

**COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN RANKL Y OPG EN ADOLESCENTES Y ADULTOS
TRATADOS CON ORTODONCIA CORRECTIVA-ESTUDIO PILOTO**

**María Camila Bohada Martínez
María Camila del Castillo Casas**

**UNIVERSIDAD EL BOSQUE
PROGRAMA DE ORTODONCIA - FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
BOGOTA DC.- JULIO 2024**

HOJA DE IDENTIFICACIÓN

Universidad	El Bosque
Facultad	Odontología
Programa	Ortodoncia
Título:	Comparación de la expresión RANKL y OPG en pacientes adolescentes y adultos tratados con ortodoncia correctiva. - Estudio piloto
Grupo de investigación	Unidad de manejo integral de malformaciones craneofaciales – UMIMC
Línea de investigación:	Metabolismo y regeneración ósea
Tipo de investigación:	Posgrado/ grupo
Estudiantes:	María Camila Bohada Martínez María Camila del Castillo Casas
Director:	Dra. Lina María Escobar Márquez
Codirector:	Dra. Erika Martínez Saab
Asesor metodológico:	Dra. Ingrid Isabel Mora Diaz

DIRECTIVOS UNIVERSIDAD EL BOSQUE

JUAN CARLOS LÓPEZ TRUJILLO	Presidente del Claustro
MIGUEL RUIZ RUBIANO	Presidente Consejo Directivo
MARIA CLARA RANGEL GALVIS	Rector(a)
NATALIA RUÍZ ROGERS	Vicerrector(a) Académico
RICARDO ENRIQUE GUTIÉRREZ MARÍN	Vicerrector Administrativo
GUSTAVO SILVA CARRERO	Vicerrectoría de Investigaciones.
CRISTINA MATIZ MEJÍA	Secretaria General
JUAN CARLOS SANCHEZ PARIS	División Postgrados
HERNEY ALONSO RENGIFO REINA	Decano Facultad de Odontología
MARTHA LILILIANA GOMEZ RANGEL	Secretaria Académica
DIANA MARIA ESCOBAR JIMENEZ	Director Área Bioclínica
ALEJANDRO PERDOMO RUBIO	Director Área Comunitaria
JUAN GUILLERMO AVILA ALCALÁ	Coordinador Área Psicosocial
INGRID ISABEL MORA DIAZ	Coordinador de Investigaciones Facultad de Odontología
SANDRA HINCAPIE NARVAEZ	Coordinador Postgrados Facultad de Odontología
GABRIEL RESTREPO	Director de programa de especialización de Ortodoncia
MARIA INES LEMOS	Coordinador de programa de especialización de Ortodoncia

“La Universidad El Bosque, no se hace responsable de los conceptos emitidos por los investigadores en su trabajo, solo velará por el rigor científico, metodológico y ético del mismo en aras de la búsqueda de la verdad y la justicia”.

GUÍA DE CONTENIDO

Resumen

Abstract

	Pág.
Introducción	1
2. Marco teórico	3
3. Planteamiento del problema	7
4. Justificación	9
5. Situación Actual	10
6. Objetivos	14
6.1 Objetivo general	14
6.2 Objetivos específicos	14
7. Metodología del Proyecto	15
7.1. Tipo de estudio	15
7.2. Población y muestra	15
7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información	15
7.4. Hipótesis de estudio	21
7.5 Plan de tabulación y análisis.	21
8. Consideraciones éticas.	23
a. Sustento legal	23
b. Consentimiento informado	23
9.. Resultados	24
10. Discusión	28
11. Conclusiones	29
12. Referencias bibliográficas	30
13. Anexos	32

LISTADO DE TABLAS

		Págs
Tabla 1	Determinación de la concentración y calidad del RNA obtenido de muestras de fluido crevicular. Diseñada por Lina María Escobar Márquez	25
Tabla 2	Secuencia de primers usados en este estudio. Diseñado por Lina María Escobar Márquez	26

LISTADO DE FIGURAS

	Págs.	
Figura 1	Esquema de los tiempos en los que se realizará la toma de fluido crevicular en ambos grupos: Grupo 1 Adolescentes, Grupo 2 Adultos. Diseñada por Lina María Escobar Márquez	17
Figura 2	Recolección de muestra de fluido crevicular. Fotos tomadas en las Clínicas Odontológicas de la Universidad El Bosque por Bohada Martínez & del Castillo Casas	19
Figura 3	Retracción Del Canino. La retracción del canino se realizará mediante cadeneta continua, con una fuerza de 100 gr. Diseñada por Lina María Escobar Márquez	20
Figura 4	Evaluación del movimiento dental. Diseñada por Lina María Escobar Márquez	21
Figura 5	Valores de umbral del ciclo o cycle threshold (CT) obtenidos mediante diferentes métodos de obtención de muestras para amplificación por PCR. Diseñada por Lina María Escobar Márquez	25
Figura 6	Cuantificación del RNA extraído a partir de muestras de fluido crevicular de individuos bajo tratamiento de ortodoncia. Tomado de espectofotometro del laboratorio UIBO	25
Figura 7	Cuantificación de la expresión relativa de los genes RANKL y OPG obtenidos de pacientes bajo tratamiento de ortodoncia. Análisis estadístico realizado por David Diaz Báez	27

RESUMEN

Comparación de la expresión de RANKL y OPG en adolescentes y adultos tratados con ortodoncia correctiva. Estudio piloto

Antecedentes: dos marcadores importantes en el metabolismo óseo son el activador del receptor para el ligando del factor nuclear κ b (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG). Algunos estudios sugieren que la edad conduce a una expresión diferencial de estos marcadores. Es importante determinar si la edad influye significativamente en el proceso de remodelación, inflamación y velocidad de movimiento dental. Pocos estudios han evaluado la edad de los pacientes como una variable que puede influir en la inducción y modulación del proceso inflamatorio inducido por carga mecánica, así como en la velocidad de movimiento alcanzada en estos pacientes durante fases del tratamiento de ortodoncia, como alineación, nivelación, y retracción canina. por esto, se necesitan más estudios para comprender mejor el papel del sistema OPG/RANKL en la remodelación ósea durante el movimiento dental ortodóntico en pacientes de diferentes edades y fases de tratamiento.

Objetivo: Comparar los niveles de expresión de RANKL y OPG en una muestra piloto de pacientes adultos y adolescentes con tratamiento de ortodoncia.

Métodos: Para estandarizar el método, se siguieron criterios de inclusión y exclusión, se analizaron cinco pacientes entre 14 y 40 años. Se tomaron muestras de fluido crevicular gingival (FCG) de la zona distal del canino superior derecho, siguiendo el protocolo establecido por Rody et al., 2014. La extracción de ARN se realizó a partir de las muestras de FCG utilizando el kit quick-RNA, según las instrucciones del fabricante. Se cuantificó el ARN obtenido y se evaluó su calidad mediante espectrofotometría. El ADNc se obtuvo mediante transcripción inversa utilizando el protocolo del kit de síntesis de ADNc de primera hebra protoscript II. La técnica (RT-PCR) se realizó utilizando el kit luna universal para determinar niveles de expresión de RANKL y OPG. La amplificación y eficiencia se analizaron utilizando el programa de PCR Linreg. Se realizaron lecturas correspondientes a RANKL y OPG de forma individual para determinar el nivel de expresión en las muestras. Como control de expresión se analizó el gen GAPDH. **Resultados:** Inicialmente se estandarizó la forma más adecuada y eficiente de obtener una muestra para amplificación por PCR a partir del FCG recolectado. Método 1: extracción de ARN+RT+PCR. Para obtener ARN puro de mejor calidad, se utilizó el método 1. El ARN obtenido se cuantificó y analizó su calidad y pureza mediante la evaluación de las curvas de espectrofotometría. Se logró una amplificación adecuada de genes RANKL y OPG en 5 individuos bajo tratamiento de ortodoncia. La expresión de RANKL aumentó en t1 en comparación con t0; Se observó un aumento significativo de OPG en t1.

Conclusiones: Es importante realizar un control de la placa antes de tomar la muestra. Las cantidades de muestra obtenidas fueron suficientes para analizar la amplificación de RANKL y OPG. La extracción de ARN se estandarizó mediante el método 1 porque permitió obtener mayor cantidad de ARN, con calidad suficiente para realizar la PCR.

Palabras clave: Adolescentes, Adultos, RANK, OPG, Ortodoncia, Fluido crevicular

ABSTRACT

Comparison of RANKL and OPG expression in adolescents and adults with corrective orthodontics-pilot study

Background: Two important metabolism markers are nuclear factor k B (RANKL) and osteoprotegerin (OPG), some studies suggest age may lead to different expressions, however few have studies have assessed patient age as a variable as well as movement pace such as alignment, leveling and canine retraction during orthodontic treatment. **Objective:** to compare RANKL and OPG levels in a pilot sample of adult and adolescent patients with orthodontic treatment. **Methods:** Five patients between 14 and 40 years of age were assessed, gingival crevicular fluid (GCF) samples were taken from the right upper canine distal area as per Rody *et al.*, in 2014. RNA samples were taken from GCF with Quick-RNA, quantified and quality measured with spectrophotometry. DNAC was obtained by reverse transcription with first strand ProtoScript II, the technique (RT-PCR) was performed with Luna Universal in order to determine the RANKL and OPG expressions. Amplification and efficiency were analysed with PCR Linreg, individual readings of RANKL and OPG were taken in order to determine expression and control was with GAPDH gene. **Results:** Standardisation for samples was by method 1 extraction of RNA+RT+PCR. This RNA was quantified and analysed with spectrophotometry curves. Adequate amplification of RANKL and OPG from five individuals were obtained, RANKL increased in T1 compared to T0 and OPG increased in T1. **Conclusions:** A plaque control is important before taking a sample and sample quantities were enough for RANKL and OPG analysis. RNA extraction was standardized with method 1 allowing more quantity in order to test with PCR.

