic vertebral compression fractures: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporos Int* 23 (1): 17-38.

Knopp JA, Diner BM, Blitz M, Lyritis GP, Rowe BH (2005). Calcitonin for treating acute pain of osteoporotic vertebral compression fractures: a systematic review of randomized, controlled trials. *Osteoporos Int.* 16 (10): 1281-1290.

Lee JM, Garon E, Wong DT (2009). Salivary diagnostics. *Orthod Craniofac Res* 12 (3): 206-211.

Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L (1986). A modified gingival index for use in clinical trials. *Clin Prev Dent* 8 (1): 3-6.

Luppanapornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J (2010). Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *Eur J Orthod* 32 (5): 596-601.

Martín-Lacave I, Borrero MJ, Utrilla JC, Fernández-Santos JM, de Miguel M, Morillo J, Guerrero JM, García-Marín R, Conde E (2009). C cells evolve at the same rhythm as follicular cells when thyroidal status changes in rats. *J Anat* 214 (3): 301-309.



Martin TJ, Udagawa N (1998). Hormonal regulation of osteoclast function. *Trends Endocrinol Metab* 9 (1): 6-12.

Marzia M, Chiusaroli R, Neff L, Kim NY, Chishti AH, Baron R, Horne WC (2006). Calpain is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin. *J Biol Chem* 281 (14): 9745-9754.

Miller CS, Foley JD, Bailey AL, Campell CL, Humphries RL, Christodoulides N, Floriano PN, Simmons G, Bhagwandin B, Jacobson JW, Redding SW, Ebersole JL, McDevitt JT (2010). Current developments in salivary diagnostics. *Biomark Med* 4 (1): 171-189.

Morillo-Bernal J, Fernandez-Santos JM, Utrilla JC, de Miguel M, Garcia-Marin R, Martin-Lacave I (2009). Functional expression of the thyrotropin receptor in C cells: new insights into their involvement in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. *J Anat* 215 (2): 150-158.

Mühlemann HR, Son S (1971). Gingival sulcus bleeding--a leading symptom in initial gigivitis. *Helv odontol Acta* 15 (2): 107-113.

Nakamoto H, Soeda Y, Takami S, Minami M, Satoh M (2000). Localization of calcitonin receptor mRNA in the mouse brain: coexistence with serotonin transporter mRNA. *Brain Res Mol Brain Res* 76 (1): 93-102.

Nakamura H, Nagaoka N, Hirata A, Inoue M, Ozawa H, Yamamoto T (2005). Distribution of actin filaments, non-muscle myosin, M-Ras, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in osteoclasts after calcitonin administration. *Arch Histol Cytol* 68 (2): 143-150.

Ofluoglu D, Akyuz G, Unay O, Kayhan O (2007). The effect of calcitonin on beta-endorphin levels in postmenopausal osteoporotic patients with back pain. *Clin Rheumatol* 26 (1): 44-49.

Otasevic M, Naini FB, Gill DS, Lee RT (2006). Prospective randomized clinical trial comparing the effects of a masticatory bite wafer and avoidance of hard food



on pain associated with initial orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 130 (1): 6.e9-15.

Pan C, Lan X, Chen H, Bishop CE (2010). An economical single-sided antibody incubation method for Western blotting. *J Virol Methods* 169 (2): 409-411.

Pecile A (1992). Calcitonin and relief of pain. *Bone Miner* 16 (3): 187-189.

Polat O, Karaman AI (2005). Pain control during fixed orthodontic appliance therapy. *Angle Orthod* 75 (2): 214-219.

Qin H, Yang FS (2008). Calcitonin may be a useful therapeutic agent for osteoclastogenesis syndromes involving premature eruption of the tooth. *Med Hypotheses* 70 (5): 1048-1050.

Qin H, Cai J, Xu H, Gong Y (2009). Inhibition of Behcet's disease by calcitonin. *Med Hypotheses* 73 (1): 24-26.

Ren Y, Vissink A (2008). Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci* 116 (2): 89-97.

Rhee SH, Kang J, Nahm DS (2009). Cystatins and cathepsin B during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 135 (1): 99-105.

Samuels RH, Pender N, Last KS (1993). The effects of orthodontic tooth movement on the glycosaminoglycan components of gingival crevicular fluid. *J Clin Periodontol* 20 (5): 371-377.

Sari E, Kadioglu O, Ucar C, Altug HA (2009). Prostaglandin E2 levels in gingival crevicular fluid during tooth- and bone-borne expansion. *Eur J Orthod* 32 (3): 336-341.

Silness J, Loe H (1964). Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Apta Odontol Scand* 22: 121-135.



Tang Y, Wu X, Lei W, Pang L, Wan C, Shi Z, Zhao L, Nagy TR, Peng X, Hu J, Feng X, Van Hul W, Wan M, Cao X (2009). TGF-beta1-induced migration of bone mesenchymal stem cells couples bone resorption with formation. *Nat Med* 15 (7): 757-765.

Toygar HU, Kircelli B.H, Bulut S, Sergin N, Tasdelen B (2008). Osteoprotegerin in gingival crevicular fluid under long-term continuous orthodontic force application. *Angle Orthod* 78 (6): 988-993.

Turner AG, Tjahyono F, Chiu WS, Skinner J, Sawyer R, Moore AJ, Morris HA, Findlay DM, Zajac JD, Davey RA (2011). The role of the calcitonin receptor in protecting against induced hypercalcemia is mediated via its actions in osteoclasts to inhibit bone resorption. *Bone* 48 (2): 354-361.