Key words: adolescents, adults, RANKL, OPG, orthodontics, crevicular fluid

1. Introducción

El movimiento dental ortodóntico es inducido gracias al incremento en el proceso inflamatorio y la liberación de mediadores que estimulan la activación balanceada de los osteoclastos y osteoblastos. Reportes previos han sugerido que la edad cronológica puede ser un factor de riesgo para la inducción de pérdidas óseas significativas, la reabsorción radicular, la enfermedad periodontal y la respuesta ante los estímulos mecánicos inductores del movimiento dental, ya que los adultos tienden a tener una menor cantidad y activación celular a nivel del ligamento y del tejido óseo (Kyomen et al, 1997; Ren et al, 2002)

En la actualidad los pacientes adultos son cada vez más frecuentes en la consulta ortodóntica, por lo que resulta importante conocer sobre la respuesta fisiológica de los tejidos dentales durante el tratamiento de ortodoncia en estos pacientes (Roddy et al., 2014); así como también se hace necesario aumentar nuestro conocimiento sobre las diferencias biológicas en los tejidos periodontales y en el metabolismo óseos entre individuos jóvenes y adultos.

La tensión mecánica producida por los aparatos de ortodoncia estimula a las células del periodonto a formar sustancias biológicamente activas que son responsables de la remodelación del tejido conectivo y de la activación de los osteoclastos y osteoblastos.

Estas sustancias pueden ser analizadas de forma no invasiva en los seres humanos mediante la evaluación de los cambios en la composición del fluido crevicular gingival (FCG) durante el movimiento dental ortodóntico (Nishijima et al, 2006; Kavadia-Tsatala et al, 2002).

Dentro de estas sustancias encontramos dos importantes reguladores del proceso inflamatorio y el remodelado de los tejidos como son la osteoprotegerina (OPG) y el ligando para el receptor activador del factor nuclear kappa B (RANKL) (Li et al, 2018).

La diferenciación y activación osteoclástica está regulada por la unión de RANKL al receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) y esta unión es inhibida mediante el receptor señuelo OPG, lo que conduce a una reducción en la formación osteoclástica (Boyle et al, 2003; Kapoor et al, 2014).

Tanto la OPG como el RANKL están relacionados con la regulación de la homeostasis ósea mediante el sistema OPG/RANKL/RANK y la determinación de su concentración puede ser útil para predecir la tasa de remodelado óseo durante el movimiento dental ortodóntico (Tyrovola et al, 2008). Sin embargo, pocos estudios como el de Alikhani et al., (2018), Kawasaki et al., (2006), Rody et al., (2014), han comparado la expresión de este tipo de marcadores en adultos y adolescentes y no es clara la correlación de la expresión de estos dos marcadores con la tasa de movimiento dental dependiendo de la edad del individuo. Por lo tanto el objetivo del presente trabajo será determinar y comparar los niveles de expresión de las proteínas OPG y RANKL en fluido crevicular de pacientes jóvenes y adultos que requieran extracción de premolares y medir la cantidad de desplazamiento del canino durante 3 meses de tratamiento ortodóntico en diferentes intervalos de tiempo, con el fin de determinar si la edad de los pacientes puede estar influyendo en la respuesta biológica que se produce debido a la estimulación mecánica en el movimiento dental ortodóntico .

2. Marco teórico o conceptual

2.1. Generalidad del movimiento

El movimiento dental ortodóncico es un proceso que combina la adaptación fisiológica del hueso alveolar a las tensiones mecánicas con una lesión menor reversible del periodonto. Cuando el periodonto se encuentra en condiciones normales, dicho movimiento se lleva a cabo mediante una remodelación ósea altamente coordinada y eficiente, que requiere un equilibrio entre formación y reabsorción ósea (Li Y et al., 2018).

La teoría de presión-tensión propone que, en unos pocos segundos después de la fuerza, el diente cambia su posición dentro del espacio del ligamento periodontal (LPD), y el efecto que produce es la compresión del LPD en algunas áreas y el estiramiento o tensión del LPD en otras. Mientras que el flujo sanguíneo disminuye en el lado de la compresión, se mantiene o aumenta en el lado de la tensión. Si se mantiene la fuerza de carga, la alteración del flujo sanguíneo cambia en minutos la tensión de oxígeno y el entorno químico, mediante la liberación de agentes biológicamente activos como las prostaglandinas y las citocinas como la interleucina 1 Beta (IL-1 β). Estos mediadores químicos afectan de manera diferente las actividades celulares en las áreas de compresión frente a las de tensión dentro del LPD, promoviendo un resultado neto de reabsorción ósea en el lado de compresión y formación de hueso en el lado de tensión. (Davidovitch et al., 2021; Li Y et al., 2018).

El movimiento de los dientes comienza poco después, generalmente dentro de los 2 días posteriores a la aplicación de una fuerza ligera. Clínicamente, es casi imposible evitar por completo la oclusión de los vasos sanguíneos, por lo que la hialinización siempre ocurre hasta cierto punto y el movimiento de los dientes es el resultado de una combinación de socavación y reabsorción frontal. Por lo general, toma de 7 a 14 días para que ocurra el movimiento de los dientes cuando se aplica una gran fuerza. Por el contrario, fuerzas ligeras solo reduce el flujo sanguíneo, lo que permite un reclutamiento rápido de osteoclastos, ya sea localmente dentro del LPD o a través del flujo sanguíneo (Li Y et al., 2018).

2. 2. Fases del tratamiento ortodóntico.

Fase de alineación y nivelación: La primera fase del tratamiento tiene como objetivo conseguir la alineación de los dientes y corregir las discrepancias verticales mediante la nivelación de los arcos dentales. No solo hay que desplazar los dientes mal alineados hasta el arco dental para conseguir una alineación adecuada, sino que también hay que controlar la posición anteroposterior de los incisivos, la anchura posterior de los arcos dentales y la forma de dichos arcos. De igual manera, al nivelar los arcos hay que determinar y controlar si la nivelación se produce por la extrusión de los dientes posteriores, por la intrusión de los incisivos o por alguna combinación específica de ambos procesos.

Los arcos de alambre usados para esta etapa deben suministrar fuerzas ligeras y constantes de alrededor de 50 g para poder lograr la inclinación dental más eficaz y evitar las fuerzas intensas. Los arcos de alambre deben ser capaces de moverse libremente dentro de los brackets. Se deben evitar los arcos de alambre rectangular, especialmente aquellos que se insertan en el slot del bracket, que podrían alterar la posición del ápice radicular (Proffit *et al.*,2014).

Fase de trabajo: Al iniciar esta fase del tratamiento los dientes deberán estar bien alineados y haberse corregido cualquier exceso o inversión de la curva de Spee. Para esta fase el objetivo será corregir las relaciones entre los segmentos molares y caninos, es decir, idealmente conseguir una relación molar y canina Clase I de Angle, para lograr una oclusión normal en el plano anteroposterior o sagital, así como el cierre de los espacios de extracción o los espacios residuales de los arcos dentales, además de corregir un overjet aumentado o negativo (Proffit *et al.*,2014).

Fase de finalización: Al finalizar la segunda fase del tratamiento, los dientes deben estar bien alineados, los espacios de extracción deben estar cerrados, debe haber paralelismo radicular y la relación sagital de molares y caninos debe estar en relación normal de clase I. Es probable que en la mayoría de los casos se requieren algunos ajustes en las posiciones de ciertos dientes para nivelar los rebordes marginales, obtener posiciones horizontales ideales de los dientes dentro de las arcadas y la corrección de posibles discrepancias por errores en la

colocación de los brackets. En general en esta fase se busca producir una idealización general de los arcos y su correcto acople (Proffit *et al.*,2014).

2.3. Remodelado: Aposición y reabsorción.

El ciclo de remodelado óseo comienza con una fase de iniciación, que consiste en la reabsorción ósea por los osteoclastos, seguida de una fase de formación ósea por los osteoblastos, pero entre estas dos fases hay una fase de transición (o reversión). El ciclo se completa con acciones coordinadas de osteocitos y células de revestimiento óseo. (Vera, 2021).

Los osteoclastos son células multinucleadas, que son precursores hematopoyéticos, derivados de los monocitos y macrófagos. Las citocinas secretadas por las células osteoblásticas son el elemento estimulante de colonias de macrófagos que interceden en proliferación, adhesión y migración que le antecede al osteoclasto, en donde es prioritario inducir a la fusión célula a célula para formar células multinucleadas que promueven la migración, supervivencia y funcionalidad de los osteoclastos maduros (Vera, 2021).

Se induce la resorción ósea directamente, activando los osteoclastos, y esto es el resultado de los factores inductores de osteoclastogénesis en las células estromales u osteoblastos. Por otro lado. La osteoprotegerina (OPG), proteína que actúa como receptor, producido por los osteoblastos va a inhibir la diferenciación de los osteoclastos, impidiendo la unión de RANKL, proteína expresada por células osteoblásticas, con su receptor RANK, presente en la superficie de los osteoclastos (Otero *et al.*, 2016).

*Ligando del receptor activador para el-factor nuclear-kappa B (Receptor Activator for NuclearFactor κ B Ligand, **RANKL**)*

Proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia del factor de necrosis tumoral que se une específicamente al activador del receptor factor nuclear-kappa B (RANK) y a la OPG. Desempeña un papel importante en la regulación de la diferenciación y activación de osteoclastos. (PubMed 2007)

La expresión inducida de RANKL por parte de las células osteoblásticas permite la maduración, diferenciación y activación de los osteoclastos. RANKL promueve el desarrollo y la supervivencia de los osteoclastos al unirse al receptor activador del factor nuclear κ B, conocido por RANK (Receptor Activator of Nuclear Factor κ B), miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF), en precursores de osteoclastos, con la presencia requerida del factor estimulante de colonias de macrófagos M-CSF (AtkinS et al., 2003).

Osteoprotegerina (OPG)

Es un miembro secretado de la superfamilia de receptores TNF que regula negativamente la osteoclastogénesis. Es producido por una amplia gama de células, incluidos los osteoblastos, las células del estroma y los fibroblastos gingivales y periodontales. Este se une a RANKL, impidiendo la interacción RANK/RANKL y, en consecuencia, inhibiendo la osteoclastogénesis. Por lo tanto, el sistema RANKL/RANK/OPG es un mediador clave del proceso de formación osteoclástico (Silva et al., 2014).

3. Planteamiento del problema

Durante el tratamiento de ortodoncia fija, los tejidos PDL responden rápidamente a la tensión mecánica con los consiguientes cambios metabólicos que permiten el movimiento de los dientes. El movimiento dental inicial se ve facilitado por una reacción inflamatoria aséptica que está siendo mediadas por varias citoquinas y enzimas inflamatorias, responsables de la remodelación del tejido óseo y del LPD.

El movimiento dental se da gracias a la reabsorción originada en las zonas de presión y el depósito óseo en las zonas tensionadas. Este proceso se lleva a cabo debido a la acción coordinada entre osteoblastos y osteoclastos. La formación osteoclástica u osteoclastogénesis es inducida principalmente por RANKL producido por los osteoblastos, el cual se une específicamente a RANK, que se localiza en la membrana de los precursores de osteoclastos. Esta unión es indispensable para la diferenciación, supervivencia y función del osteoclasto maduro. Adicionalmente, la actividad de RANKL está controlada por un receptor señuelo soluble, la osteoprotegerina (OPG), que inhibe la activación de la osteoclastogénesis y que es producido y controlado por el osteoblasto. Dado que la remodelación ósea está controlada por un equilibrio entre la unión de RANK-RANKL y la producción de OPG, es importante conocer cómo cambia la expresión de estos mediadores durante las diferentes fases del movimiento dental ortodóntico y si su expresión está siendo influenciada por la edad de los individuos analizados.

Pocos estudios han evaluado la edad de los pacientes como una variable que puede estar influyendo en la inducción y modulación del proceso inflamatorio inducido por la carga mecánica, así como en la tasa del movimiento logrado en estos pacientes de acuerdo con su edad.

Determinar si la edad de los pacientes influye de forma importante tanto en el proceso de remodelado, inflamación y tasa de movimiento dental es muy importante dado que previos estudios han determinado que, durante la maduración, el hueso alveolar se vuelve gradualmente más denso, mientras que el LPD se vuelve más fibrótico. Estos cambios pueden afectar a la forma en que estos tejidos responden a los cambios locales estimulados por las fuerzas de ortodoncia. Conocer como la edad del paciente puede estar influyendo en la

producción de moduladores del metabolismo óseo y en la tasa de movimiento dental se hace indispensable, ya que actualmente pacientes de todas las edades tienen acceso y se someten más frecuentemente a tratamientos de ortodoncia.

Por lo tanto, es necesario comprender como se produce y se regula esa respuesta celular, dependiendo de la edad, lo cual contribuirá a una mejor selección de fuerza y a la determinación de una biomecánica adecuada que permita generar tratamientos más eficaces, eficientes y seguros para nuestros pacientes.

Teniendo en cuenta esto, el objetivo del estudio será evaluar los cambios en los niveles de expresión de OPG y RANKL en individuos, adolescentes o adultos, en diferentes tiempos de tratamiento ortodóntico.

4.1 Pregunta de Investigación

¿Existen diferencias en los niveles de expresión de las proteínas RANKL y OPG en adolescentes y adultos durante la fase de alineación y retracción canina?

4. Justificación

En el tratamiento de ortodoncia, el proceso de osteoclastogénesis y la formación osteoblástica durante la remodelación ósea ha sido estudiada por medio de biomarcadores como RANKL y OPG, que pueden ser medidos fácilmente en el fluido crevicular de individuos sometidos a estimulación mecánica. La expresión de estos biomarcadores puede variar por la magnitud y la duración de las fuerzas aplicadas durante las diferentes fases del tratamiento y las condiciones óseas de las pacientes generadas por la edad o factores sistémicos, entre otros.

Se ha determinado previamente que la edad puede actuar como un factor de riesgo en asociación con otros factores como la densidad ósea y las fuerzas aplicadas en el tratamiento de ortodoncia. La expresión de biomarcadores inflamatorios perdura más en el tiempo, en pacientes adultos, causando mayor daño en los tejidos de soporte dental, teniendo como consecuencia reabsorción radicular, pérdida ósea y problemas periodontales debido a la actividad celular propia del hueso y del LPD, sin representar un movimiento dental real, incrementando además el tiempo de regeneración ósea.

Pocos estudios se han centrado en evaluar la expresión de biomarcadores asociados con la edad de los pacientes y con las diferentes fases del tratamiento ortodóntico. En la actualidad los pacientes adultos son cada vez más frecuentes en la consulta ortodóntica, por lo que resulta importante conocer cada vez más sobre la respuesta fisiológica de los tejidos dentales durante el tratamiento de ortodoncia en estos pacientes.

El análisis de marcadores del remodelado óseo como RANKL y OPG en las muestras del FCG puede ayudar a los clínicos a comprender los procesos bioquímicos asociados al movimiento dental y podría ser beneficioso para el diagnóstico, las opciones terapéuticas, la supervisión de las eficiencias mecánicas o la estabilización de las actividades celulares. Adicionalmente, se necesitan más estudios para comprender mejor el papel del sistema OPG/RANKL en la remodelación ósea durante el movimiento dental ortodóntico en pacientes de diferentes edades y en las diferentes fases del movimiento dental.

5. Estado del arte y situación actual en al área de investigación

La remodelación ósea surge como una respuesta fisiológica a las fuerzas mecánicas inducidas por el tratamiento ortodóntico que involucra hueso alveolar, ligamento periodontal, la estructura dentaria y tejido gingival (Tuncer et al., 2013). Esta remodelación ósea inicia con la activación de cambios vasculares, síntesis de citoquinas, factores de crecimiento y prostaglandinas, que median la respuesta inflamatoria. El movimiento dental surge por la reabsorción ósea que está dirigida por las células osteoclasticas, que actúan en el lado de presión que es hacia donde el vector de la fuerza actúa. El lado contrario al lado de presión se conoce como zona de tensión, donde predomina la actividad osteoblástica y por lo que se produce aposición ósea, lo que finalmente permite un movimiento dental a través del hueso. Todo este proceso puede variar por la magnitud y la duración de las fuerzas en los movimientos ortodónticos (Tuncer et al., 2013).

La actividad osteoclastogénica y la osteoblástica durante la remodelación ósea ha sido estudiada por medio de biomarcadores como RANKL. Este ligando es una proteína cuya expresión es estimulada por las células osteoblásticas e inducen a la diferenciación osteoclastica mediante su unión al receptor RANK que se ubica en la superficie de los osteoclastos o pre-osteoclastos. Esta unión es a su vez regulada por la OPG, proteína que actúa como receptor, producida por los osteoblastos que va a inhibir la diferenciación de los osteoclastos, impidiendo la unión de RANKL con su receptor RANK (Otero et al., 2016). Estos biomarcadores pueden ser analizados en el fluido crevicular gingival (FCG), que es un exudado inflamatorio presente en el surco gingival y contiene proteínas plasmáticas que mejoran la adherencia de la unión epitelial (Jablonski,1982). Este puede ser obtenido mediante técnicas no invasivas en el lado de presión y tensión, aportando un predictor de la actividad celular.

Kawasaki et al en 2006 realizaron un estudio donde se compararon los niveles de RANKL y OPG en el FCG durante el movimiento dental ortodóntico en una muestra de 30 pacientes, 15 jóvenes con un rango de edad entre 12 y 17 años y 15 adultos, entre 27 y 35 años, el estudio incluyó hombres y mujeres en proporciones comparables, donde reportaron que la relación

RANKL/OPG en FCG de pacientes adultos fue menor que en las muestras de pacientes jóvenes. Además, se encontró que la cantidad promedio de movimiento de dientes para los jóvenes fue mayor que para los adultos después de 168 h y después de 24 h, los niveles de RANKL aumentaron y los de OPG disminuyeron en las muestras de FCG tomadas del lado de presión durante el movimiento de retracción canina tanto en jóvenes como en adultos.