Tyrovola JB, Spyropoulos MN, Makou M, Perrea D (2008). Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci* 50 (4): 367-376.

Uematsu S, Mogi M, Deguchi T (1996). Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 75 (1): 562-567.

Uribe F, Kalajzic Z, Bibko J, Nanda R, Olson C, Rowe D, Wadhwa S (2011). Early effects of orthodontic forces on osteoblast differentiation in a novel mouse organ culture model. *Angle Orthod* 81 (2): 284-291.

Vaananen HK, Zhao H, Mulari M, Halleen JM (2000). The cell biology of osteoclast function. *J Cell Sci* 113 (Pt 3): 377-381.

Visser EJ, Kwei PL (2006). Salmon calcitonin in the treatment of post herpetic neuralgia. *Anaesth Intensive Care* 34 (5): 668-671.

Wise GE, King GJ (2008). Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res* 87 (5): 4.

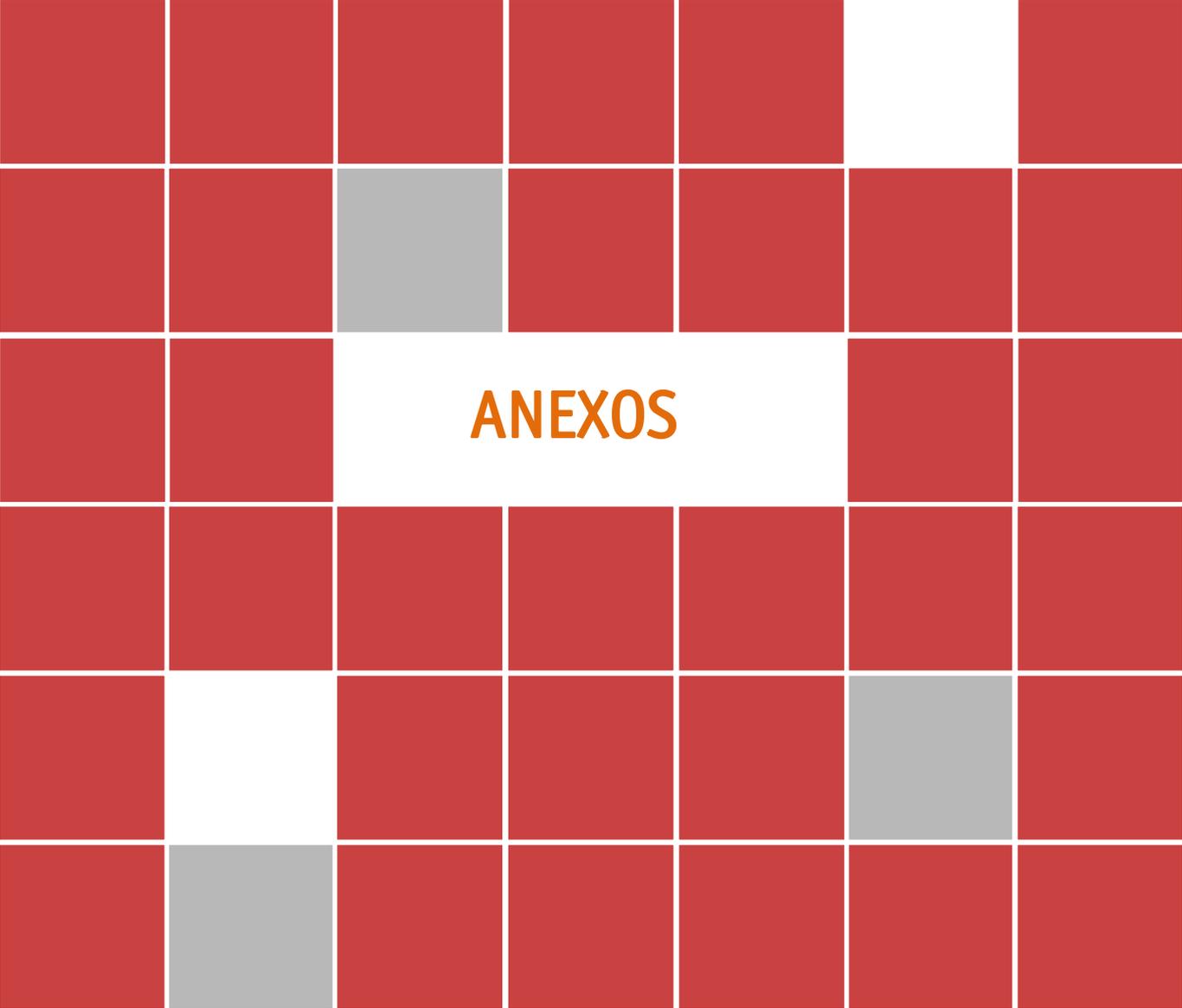


Xie R, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC (2008). Osteoclast differentiation during experimental tooth movement by a short-term force application: An immunohistochemical study in rats. *Acta odontol scand* 66 (5): 314-320.

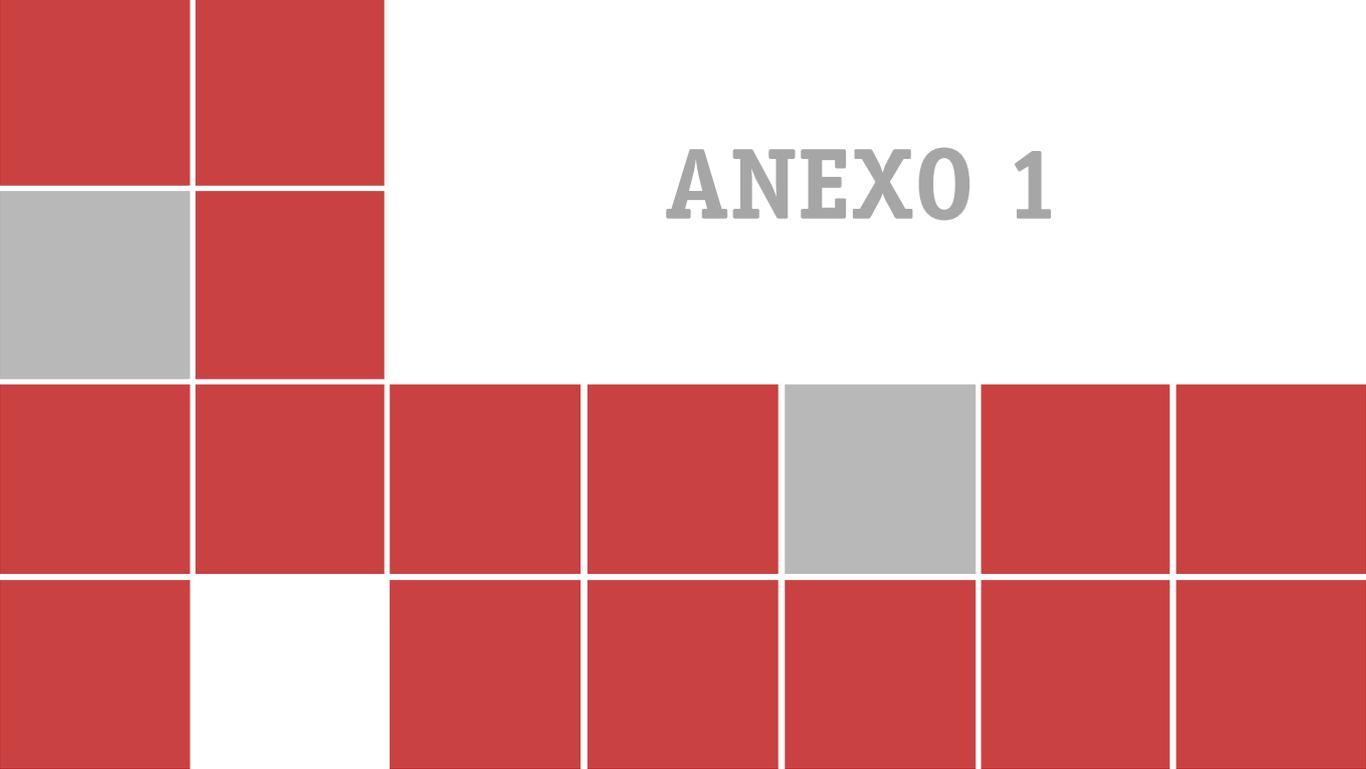
Yamaguchi M (2009). RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 12 (2): 113-119.

Yee JA, Turk T, Elekdag-Turk S, Cheng LL, Darendeliler MA (2009). Rate of tooth movement under heavy and light continuous orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 136 (2): 150. e1-9.

Zlotorynski E (2014). Technique: Single-cell western blotting. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15 (7): 429.