Adicionalmente en otro estudio se encontraron niveles más altos de RANKL y más bajos de OPG en sujetos jóvenes. Siendo la edad, un factor de riesgo para la reabsorción radicular, pérdida ósea y problemas periodontales debido a la actividad celular propia del hueso y del LPD (Rody et al., 2014).

Los resultados sobre los niveles de expresión de OPG y RANKL donde se comparan veintiún pacientes consecutivos en un rango de edad de 12 a 20 años, sanos, sin antecedentes de enfermedad periodontal, durante el movimiento dental ortodóntico y sin necesidad de extracciones dentales, donde las muestras se combinaron para el lado de presión que era la zona disto palatino izquierdo y derecho y tensión la zona mesiovestibulare izquierdo y derecho para caninos y segundos molares. Se demostró que RANKL aumentó significativamente en los caninos en el lado de presión 42 días después de la aplicación de fuerza. También hubo una tendencia al incremento del RANKL después de 42 días en el lado de presión de los segundos molares. OPG mostró aumentos no significativos 4 horas después de la aplicación de fuerza en los caninos tanto en el lado tensión como de presión. No se encontraron correlaciones significativas para estos biomarcadores con la velocidad de movimiento de los dientes. (Grantt et al.,2013).

Por otro lado, la magnitud de la fuerza y la duración de esta parece ser un factor importante en el nivel de expresión de biomarcadores. Tuncer et al., (2013) reportaron que la fuerza de ortodoncia continua provocó cambios en la inhibición de la osteoclastogénesis de las células del LPD en los lados mesial y distal justo después de la aplicación de la fuerza. La aplicación de fuerzas más ligeras o fuerzas intermitentes puede proporcionar mayor actividad celular para la regeneración de LPD.

Alikhani et al., (2018) con una muestra en su estudio de 18 sujetos, 9 jóvenes con un rango de edad de 11-14 años y 9 adultos entre la edad de 21-45 años, con maloclusión Clase II División 1 que requirieron 4 extracciones de primeros premolares, reportó que niveles más altos y sostenidos de estos biomarcadores (RANKL y OPG) en adultos y jóvenes no indica que haya una tasa más rápida de movimiento dental, por el contrario, informaron niveles más altos de dolor y molestias en adultos.

Además, reportan que los adultos expresan marcadores inflamatorios más altos en los niveles de marcadores de osteoclastos en adultos en comparación con adolescentes en respuesta a la aplicación de fuerza ortodóncica, pero una tasa de movimiento dental más lenta, asociado a la densidad ósea, como consecuencia a la edad cronológica.

Como se mencionó anteriormente, la remodelación del hueso alveolar puede ocurrir en situaciones fisiológicas, como fuerzas oclusales, erupción dentaria, intervenciones clínicas, como movimiento dental ortodóncico y condiciones patológicas, como periodontitis y patologías periapicales. En condiciones fisiológicas, existe un equilibrio entre la formación y reabsorción ósea, sin embargo, si este equilibrio cambia hacia una mayor reabsorción ósea, se producirá una patología donde se produce destrucción del hueso. (Belibasakis GN et al., 2012)

La periodontitis es un ejemplo de la pérdida del equilibrio fisiológico presente en la remodelación ósea, esta es una enfermedad inflamatoria caracterizada por la destrucción de los tejidos de soporte de los dientes. Un desequilibrio entre el biofilm de la placa y el sistema inmunitario del huésped da como resultado la sobreexpresión de citocinas proinflamatorias y seguido a esto una destrucción del hueso alveolar. (Lu et al., 2006)

La sobreexpresión de RANKL y la disminución de la expresión de OPG se han observado en diversas enfermedades óseas inflamatorias, como osteoporosis, enfermedades periodontales y mielomas múltiples. La OPG actúa como inhibidor de la unión de RANKL con RANK e inhibe la maduración y activación de los osteoclastos. Según en el estudio de Lu et al, se encontró

una diferencia significativa en la expresión de RANKL en muestras de FCG entre sitios sanos de sujetos enfermos y sitios de control de individuos sanos.

Además, un análisis de imágenes semicuantitativo demostró que se expresaron niveles significativamente más altos de proteína RANKL en las lesiones periodontales que, por el contrario, la proteína OPG fue significativamente menor en los tejidos con periodontitis. (Critti et al., 2003)

Por lo anterior es importante mantener controlados factores como la enfermedad periodontal y cualquier factor causal a este, como el cigarrillo, la diabetes, hábitos en higiene oral y enfermedades autoinmunes, en el presente estudio, para que los resultados obtenidos de la expresión de RANKL y OPG estén relacionados directamente con la fuerza ortodóncica inducida.

6. Objetivos

6.1 *Objetivo general:*

Comparar los niveles de expresión de RANKL y OPG en una muestra piloto en pacientes adultos y adolescentes con tratamiento de ortodoncia correctiva.

6.2 *Objetivos específicos:*

- Estandarizar la recolección de muestra de fluido crevicular en adolescentes y adultos con tratamiento ortodóntico
- Evaluar diferentes métodos de extracción de RNA proveniente de las muestras de fluido crevicular
- Estandarizar el protocolo de amplificación para evaluar cambios en la expresión del gen OPG y de RANKL en los diferentes tiempos de tratamiento

7. Metodología del Proyecto

7.1. Tipo de estudio: Estudio piloto

7.2. Población y muestra:

Se calculó el tamaño de muestra para el estudio mediante el método para comparar dos medidas independientes a través del software stata 14, basado en los siguientes supuestos, un nivel de confianza del 95%, potencia estadística del 80%, un tamaño del efecto basado en los resultados obtenidos por Kawasaki et al., 2006 de un promedio en los niveles de OPG en jóvenes 181.2 ± 37.10 PG/UL, y un promedio de niveles en adultos de 235.5 ± 39.5 pg /ul, Con una razón de asignación 1:1 y un análisis a dos colas, se adicionó un 20 % para minimizar riesgo de deserción, para un total de 11 pacientes por grupo.

Se realizó un muestreo por conveniencia no probabilístico para cada grupo de la cohorte, es decir, se seleccionaron los pacientes de manera consecutiva una vez se confirmados los criterios de elegibilidad.

Teniendo esto en cuenta y previo consentimiento informado, se analizó la expresión de OPG y RANKL en dos grupos de individuos:

Grupo 1: Corresponderá a 11 individuos con un rango de edad de entre 14 y 17 años.

Grupo 2: Corresponderá a 11 individuos con un rango de edad entre 25 y 40 años.

Los individuos que hacen parte del estudio son de ambos sexos y son individuos que están siendo atendidos en las clínicas odontológicas de la Universidad del Bosque.

Sin embargo cabe aclarar que el presente estudio es un piloto en el cual no se tomó la muestra total correspondiente según el calculo del tamaño de la muestra si no que se tuvo en cuenta 5 pacientes en total.

7.3. Métodos y técnicas para la recolección de la información

Reclutamiento: Inicialmente, se realizó un examen clínico y medios diagnósticos basados en radiografía lateral y panorámica, fotografías extraorales e intraorales, modelos de estudio en

las clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque para determinar la necesidad de extracciones de los primeros premolares superiores y retracción canina como tratamiento ideal cargo de las dos estudiantes del posgrado de Ortodoncia encargadas del estudio, para determinar el tipo de maloclusión según Angle, apiñamiento según índice de Litter y estado periodontal según World Workshop 2017, que se evaluó teniendo en cuenta placa y rojo como variables determinantes al momento de la toma de la muestra con el fin de establecer si cumplen con los criterios de inclusión propuestos. Todo esto se realizó bajo un proceso de consenso de calibración con un experto docente del posgrado de periodoncia y medicina oral de la Universidad el Bosque, con el fin de establecer condiciones periodontales similares en el momento de la selección de los pacientes de la muestra de los pacientes

Criterios de inclusión:

1. Jóvenes en edad de 14 a 17 años que requieran tratamiento de ortodoncia correctiva.
2. Adultos entre las edades de 25 a 40 años que requieran tratamiento de ortodoncia correctiva.
3. Maloclusión de Angle y apiñamiento moderado a severo que requiera extracción de premolares
4. Pacientes libres de caries
5. Pacientes periodontalmente sanos
6. Pacientes no fumadores

Criterios de exclusión:

1. Pacientes con algún tratamiento farmacológico actualmente o 6 meses antes del inicio de la ortodoncia
2. Pacientes con patologías sistémicas
3. Pacientes con pobre higiene oral
4. Pacientes que han sufrido previamente de enfermedad periodontal o pérdida ósea

Recomendaciones previas a la recolección de la muestra de fluido crevicular.

Una vez seleccionada la muestra, se les dio un kit de ortodoncia al inicio del tratamiento y se les indico la higiene oral a la hora del cepillado, el uso correcto de seda dental, enhebradores y cepillos interproximales. Cada cuatro semanas se realizó un análisis de cada paciente para establecer su estado de higiene y salud gingival y periodontal. En caso de encontrar inflamación o sangrado en alguno de los sujetos se han remitido al posgrado de Periodoncia y medicina oral en la Universidad el Bosque para realizar la terapia periodontal indicada.

Recolección de la muestra de fluido crevicular.