ANEXOS

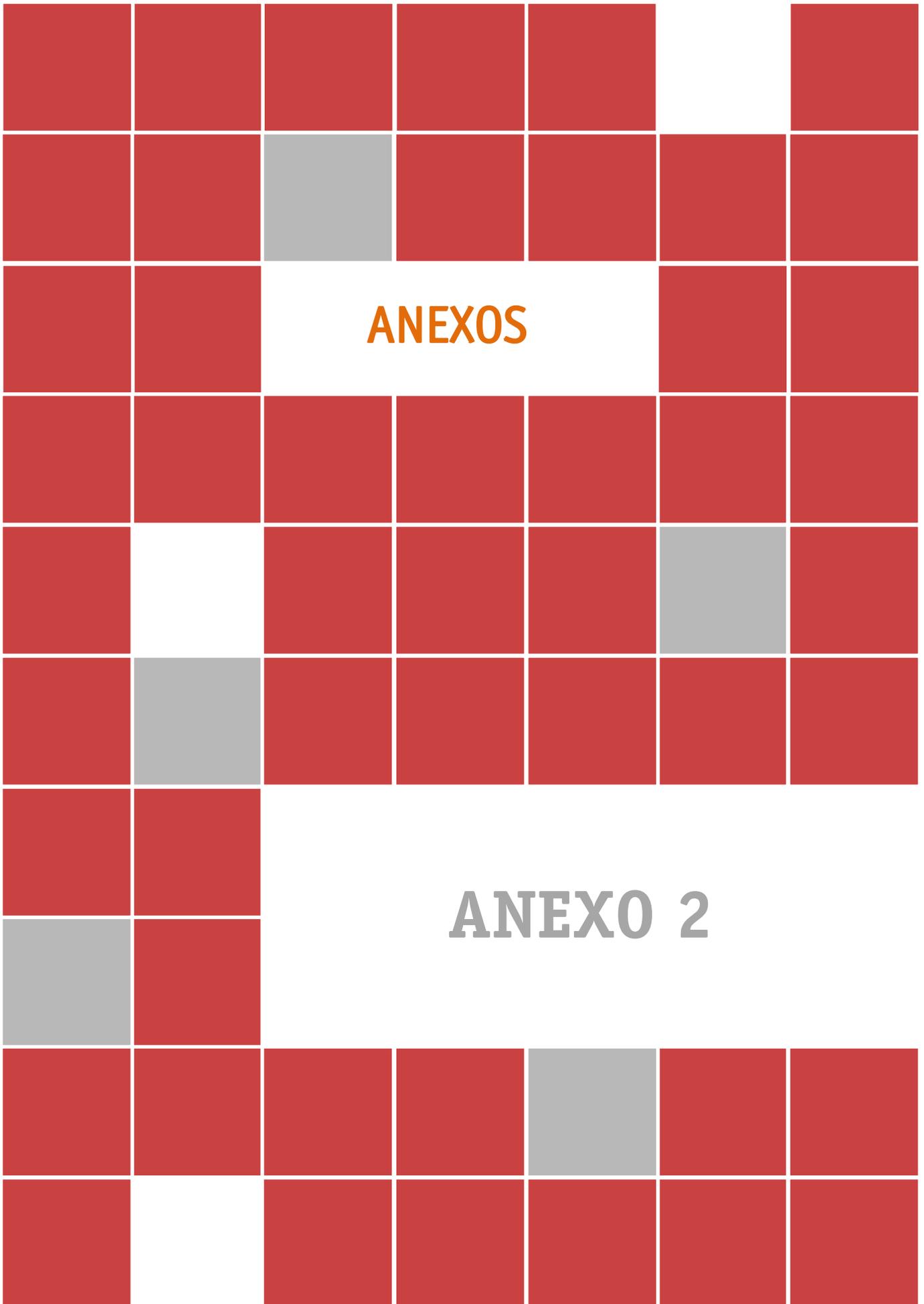


ANEXO 1



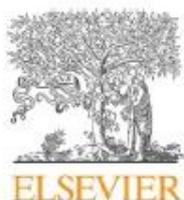
Las abreviaturas utilizadas en esta memoria son:

- **IL-1 β** : Interleucina 1- β eta
- **IL-6**: Interleucina 6
- **IL-8**: Interleucina 8
- **TNF- α** : Factor de necrosis tumoral alfa
- **M-CSF**: Factor estimulante de colonias de monocitos/macrófagos
- **G-CSF**: Factor estimulante de colonias de granulocitos
- **GM-CSF**: Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
- **CRP**: Proteína C reactiva
- **MMP-8**: Matriz metaloproteinasa-8
- **OPG**: Osteoprotegerina
- **ICTP**: Telopéptido C-terminal del colágeno I
- **VIH**: Virus de la inmunodeficiencia humana
- **GRP**: Péptido regulador de gastrina
- **TRH**: Hormona liberadora de tirotropina
- **CGRP**: Péptido relacionado con el gen de la calcitonina
- **Tris-HCL**: Hidrocloruro o forma ácido de tris (trisaminometano)
- **Tris**: Trisaminometano
- **HCl**: Ácido clorhídrico
- **SDS**: Dodecilsulfato sódico
- **TEMED**: Tetrametiletilendiamina
- **PBS**: Tampón fosfato salino



ANEXOS

ANEXO 2

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Calcitonin gingival crevicular fluid levels and pain discomfort during early orthodontic tooth movement in young patients

José Antonio Alarcón^{a,*}, Dolores Linde^a, Germán Barbieri^b, Patricia Solano^b, Octavio Caba^c, María Judith Rios-Lugo^b, Mariano Sanz^b, Conchita Martín^d

^a Department of Stomatology, Section of Orthodontics, Faculty of Odontology, University of Granada, Granada, Spain

^b Department of Stomatology III, Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

^c Department of Health Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain

^d Department of Stomatology IV, Section of Orthodontics, Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 1 October 2012

Keywords:

Calcitonin
Gingival crevicular fluid
Orthodontic movement
Dental pain
Western blot

ABSTRACT

Objectives: To investigate the previously unreported presence of calcitonin (CT) levels in gingival crevicular fluid (GCF), its variations during initial orthodontic tooth movement in both tension and compression sites, and its possible association with the experienced dental pain.

Design: Fifteen children (mean age: 12.6 years) requiring orthodontic closure of the upper midline diastema were included. We collected GCF from the compression and tension sites of the upper right central incisor (experimental) and first bicuspid (control), before and after (1 h, 24 h, 7 d, 15 d) beginning of treatment. Calcitonin levels were determined by Western blot. Pain intensity was assessed using a visual analogue scale.

Results: Calcitonin levels were higher in the compression site versus the control site at 7 d ($p = 0.014$). Intragroup comparisons showed an increment of CT between 1 h and 7 d (680.81 ± 1672.60 pg/30 s, $p = 0.010$) in the compression site. No significant changes were found in the tension and control sites. Calcitonin levels and pain intensity were negatively associated during the period from 24 h to 15 d ($r = -0.54$, $p = 0.05$).

Conclusions: CT levels in the GCF significantly increased in the compression site after the short term after application of orthodontic forces. These changes were negatively associated with the perceived patient's dental pain during the period from 24 h to 15 d.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Calcitonin (CT), a 32-amino acid polypeptide hormone produced by C-cells of the thyroid gland, is involved in bone homeostasis. Calcitonin binds to a 7-membrane-spanning array G protein-coupled receptor with calcium acting as

secondary messenger. This receptor is frequently located in osteoclasts, renal tubular, and neural cells, in response to a rise in blood calcium levels, CT is released and decreases these levels, mainly through the inhibition of osteoclast-mediated bone resorption,¹ the decrease of calcium tubular reabsorption,² and the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 production in the kidney.³ In vitro and in vivo studies have shown

* Corresponding author at: Department of Stomatology, Faculty of Odontology, University of Granada, Campus Universitario de Cartuja, s/n 18071, Granada, Spain. Tel.: +34 958201480; fax: +34 958201480.

E-mail address: jalarcon@ugr.es (J.A. Alarcón).

0003-9969/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.10.002>

that CT has a potent inhibitory effect on osteoclasts, where it inhibits cell motility, actin ring formation, and bone resorptive mechanisms.^{4,5}

Calcitonin also has analgesic properties, especially on bone-related pain,^{6–8} although its mechanism of action remains unclear. Three hypotheses have been proposed to explain this powerful analgesic effect: a direct central nervous system action involving calcitonin-binding receptors,^{9,10} a peripheral mechanism inhibiting the synthesis of PGE₂ and thromboxane,^{11,12} and an increase in plasma β-endorphin levels.^{7,11,13}

Orthodontic tooth movement takes place by a combination of bone apposition in the tension side and bone resorption in the compression side after the application of mechanical forces on teeth.^{14,15} During this biological process, many biochemical markers, either related with bone resorption (e.g. IL-1β, IL-6, IL-8, TNF-α, substance P, NTx, and β-glucuronidase) or with bone formation (e.g. osteocalcin and leptin) can be found in the gingival crevicular fluid (GCF).^{16–20} Analysis of the GCF can also reveal information on the cellular response of the surrounding periodontal ligament and bone metabolic changes that occur during orthodontic treatment.

Although CT actively intervenes in bone metabolism and is secreted under conditions of increasing bone resorption,² to our knowledge, the CT levels in GCF during orthodontic tooth movement have not been investigated. It is, therefore, the aim of this investigation: (1) to assess whether CT can be detected in the GCF of both the tension and compression sides of teeth under orthodontic movement; (2) to measure CT levels during the early phase of orthodontic movement; and (3) to find possible associations between the CT levels in GCF and the patient's perceived intensity of pain during orthodontic tooth movement.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Fifteen young patients (8 female and 7 male; mean age: 12.6 years) presenting an upper midline diastema and requiring orthodontic treatment participated in this study. All of the patients met the following criteria: aged 10–15 years; presence of an upper midline diastema ≥ 1.5 mm; in good general and oral health; without evidence of periodontal or gingival disease, as demonstrated by presence of probing depths ≤ 3 mm, and no radiographic evidence of bone loss; and without a record of antibiotic therapy within the last 6 months, or chronic anti-inflammatory drug medication in the month preceding the study. The parents of all patients were informed on the characteristics of the study and agreed for their children to participate by signing an EC-approved informed consent form.

The sample size was estimated from data obtained in a similar clinical study evaluating the biomarkers IL-1β, substance P and PGE₂.¹⁸ Under the assumption of a mean difference of 0.10 pg at the 20 s sample and an expected pooled standard deviation of 0.05, a sample size of 12 patients provided a power of 0.8.

2.2. Study des

Two weeks before the start of the study, each participant received prophylaxis and oral hygiene instructions. All participants indicated their willingness to adhere strictly to these instructions. Patients were instructed not to take any medications, including non-steroidal anti-inflammatory drugs, during the study period. Plaque control and motivation were performed during the whole study.

Brackets (0.022 × 0.028 in. Mini Master, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA) were placed on the buccal surface of the upper central incisors. The upper midline diastema was closed orthodontically by applying a force of 100 g with a pre-stretched elastomeric chain (Memory chain, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA). The elastomeric chain was activated and tied at one of the two braces using a 0.008-in. ligature wire once the 100 g force activation was achieved. The magnitude was adjusted to produce equivalent compressive stresses between subjects using an orthodontic dynamometer (YS-31D Push pull gauge, YDM CORPORATION, Saitama 355-0042, Japan). To reduce the occurrence of vertical aligning movements, no arch-wire was inserted in the bracket slot during this experiment.

The GCF was collected from the mesial (compression) and distal (tension) sites of the upper right central incisor (experimental) and from the mesial site of the right or left upper first bicuspid (control), just before (0 h, baseline) and after (1 h, 24 h, 7 d, and 15 d) from the start of the orthodontic treatment. At each appointment, the plaque index (PI),²¹ modified gingival index (GI)²² and bleeding on probing index (BOP)²³ were assessed in experimental, control, and adjacent teeth, just after GCF sampling.

Discomfort or pain was estimated by a visual analogue scale (VAS) at each moment of the study, previous to GCF sampling and assessment of periodontal indices.

2.3. GCF sampling

The GCF samples were taken with periopaper strips (Harco, Tustin, CA, USA). Selected teeth were isolated with cotton rolls, cleaned of plaque deposits, and dried gently with air. The paper strips were gently introduced subgingivally at 1 mm for 30 s. Each sample was placed in a centrifuge tube (Millipore Ultrafree-MC) and stored at –80 °C until analysis. The volume of the sample on the paper strips was measured using a calibrated Periotron 8000 (Harco). The readings from the Periotron were converted to an actual volume (microliters) by reference to the standard curve calibrated with human serum.