Para evaluar el nivel de expresión de los marcadores de remodelado óseo RANKL y OPG, se recolectó fluido crevicular de la zona disto vestibular, distal y disto platino del canino maxilar derecho teniendo claro que todas las muestras corresponderán al mismo diente. Dicho esto y a lo que corresponde este presente estudio, se tomó en 2 tiempos, la colocación de aparatología ortodóntica bracket convencional ROTH y MBT 0.022 (T0), un mes posterior a la colocación de la aparatología fija (T1); que corresponde a la fase de alineación y nivelación con un alambre de calibre 0.016 de níquel titanio. (Figura 1). Teniendo en cuenta las fases establecidas para un tratamiento de ortodoncia convencional y que la recolección de la muestra no representa ningún riesgo o alteración en el tratamiento del sujeto, todo esto para el beneficio de los sujetos seleccionados para el estudio.

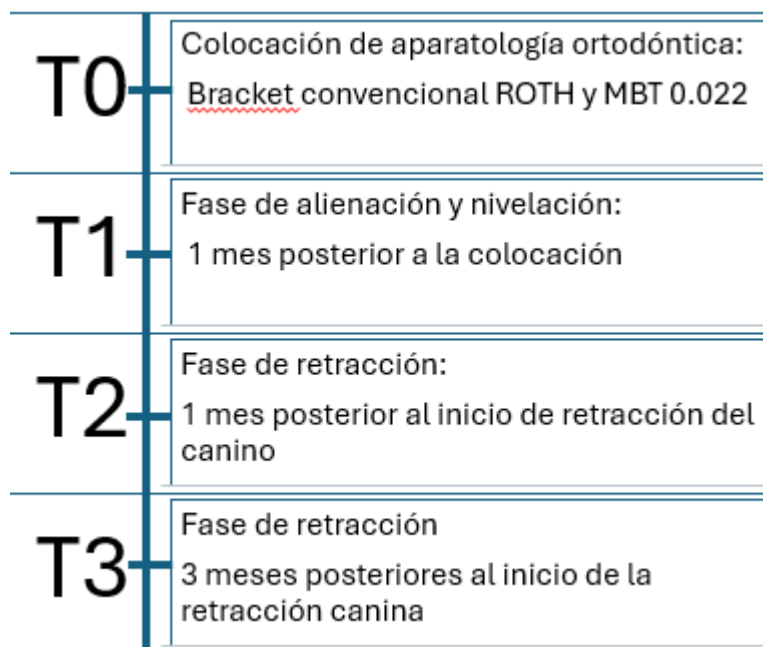


Figura 1. Esquema de los tiempos en los que se realizará la toma de fluido crevicular en ambos grupos: Grupo 1 Adolescentes, Grupo 2 Adultos. Diseñada por Lina María Escobar Márquez

La recolección de la muestra de fluido crevicular gingival (FCG) se llevó a cabo por las dos estudiantes encargadas del estudio, previo consenso con la directora del trabajo la Dra. Lina María Escobar Márquez, siguiendo el protocolo desarrollado por Rody et al, 2014. Se realizó remoción de placa bacteriana previa a la toma de la muestra, garantizando el control de placa de todos los pacientes durante las diferentes fases del tratamiento. Brevemente, la obtención de las muestras de fluido, se realizó:

- Remoción de placa bacteriana previa a la toma de la muestra.
- Aislamiento previo con rollos de algodón y secado con aire de las zonas distal, distovestibular y distopalatina del canino maxilar derecho que se retraerá.
- La recolección de FCG se obtuvo utilizando tiras de papel absorbente (Periopaper, Oraflow Inc, Plainview, NY) lo cual no representa ningún riesgo para el paciente o intervención en el tratamiento. La tira se colocó cuidadosamente en el surco gingival durante 60 s, evitando la contaminación con saliva o sangre.
- La tira se colocó en un tubo de 1.5 (Eppendorf) estéril y congelado a -80°C . Posteriormente, el fluido de las tiras de papel fue eludido utilizando 100 μl de buffer salino fosfato (PBS) y se agitó a temperatura ambiente durante 15 min.
- Luego, las tiras se retiraron cuidadosamente del tubo Eppendorf y el fluido se centrifugó 5 min a 3000 g para eliminar los detritos celulares y biopelícula bacteriana.
- El sobrenadante obtenido se recolectó para la evaluación de los marcadores RANKL y OPG, en cada uno de los tiempos.

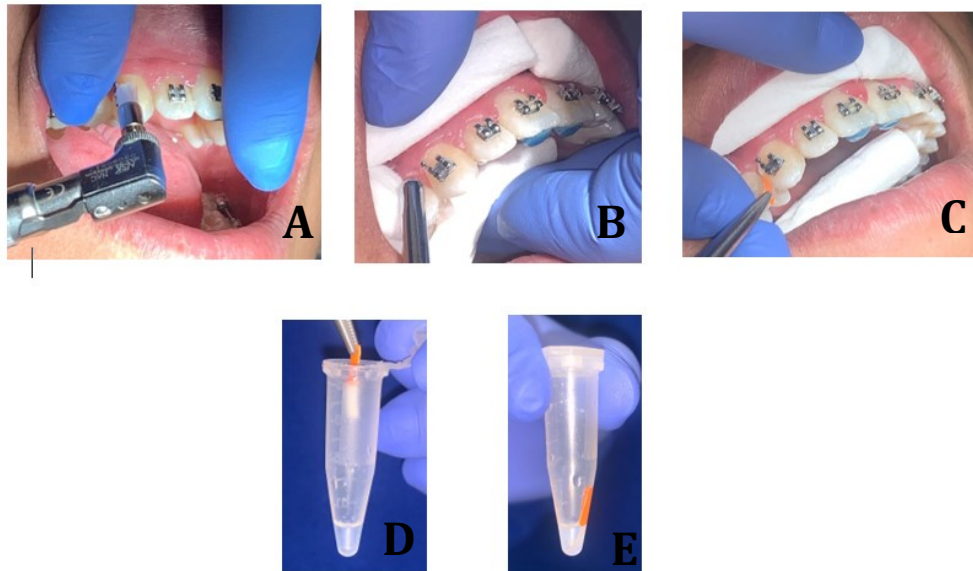


Figura 2. Recolección de muestra de fluido crevicular : (A): Remoción de placa bacteriana. (B) Aislamiento previo con rollos de algodón y secado con aire. (C) Extracción de FCG utilizando tiras de papel absorbente (Periopaper Oraflow Inc, Plainview, NY). (D) y (E) colocación de las tiras en un tubo de 1.5 ml estéril y congelado a -80°C . Fotos tomadas en las Clínicas Odontológicas de la Universidad El Bosque por Bohada Martínez & del Castillo Casas

Evaluación de la expresión de los marcadores RANKL y OPG.

A partir de las muestras de fluido crevicular previamente obtenidas se realizó la extracción del RNA utilizando el kit Quick-RNA MicroPrep (Zymo Research USA) según el protocolo del fabricante. El RNA obtenido fue cuantificado y se evaluó su calidad mediante un espectrofotómetro (Implen Nanophotometer USA).

Posteriormente, se obtuvo el DNA complementario (DNAc) por transcripción inversa utilizando el protocolo del kit ProtoScript II First Strand cDNA Synthesis (BIOHAUS S.A.S). Para determinar los niveles de expresión de RANKL y osteoprotegerina (OPG) se realizó la técnica reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-PCR) mediante el kit Luna Universal (New England Biolabs) y se utilizó el sistema de detección CFX96 Real-Time thermal cycler detection system (Bio-Rad; Hercules).

Las eficiencias de la PCR se calcularon con LinRegPCR (Academic Medical Center) y la cuantificación relativa de expresión se realizó siguiendo el método de Schefe, utilizando como gen housekeeping el gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa GAPDH (Schefe, 2006).

Mecánica de retracción canina

Durante (T2) un mes después del inicio de la retracción del canino se realizó colocando un módulo de resorte cerrado de 9mm light a una fuerza de 100gmf de níquel-titanio, calibrado con un dontrix dinamómetro, desde el hook del tubo del primer molar y se extendió hasta un pin quirúrgico ubicado entre lateral y canino, en arcos de acero 0.017x0.025.(Figura 2). La mecánica escogida genera fuerzas continuas y constantes durante un tiempo más prolongado por lo que proporciona un mejor control en el análisis de la expresión de biomarcadores en las muestras de fluido crevicular

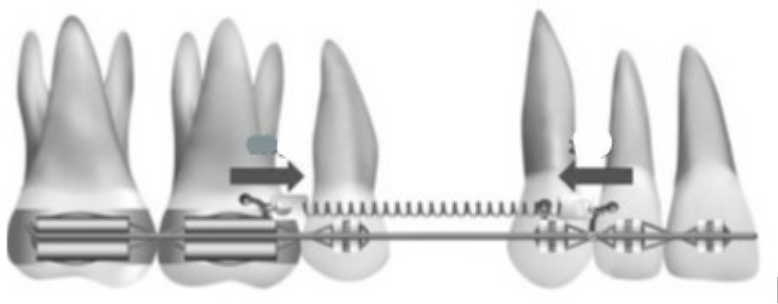


Figura 3. Retracción Del Canino. La retracción del canino se realizará mediante cadena continua, con una fuerza de 100 gr

Determinación de la tasa de retracción canina.