2.4. Calcitonin determination

The CT level in GCF from experimental and control teeth was analyzed by Western blot analysis with specific antibodies for CT. On the day of analysis, the periopaper was diluted in 100 μl of 1% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) and centrifuged at 12,500 rpm for 5 min. Proteins were separated by 10% sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

at 80 V for 2 h at room temperature and transferred to a nitrocellulose membrane (15 V at room temperature for 20 min). Blots were treated with blocking solution (PBS, 5% nonfat milk) for 1 h at room temperature and then reacted with a CT mouse monoclonal IgG1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:100 dilution overnight at 4 °C. Membranes were washed (10 min in 5% PBS) 3 times and incubated for 1 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted at 1:200.

Protein-antibody complexes were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Bonus, Amersham, Little Chalfont, UK). Relative amounts of CT were determined by densitometric analysis with Quantity One 1-D analysis software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). All of the GCF samples were run in duplicate. The levels of CT were reported as the total amount (in pg) per 30 s sample.

2.5. Evaluation of discomfort or pain

A baseline questionnaire-based interview was established to evaluate the previous experience of each patient with general and dental pain. Previous experience of general pain was evaluated with a 100-mm VAS, with two end-points, labelled "no pain" on the left and "worst pain" on the right.²⁴ The same scale was used to assess dental pain relative to previously experienced situations.

Discomfort or pain during the study period also was evaluated with VAS. Patients indicated their current level of spontaneous pain intensity and experienced pain while clenching with cotton rolls for the experimental and control teeth.

2.6. Statistical analysis

Longitudinal changes of GCF CT levels were expressed as percentages of baseline values (0 h). After testing for normality, repeated measures ANOVA with post hoc tests were used to compare differences between sites (tension, compression, and control) and to analyze intragroup differences between time points (1–24 h, 7 d, or 15 d; 24 h to 7 d or 15 d; and 7–15 d). Multiple linear regression analysis was performed to reveal correlations between the GCF CT level and pain intensity, and between pain intensity and previously experienced general and dental pain. SPSS 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis.

3. Results

All patients maintained good oral hygiene throughout the study. No significant changes in PI, GI, or BOP were found at any time point at any site.

Patients showed a central diastema that ranged from 1.5 to 2.4 mm (mean value: 1.86 mm, SD: 0.27 mm).

3.1. Longitudinal GCF CT changes

Table 1 shows descriptive statistics of CT levels, expressed as the total amount per 30-s sample, in the tension and compression sites of experimental teeth and in the mesial site of control teeth. A pronounced increase in percent CT levels was found from 1 h to 7 d in the compression site; these levels remained fairly stable in the tension and control sites (Fig. 1). Differences in longitudinal CT changes between sites, expressed as the percentage of the respective baseline values (0%), are shown in Table 2. A pronounced increment in the percent CT level in the compression site compared to the control site was detected at 7 d ($p = 0.014$). Intragroup comparisons also showed an increment of the percent CT levels between 1 h and 7 d (680.81 ± 1672.60 pg/30 s, $p = 0.010$) in the compression site. No significant percent differences were found between the tension and control sites over time (Table 3).

The volume of GCF samples ranged from 0.1 to 0.9 μ l. Differences between sites and time points were tested. No significant differences were found, although the pooled mean values at baseline (mean = 0.4 μ l; SD = 0.32 μ l) were slightly lower than during the study (mean = 0.67 μ l; SD = 0.48 μ l).

3.2. Evaluation of discomfort or pain

A questionnaire-based interview revealed that the strongest previously experienced general pain was associated with "spraining one's ankle", followed by "cutting one's finger". The strongest previously experienced dental pain was associated with "injection" and "drilling". Substantial inter-subject variation was observed for previously experienced general and dental pain.

Fig. 2 shows the evolution of mean VAS pain scores for experimental and control teeth throughout the study. In experimental teeth, spontaneous pain intensity increased from 1 h to 24 h, whereas pain intensity when clenching cotton rolls increased substantially from the application of orthodontic forces to 24 h. Pain intensity scores returned to

Table 1 – Descriptive statistics of calcitonin levels (pg per 30 s sample) at tension, compression and control sites throughout the study.

	Tension pg/30 s			Compression pg/30 s			Control pg/30 s		
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
Baseline	23.0	34.4	13.5	5.7	4.4	6.0	25.9	25.9	18.0
1 h	29.9	24.7	21.0	6.7	6.9	4.8	33.8	45.1	17.3
24 h	36.3	44.4	18.9	11.2	17.0	2.9	25.8	27.5	13.8
7 d	43.7	64.4	14.3	38.2	32.0	26.0	21.8	23.6	12.9
15 d	31.7	31.8	16.8	27.7	22.6	22.1	27.8	23.7	19.8

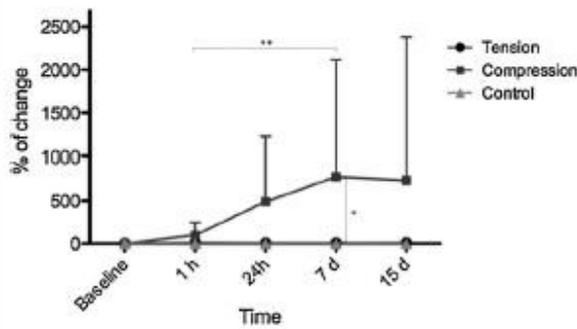


Fig. 1 – Evolution of mean calcitonin values at tension, compression, and control sites throughout the study ($p < 0.05$, $^{}p < 0.01$).**

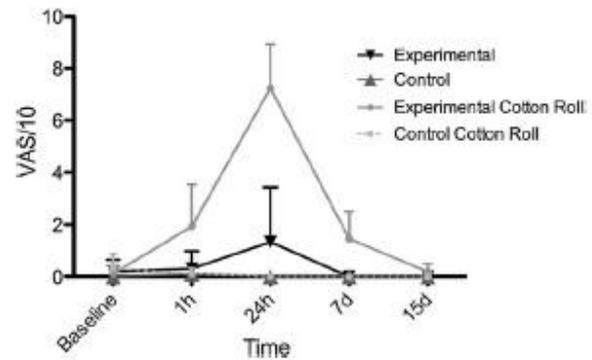


Fig. 2 – Evolution of mean VAS scores and standard error for each of the tested teeth.

initial values after 7 and 15 d, respectively. In contrast, VAS pain scores for control teeth did not change over time. No correlation between pain intensity during the study and previously experienced general and dental pain was found.

A negative association was found between the percent CT level increment and VAS scores of pain intensity changes during clenching with a cotton roll in the experimental tooth over the 24 h to 15 d period ($r = -0.54$, $p = 0.05$).

4. Discussion

This study aimed to investigate the previously unreported presence of CT levels in GCF, its variations during initial orthodontic tooth movement in both tension and compression sites, and its possible association with the experienced dental pain. This prospective case series has clearly shown that CT levels in the GCF can be measured using western blot biochemical analysis. Significant increases in percent CT

levels were found in the compression site from 1 h to 7 d after application of orthodontic forces. These changes in CT levels were negatively associated with the perceived dental pain change during clenching with a cotton roll in the experimental tooth during the period from 24 h to 15 d. In contrast, no significant changes in CT levels were found in the tension and control sites.

The CT levels were reported as the total amount (pg) per 30-s sample, which is consistent with previous similar investigations that have used total amounts rather than concentrations of biomarkers, due to the inherent problem of the accurate determination of GCF volume.^{25,26} Nevertheless, we cannot rule out the possibility that the increased percent CT levels found could be influenced by a potential increase in GCF volume associated with orthodontic treatment.^{27,28} However, in our study no differences in GCF were found between sites and time points.

Although CT values in the compression group were lower at baseline relative to the other sites, the fact of expressing the

Table 2 – Differences between sites for calcitonin levels expressed as percentage of the baseline values at tension, compression and control sites.

	Tension-compression			Tension-control			Compression-control		
	Mean diff.	SD	p value	Mean diff.	SD	p Value	Mean diff.	SD	p value
1 h	-87.98	213.97	0.643	7.35	18.68	0.160	95.33	209.82	0.770
24 h	-484.80	1032.43	0.492	3.67	7.46	0.059	488.50	1031.29	0.770
7 d	-772.40	1876.70	0.131	4.26	9.92	0.123	776.70	1874.87	0.014*
15 d	-727.50	2305.60	0.770	4.98	12.02	0.432	732.50	2301.16	0.160

* $p < 0.05$.

Table 3 – Intragroup differences for levels expressed as percentage of the baseline values.

	Tension			Compression			Control		
	Mean	SD	p value	Mean	SD	p value	Mean	SD	p value
1–24 h	4.08	15.79	0.322	-392.74	828.93	0.547	0.401	0.99	0.160
1 h–7 d	3.652	8.9	0.492	-680.81	1672.6	0.010**	5.89	2.78	0.375
1 h–15 d	1.87	8.75	0.557	-637.7	2129.69	0.131	-0.505	1.89	1
24 h–7 d	-0.428	9.25	1	-288.07	1081.17	0.193	0.158	0.47	0.275
24 h–15 d	-2.21	9.28	0.846	-244.96	1756.6	0.160	-0.906	2.52	0.846
7–15 d	-1.782	3.41	0.129	43.11	782.79	0.695	-1.06	2.7	0.426

** $p = 0.01$.

results as the % of change relative to these basal values overcomes these differences, which could be due to the biological variability associated to GCF determination.

In this study, we attempted to assess the reported anti-resorptive and analgesic activities of CT^{1,6,7} during orthodontic teeth movement through the analysis of GCF CT levels. The observed rapid increase in percent CT levels at the compression site of the experimental teeth was probably due to changes in the bone calcium homeostasis induced by the orthodontic forces. In other words, the increment in calcium levels at the compression site during active bone resorption may have elicited the immediate increase in CT release.

Reported biological activities of CT include lowering serum calcium concentrations in pathological states of increasing bone resorption, mainly by inhibition of osteoclast activity.^{1,4,5} It is, therefore conceivable that a short-term stress exerted on the periodontium by the orthodontic forces induced an increase in the GCF CT levels, which intervened in the bone remodelling during the early stages of orthodontic tooth movement. GCF CT levels may thus be considered a biomarker of bone remodelling during early orthodontic tooth movement. Since no differences in FI, GI, and BOP were found throughout the study, the periodontal conditions did not influence the GCF CT levels.