Para evaluar la tasa de retracción del canino, se tomaron impresiones de alginato al colocar la aparatología ortodóntica T0 y al 1er y 3er mes de retracción del canino (T2-T3). De acuerdo con el protocolo descrito previamente por Alikhani et al, 2018 se realizarán 3 medidas en la superficie palatina entre el canino y el lateral. Una medida será entre los bordes incisales, la segunda medida será en el centro de la corona y la tercera será en la superficie gingival de ambos dientes (Figura 3). Las distancias entre estos puntos se medirán con un calibrador digital. La cantidad de retracción se calculará promediando las distancias entre los diferentes puntos en cada tiempo de retracción. El error intraobservador se determinó mediante la medición de 10 modelos por el mismo observador con un intervalo de dos semanas entre las mediciones.

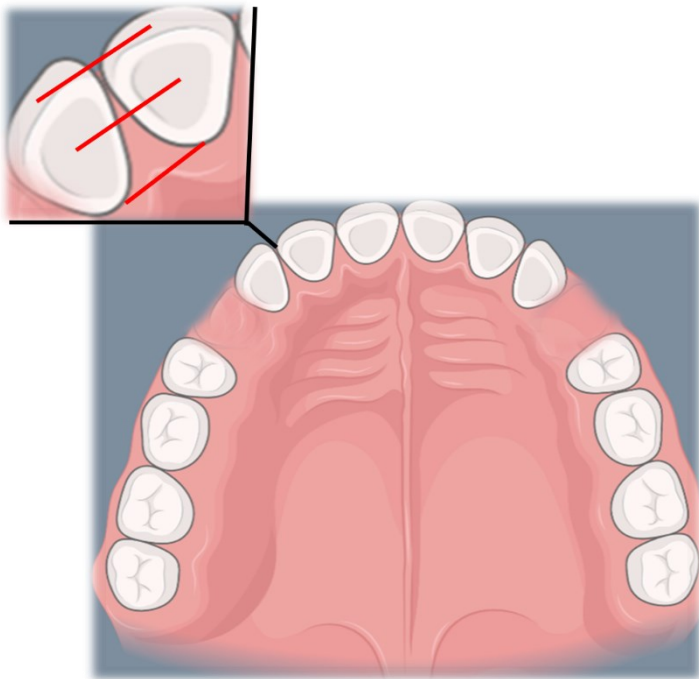


Figura 4. Evaluación del movimiento dental. En la imagen se observa las tres distancias (rayas rojas) que serán medidas y promediadas para establecer la tasa de movimiento en cada grupo, en los diferentes tiempos. Estas mediciones se realizarán entre el central y el lateral contiguos al canino en retracción

7.4 Hipótesis de estudio

Ho/ No existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de RANKL y OPG entre individuos jóvenes y adultos en las fases de alineación y retracción de caninos.

Ha/ Existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión de RANKL y OPG entre individuos jóvenes y adultos en las fases de alineación y retracción de caninos.

7.5 Análisis de los datos

Para el presente estudio se analizó la amplificación y eficiencia por medio del programa Linreg PCR donde se tuvo en cuenta la fase exponencial de las curvas y la fase de latencia y se realizaron 2 lecturas correspondientes a RANKL y OPG de forma individual para determinar el nivel de expresión en las muestras. Teniendo como control de expresión el gen gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa GAPDH.

Y para la línea de investigación completa se analizará la forma de distribución de las muestras mediante la prueba de Shapiro-Wilk. Para la comparación entre los grupos poblacionales (Jóvenes vs Adultos) si la distribución es normal se realizó comparación mediante la prueba de t test en cada uno de los tiempos, de lo contrario se utilizará la prueba de U Mann Whitney.

Para la comparación entre las fases de tratamiento si la distribución es normal se realizará la comparación mediante un ANOVA de medidas repetidas con post hoc de Tukey, de lo contrario si la distribución de los datos no es normal se utilizará test post-hoc deDunn.

En todos los casos los análisis se complementó con medidas de resumen dependiendo del tipo de distribución. Si los datos son paramétricos se utilizará promedio y desviación estándar (DE), y si son no paramétricos se expresarán mediante mediana y rango intercuartil. Un valor de $p < 0,05$ se considerará significativo entre los grupos experimentales. Todas las pruebas se realizarán mediante Stata MP 14.0

8. Consideraciones éticas.

8.1 Sustento legal.

Esta investigación se realizará bajo la RESOLUCIÓN NÚMERO 008430 DE 1993 la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para la investigación en salud, es muy importante tener en cuenta las consideraciones éticas de este proyecto de investigación basándonos en informes como el de Belmont o la declaración de Helsinki y llevar a cabo el cumplimiento de los principios éticos entre ellos el de respeto, beneficencia, justicia y no maleficencia con el objetivo de no realizar efectos negativos severos y garantizar que no se violen de ninguna manera los derechos de los pacientes.

Teniendo todo esto en cuenta, es importante aclarar que la ortodoncia que se va a aplicar se realizará de manera controlada, con fuerzas leves y constantes para poder evitar todos los efectos secundarios y así lograr mantener y preservar el bien común para los pacientes.

Los pacientes tendrán que autorizar el consentimiento informado, toda la información obtenida en este estudio se mantendrá estrictamente confidencial, con la excepción de que la ley requiera la información, bajo la custodia de la estudiante de posgrado de ortodoncia María Camila Bohada Martínez a cargo del estudio. Si existe alguna publicación como resultado de este estudio, el paciente no será identificado por su nombre, sino mediante un código de identificación con el fin de anonimizar los datos obtenidos.

Nivel de riesgo ético: Investigación con riesgo mínimo

8.2 Consentimiento informado

Aprobado y avalado por parte del comité de ética según Acta No. 017-2023 se puede consultar Anexo 1.

9. Resultados

Extracción de RNA a partir de muestras de fluido crevicular

Inicialmente se estandarizó la forma más adecuada y eficiente de obtener muestra para la amplificación por PCR a partir del fluido crevicular recolectado en los papeles absorbentes. Con este fin se diseñaron 4 metodologías diferentes de amplificación. En el método 1 y 2 se realizó extracción de RNA. En el método 1 y 3 se realizó retrotranscripción (RT) para la obtención de cDNA. En todos los métodos propuestos se realizó PCR, como se enumera a continuación.

Método 1: Extracción RNA+RT+PCR

Método 2: Extracción RNA+PCR

Método 3: No extracción+RT+PCR

Método 4: No extracción+No RT+ PCR

En cada método se determinó el umbral del ciclo o cycle threshold (CT) que hace referencia al número de ciclos en un ensayo de RT-PCR necesario para amplificar el RNA para alcanzar un nivel detectable.

Como se observa en la Figura 5 todos los métodos permitieron amplificación del gen RANKL de las muestras de fluido crevicular recolectadas con adecuados valores de CT para cada una de ellas; sin embargo, para la obtención de RNA puro y de la mejor calidad, se decidió utilizar el kit *Quick-RNA Microprep* para la extracción (Método 1). Este kit permite la unión del RNA a la columna de sílice y mediante tratamiento con DNAsa se elimina el DNA, obteniendo RNA de alta pureza.

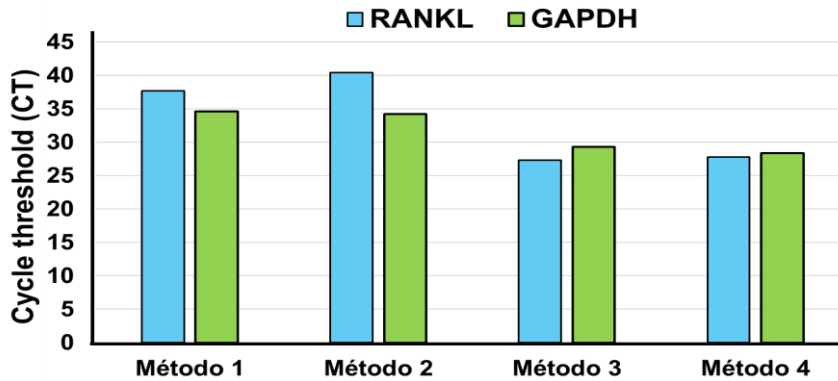


Figura 5: Valores de umbral del ciclo o cycle threshold (CT) obtenidos mediante diferentes métodos de obtención de muestras para amplificación por PCR

Mediante este método se obtuvo el RNA de cada muestra. Este RNA fue cuantificado y analizada su calidad y pureza, mediante la evaluación de las curvas espectrofotometría y la relación 260/280 obtenidas. Tabla 1, Figura 6. Diseñada por Lina María Escobar Márquez

Tabla 1. Determinación de la concentración y calidad del RNA obtenido de muestras de fluido crevicular. Diseñada por Lina María Escobar Márquez

Muestra	Concetración (ng/ul)	260/280
T0/1	5.20	1.9
T0/2	41.96	2
T0/3	17.96	1.8
T0/4	38.48	1.9
T0/5	29.16	1.8
T1/1	31.96	1.9
T2/1	29.32	1.8

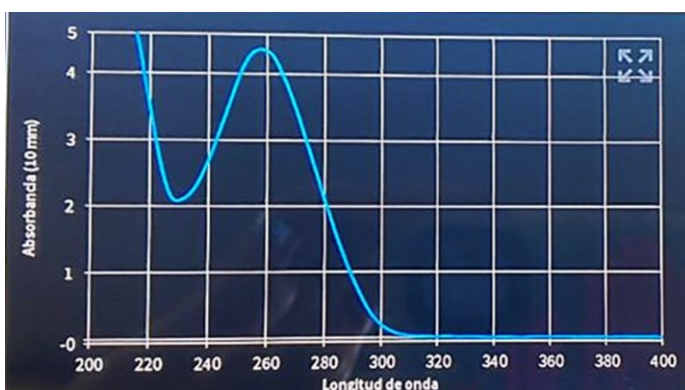


Figura 6. Cuantificación del RNA extraído a partir de muestras de fluido crevicular de individuos bajo tratamiento de ortodoncia. La concentración de ácido nucleico puede determinarse midiendo su absorbancia con un espectrofotómetro como el Nano Drop. La

absorbancia se mide a 260 nm (A260), donde los ácidos nucleicos absorben la luz con mayor intensidad. La cantidad de luz absorbida es proporcional a la cantidad de ácidos nucleicos en la muestra. Tomado de espectrofotometro del laboratorio UIBO

Análisis de la expresión del gen RANKL y OPG en individuos con tratamiento de ortodoncia T0 y T1

El RNA obtenido fue procesado para obtener cDNA y realizar la amplificación en tiempo real (RTqPCR) usando los primers previamente diseñados (Tabla 2).