The highest intensity of dental pain was reached at 24 h after the beginning of orthodontic treatment, which is similar to the results of previous studies.^{25,29,30} As a novelty, we introduced a functional task in the evaluation of perceived dental pain: that of clenching with a cotton roll. In this study, a negative association was found between the percent CT levels and VAS pain score changes in the experimental tooth over the period from 24 h to 15 d. These results showed that, as CT levels increase, dental pain decreases, what may indicate an analgesic effect of CT in orthodontics-induced dental pain, although the mechanism remains unclear. Several hypotheses have been proposed to explain this powerful analgesic effect of CT: a central action,^{9,10} inhibition of PGE₂ and thromboxane synthesis,^{11,12} and stimulation of β -endorphin release.^{7,11,13} In other studies assessing orthodontic-related dental pain, the initial intensity of pain (at 1 h) was associated with increased GCF PGE₂ and IL-1 β levels.^{25,29} It will be therefore interesting to determine whether the increase in CT levels reported in this investigation would correlate with the β -endorphin and PGE₂ levels in GCF.

This prospective clinical investigation has shown that CT levels in the GCF significantly increased in the compression site after the short term after application of orthodontic forces and these changes were negatively associated with the perceived patient's dental pain during the period from 24 h to 15 d after the application of orthodontic forces.

Funding

This study was funded by an investigation grant from The "Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña".

Competing interests

All authors state that they have no conflicts of interest.

Ethical approval

The parents of all patients were informed on the characteristics of the study and agreed for their children to participate by signing an EC-approved informed consent form.

Acknowledgement

This study was funded by an investigation grant from The Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña.

REFERENCES

- Turner AG, Tjahjono F, Chiu WS, Skinner J, Sawyer R, Moore AJ, et al. The role of the calcitonin receptor in protecting against induced hypercalcemia is mediated via its actions in osteoclasts to inhibit bone resorption. *Bone* 2011;48:354-61.
- Sexton PM, Findlay DM, Martin TJ. Calcitonin. *Current Medicinal Chemistry* 1999;6:1067-93.
- Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:8253-8.
- Nakamura H, Nagaoka N, Hirata A, Inoue M, Ozawa H, Yamamoto T. Distribution of actin filaments, non-muscle myosin, M-Ras, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in osteoclasts after calcitonin administration. *Archives of Histology and Cytology* 2005;68:143-50.
- Marzia M, Chiusaroli R, Neff L, Kim NY, Chishti AH, Baron R, et al. Calcitonin is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin. *Journal of Biological Chemistry* 2006;281:9745-54.
- Knopp-Sihota JA, Newburn-Cook CV, Homik J, Cummings GG, Voaklander D. Calcitonin for treating acute and chronic pain of recent and remote osteoporotic vertebral compression fractures: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International* 2012;23:17-38.
- Ofluoglu D, Akyuz G, Unay O, Kayhan O. The effect of calcitonin on beta-endorphin levels in postmenopausal osteoporotic patients with back pain. *Clinical Rheumatology* 2007;26:44-9.
- Blau LA, Hoehns JD. Analgesic efficacy of calcitonin for vertebral fracture pain. *Annals of Pharmacotherapy* 2003;37:564-70.
- Azria M. Possible mechanisms of the analgesic action of calcitonin. *Bone* 2002;30:80S-3S.
- Nakamoto H, Soeda Y, Takami S, Minami M, Satoh M. Localization of calcitonin receptor mRNA in the mouse brain: coexistence with serotonin transporter mRNA. *Brain Research Molecular Brain Research* 2000;76:93-102.
- Pecile A. Calcitonin and relief of pain. *Bone and Mineral* 1992;16:187-9.
- Ceserani R, Colombo M, Olgiate VR, Pecile A. Calcitonin and prostaglandin system. *Life Sciences* 1979;25:1851-5.
- Franceschini R, Cataldi A, Barreca T, Salvemini M, Rolandi E. Plasma beta-endorphin, ACTH and cortisol secretion in man after nasal spray administration of calcitonin. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1989;37:341-3.
- Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 2008;87:414-34.



15. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 2009;88:597–608.
16. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 1996;75:562–7.
17. Alfaqeeh SA, Anil S. Osteocalcin and N-telopeptides of type I collagen marker levels in gingival crevicular fluid during different stages of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2011;139:e553–9.
18. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *European Journal of Oral Sciences* 2006;114:416–22.
19. Dilsiz A, Kilic N, Aydin T, Ates FN, Zihni M, Bulut C. Leptin levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Angle Orthodontist* 2010;80:504–8.
20. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *European Journal of Oral Sciences* 2008;116:89–97.
21. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* 1964;22:121–35.
22. Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L. A modified gingival index for use in clinical trials. *Clinical Preventive Dentistry* 1986;8:3–6.
23. Muhlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding—a leading symptom in initial gingivitis. *Helvetica Odontologica Acta* 1971;15:107–13.
24. Dixon JS, Bird HA. Reproducibility along a 10 cm vertical visual analogue scale. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1981;40:87–9.
25. Giannopoulou C, Dudic A, Kiliaridis S. Pain discomfort and crevicular fluid changes induced by orthodontic elastic separators in children. *Journal of Pain* 2006;7:367–76.
26. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2003;2000(31):32–42.
27. Samuels RH, Pender N, Last KS. The effects of orthodontic tooth movement on the glycosaminoglycan components of gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology* 1993;20:371–7.
28. Baldwin PD, Pender N, Last KS. Effects on tooth movement of force delivery from nickel-titanium archwires. *European Journal of Orthodontics* 1999;21:481–9.
29. Luppanapornlarp S, Kajji TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *European Journal of Orthodontics* 2010;32:596–601.
30. Polat O, Karaman AI. Pain control during fixed orthodontic appliance therapy. *Angle Orthodontist* 2005;75:214–9.