Las condiciones de amplificación estandarizadas fueron: 3 min a 95°C y 50 ciclos de 10 s a 95°C, 30 s a 60°C y 20 s a 72°C, y finalmente, 5 s a 65°C y 5 s a 95°C.

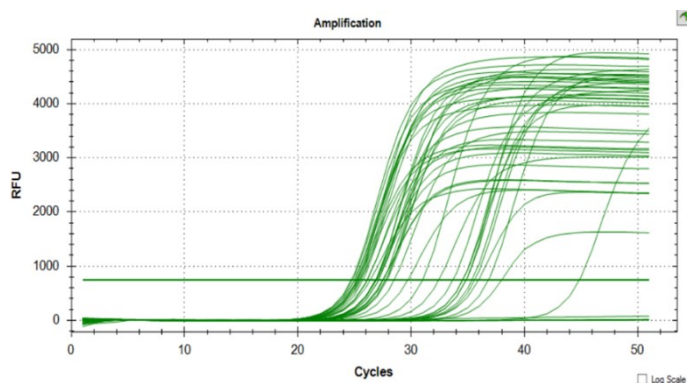
Los primers usados se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Secuencia de primers usados en este estudio. Diseñado por Lina María Escobar Márquez

GENE BANK	NOMBRE	FORWARD	REVERSE	AMPLICÓN
NM_002046.3	GAPDH	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'	226
NM_003701.3	RANKL	5'-GCCAGTGGGAGATGTTAGACTC-3'	5'-CCCCTTCAGATGATCCTTCA-3'	215
NM_002546.3	OPG	5'-AAGACCGTGTGCGCCCCTTG- 3'	5'-ACGCGGTTGTGGGTGCGATT-3'	137

Utilizando los primers diseñados y las condiciones de amplificación mencionadas, se logró la amplificación adecuada del gen RANKL y OPG en 5 individuos bajo tratamiento ortodóntico. Como se observa en la Figura 3 , la expresión de RANKL incremento en el T1 comparada con el T0; sin embargo, se observa un significativo incremento en OPG en el T1 (Figura 7).

A.



B

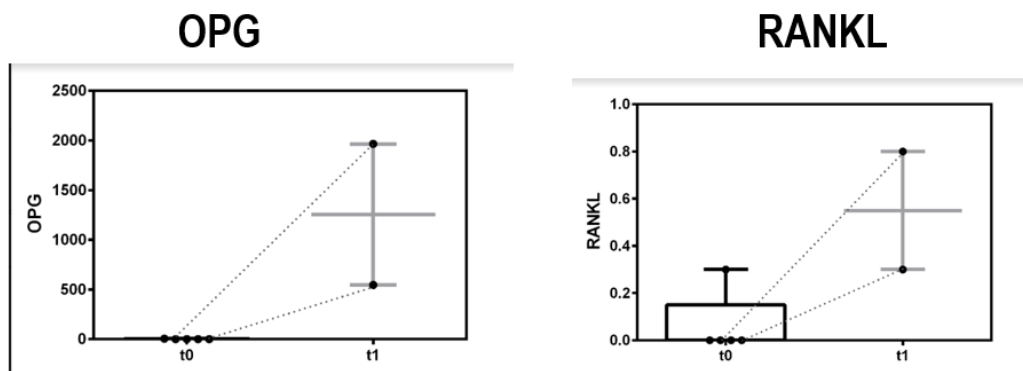


Figura 7. Cuantificación de la expresión relativa de los genes RANKL y OPG obtenidos de pacientes bajo tratamiento de ortodoncia. (A) Curvas de amplificación por RTqPCR de cada una de las muestras evaluadas. (B) Grafica de máximos y mínimos de la expresión de marcadores del metabolismo óseo como son RANKL y OPG durante el tiempo 0 (T0) que corresponde a 48 h después de la colocación de aparatos y Tiempo 1 (T1) después de 1 mes de inducido el movimiento dental. Análisis estadístico realizado por David Diaz Báez

10. Discusión

Perinetti et al., 2013 afirmaron en su estudio que la baja repetibilidad encontrada de los estudios FCG puede resultar de la variabilidad individual o de los procedimientos de recolección. Los autores informaron de errores de método en la actividad de los biomarcadores que oscila entre 40 y 58 %. Un nivel de error que puede generar en las interpretaciones erróneas de los datos.

El presente estudio busco estandarizar diferentes métodos para analizar biomarcadores como RANKL y OPG. Rody et al., 2014 menciona que la resorción ósea del ciclo de remodelación humano dura alrededor de 28-40 días, lo que concuerda con las diferencias de niveles de T0 y T1, ya que después de 48 horas de aplicada la fuerza (T0) se observa poca compresión del ligamento periodontal, a diferencia de (T1) donde se observa mayores expresiones de ambos biomarcadores. También se reporta que los niveles de OPG disminuyeron después de 6 semanas después del primer arco, contrario a los resultados obtenidos por el presente estudio donde se evidencia un aumento de OPG en T1 que corresponde a 4 semanas después de la colocación del primer arco.

Sin embargo, se debe tener presente que los resultados aquí mostrados son preliminares, dado que se buscaba una estandarización inicial de las técnicas, por lo que aun el tamaño de muestra no es el definitivo. Esto impidió realizar un análisis estadístico que permitiera determinar con certeza los cambios en la expresión de RANKL y OPG

11. Conclusiones

- Se concluyó que es importante el control previo de la placa antes de la toma de la muestra de FCG
- Las cantidades de muestra obtenida por cada paciente fue suficiente para realizar un análisis de la amplificación de los biomarcadores RANKL y OPG.
- Se logro estandarizar la extracción de RNA usando la extracción del RNA, la retrotranscripcion (RT) y posteriormente la PCR, ya que este permitió obtener mayor cantidad de RNA, con una calidad suficiente para realizar la PCR

11. Referencias

- Alikhani M, Chou MY, Khoo E, Alansari S, Kwal R, Elfersi T, et al. Age-dependent biologic response to orthodontic forces. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* [Internet]. 2018;153(5):632–44. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2017.09.016>
- Atkins GJ, Kostakis P, Pan B, Farrugia A, Gronthos S, Evdokiou A, et al. RANKL expression is related to the differentiation state of human osteoblasts. *J Bone Miner Res* [Internet]. 2003;18(6):1088–98. DOI: [10.1359/jbmr.2003.18.6.1088](https://doi.org/10.1359/jbmr.2003.18.6.1088)
- Belibasakis GN, Bostanci N. The RANKL-OPG system in clinical periodontology. *J Clin Periodontol* [Internet]. 2012;39(3):239–48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-051x.2011.01810.x>
- Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of bone tissue: Structure, function, and factors that influence bone cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:421746. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>
- Grant M, Wilson J, Rock P, Chapple I. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod* [Internet]. 2013;35(5):644–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1093/ejo/cjs057>
- Jablonski. Diccionario ilustrado de odontología. Editorial Medica Panamericana; 1995.
- Kawasaki K, Takahashi T, Yamaguchi M, Kasai K. Effects of aging on RANKL and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* [Internet]. 2006;9(3):137–42. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1601-6343.2006.00368.x>
- Krishnan V, Kuijpers-Jagtman AM, Davidovitch Z. Biological mechanisms of tooth movement. 3a ed. Krishnan V, Kuijpers-Jagtman AM, Davidovitch Z, editores. Standards Information Network; 2021.
- Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko C-C. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J Med Sci* [Internet]. 2018;34(4):207–14. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.kjms.2018.01.007>

- Lu, H. K., Chen, Y. L., Chang, H. C., Li, C. L., & Kuo, M. Y. Identification of the OPG/ RANKL system in gingival crevicular fluid and tissue of patients with chronic perio- dontitis. J Periodont Res. 2006;41:354–60.
- Otero L, García DA, Wilches-Buitrago L. Expression and presence of OPG and RANKL mRNA and protein in human periodontal ligament with orthodontic force. Gene Regul Syst Bio [Internet]. 2016;10:15–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4137/GRSB.S35368>
- Proffit WR, Fields HW, Sarver DM, editores. Ortodoncia contemporánea. 5 ed. Elsevier; 2014 p 530-95.
- RANK ligand - MeSH - NCBI [Internet]. Nih.gov. [citado el 12 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68053245>
- Rody WJ Jr, Wijegunasinghe M, Wiltshire WA, Dufault B. Differences in the gingival crevicular fluid composition between adults and adolescents undergoing orthodontic treatment. Angle Orthod [Internet]. 2014;84(1):120–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2319/012813-85.1>
- Rotti T, Smith MD, Hirsch R. Receptor activator NF jB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. Receptor activator NF jB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. J Per- iodont Res. 2003;38:380–7
- Tuncer BB. OPG-RANKL levels after continuous orthodontic force. Gazi Med J [Internet]. 2013; Disponible en: <http://dx.doi.org/10.12996/gmj.2013.09>

13. Anexos

UNIVERSIDAD EL BOSQUE

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Parte 1: Información acerca de la Investigación.

TÍTULO DE LA INVESTIGACIÓN: **COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN RANKL Y OPG EN ADOLESCENTES Y ADULTOS TRATADOS CON ORTODONCIA CORRECTIVA**

NÚMERO DE PROTOCOLO

NOMBRE DEL PATROCINADOR

NOMBRE DEL INVESTIGADOR PRINCIPAL: LINA M. ESCOBAR Odontóloga, M.Sc. Ortodoncista, perteneciente al grupo UMIMC, Unidad de Manejo Interdisciplinario de Malformaciones Cráneo-faciales, Facultad de Odontología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C. Teléfono: (1) 6489000 ext. 1256.

INTRODUCCIÓN

Usted ha sido elegido para participar de un estudio de investigación donde se evaluará la **COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN RANKL Y OPG EN ADOLESCENTES Y ADULTOS TRATADOS CON ORTODONCIA CORRECTIVA**. Para decidir si desea colaborar con la investigación usted recibirá una explicación detallada por parte mía. Si no entiende alguna palabra o procedimiento que se va a realizar con gusto estaré atenta a resolver cualquier duda, o puede tomarse su tiempo para averiguar y ampliar la información hasta que quede satisfecho con la explicación.

¿POR QUÉ SE ESTÁ HACIENDO ESTA INVESTIGACIÓN?

El objetivo de este estudio es determinar si hay cambios en la presencia de moléculas de inflamación entre personas adolescentes y adultas tratadas con brackets.

¿EN QUÉ CONSISTE ESTA INVESTIGACIÓN?

En esta investigación se busca comparar diferencias en moléculas que regulan el movimiento dental entre adolescentes y adultos que estén tratados con ortodoncia.

Para esto se recogerá fluido de la encía en la zona derecha del canino superior derecho, teniendo claro que todas las muestras corresponderán al mismo diente. Este se realizará

para evaluar los niveles de inflamación que se produce durante los movimientos generados por ortodoncia.

Dicho esto, se tomará en 4 tiempos: Tiempo 0 cuando se coloquen los brackets, Tiempo 1 se tomará 2 meses después de la colocación de los brackets, Tiempo 2 es un mes posterior al inicio del movimiento del canino superior y Tiempo 3 es a los tres meses posteriores al inicio del movimiento del canino superior.

Esta información obtenida permitirá establecer a futuro tratamientos ortodónticos más adecuados, de acuerdo con la edad de los pacientes, lo que generará beneficio de la población que requiera tratamientos ortodónticos.

¿QUÉ TENGO QUE HACER SI PARTICIPO EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Si usted está de acuerdo en hacer parte del estudio, lo único que deberá hacer es seguir las indicaciones dadas al inicio del tratamiento y permitir la recolección de fluido del canino superior derecho en los diferentes tiempos del tratamiento.

¿CUÁNTAS PERSONAS PARTICIPARÁN EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Se analizará dos grupos de individuos:

Grupo 1: Corresponderá a 11 individuos con un rango de edad de entre 14 y 17 años.

Grupo 2: Corresponderá a 11 individuos con un rango de edad entre 25 y 40 años.

Los individuos que harán parte del estudio serán de ambos sexos y serán individuos que están siendo atendidos en las clínicas odontológicas de la Universidad El Bosque.

¿CUÁNTO TIEMPO ESTARÉ EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Usted permanecerá tres meses en la investigación, pero como paciente se mantendrá en tratamiento de ortodoncia hasta su finalización, esto sin que la investigación influya en su plan de tratamiento de ortodoncia

¿PUEDO RETIRARME DE LA INVESTIGACIÓN DE MANERA VOLUNTARIA EN CUALQUIER MOMENTO?

Usted está de acuerdo en que su participación en este estudio es completamente voluntaria y que puede retirarse del mismo en cualquier momento. Esta decisión no generara ningún perjuicio para usted y la investigación.

¿QUÉ PASA SI ME RETIRO DE LA INVESTIGACIÓN?

No hay ningún inconveniente si Usted decide retirarse de la investigación.

¿CUÁLES SON LOS RIESGOS O INCOMODIDADES ASOCIADOS A ESTA INVESTIGACIÓN?

No existe ningún riesgo, efecto secundario o molestia asociada a la investigación, la extracción de fluido no representa ningún riesgo para el paciente ni tampoco interfiere de alguna manera sobre el tratamiento de ortodoncia.

¿OBTENDRÉ ALGUN BENEFICIO AL PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN?

Puede que por participar directamente en el estudio no haya beneficio para usted, pero es probable que su participación nos ayude a encontrar una respuesta a la pregunta de investigación.

¿QUÉ BENEFICIOS OBTENDRÁ LA COMUNIDAD DE ESTA INVESTIGACIÓN?

El beneficio que obtendrá la comunidad será a nivel del gremio académico e investigaciones futuras, ya que pueden surgir nuevas preguntas de investigación, por lo que estos resultados permitirán que generaciones futuras se beneficien de la información obtenida en esta investigación.

¿QUÉ OTRAS OPCIONES TENGO ADEMÁS DE PARTICIPAR EN ESTA INVESTIGACIÓN?

A pesar de que Usted decida no participar en la investigación, igualmente se le realizará el procedimiento odontológico para el cual usted asistió.

¿CÓMO SE VA A MANEJAR LA PRIVACIDAD Y CONFIDENCIALIDAD DE MIS DATOS PERSONALES?

Usted debe entender que toda la información obtenida en este estudio se mantendrá estrictamente confidencial, con la excepción de que la ley requiera la información, bajo la custodia de la estudiante del posgrado de Ortodoncia Maria Camila Bohada Martinez a cargo del estudio. Si existe alguna publicación como resultado de este estudio, usted no será identificado por su nombre, sino mediante un código de identificación.

¿QUÉ SUCEDERÍA SI NO SE RESPETA LA CONFIDENCIALIDAD DE MIS DATOS?

En ninguna circunstancia usted será identificado por su nombre durante el desarrollo de esta investigación ni en las publicaciones que de ella se deriven.

¿MI PARTICIPACIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN IMPLICA QUE VOY A RECIBIR ALGUN TIPO DE TERAPIA?

No, usted solo debe autorizar que se puede realizar la recolección de la muestra de fluido en la zona derecha del canino maxilar derecho en los diferentes tiempos del tratamiento de la ortodoncia convencional

¿TIENE ALGÚN COSTO MI PARTICIPACIÓN EN ESTA INVESTIGACIÓN?

No, usted solo deberá cancelar el costo del procedimiento ortodóntico, ya que la investigación será financiada por medio de recursos propios de los investigadores y recursos del grupo de investigación UMIMC de la Universidad El Bosque. Pero cabe destacar que de ser necesario algún tratamiento por alguna especialidad odontológica de la Universidad El Bosque, no será asumida por el proyecto de investigación, sino por el paciente.

¿RECIBIRÉ ALGUN TIPO DE COMPENSACIÓN O PAGO?

Participar como donante de la muestra de fluido crevicular gingival no le representará ninguna retribución económica.

¿CUÁLES SON MIS DERECHOS COMO SUJETO DE INVESTIGACIÓN?

A usted se le ha dado la oportunidad de preguntar acerca de este estudio y de su participación en él. Tiene derecho a que sus preguntas se respondan a su completa satisfacción. Usted debe hacer sus preguntas ahora, antes de firmar este documento o en cualquier momento después de firmarlo. Si usted desea alguna otra información o tiene preguntas acerca de los derechos de una persona que participa en investigación, puede contactar a los investigadores de la Universidad El Bosque en cualquier momento a los números de teléfono que se encuentran en la primera página de este documento.

¿CÓMO Y EN QUE MOMENTO VOY A CONOCER LOS DATOS FINALES DE LA INVESTIGACIÓN?

Al final de la investigación se le dará a los participantes que lo soliciten, información sobre los hallazgos significativos que ocurran durante el curso de la misma. Este será entregado de forma digital a quien lo solicite.

¿QUÉ HAGO SI TENGO ALGUNA PREGUNTA O PROBLEMA?

Usted puede llamar a los investigadores en caso de presentársele alguna pregunta.

INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL COMITÉ DE ÉTICA

Comité Institucional de Ética en Investigaciones, 648 9000 extensión 1520, comiteetica@unbosque.edu.co, Calle 132 No.7A-85.

INFORMACIÓN DE CONTACTO DEL GRUPO DE INVESTIGACIÓN

Nombre del investigador principal: LINA M ESCOBAR. Odontóloga, M.Sc. Ortodoncista, perteneciente al grupo UMIMC, Unidad de Manejo Interdisciplinario de Malformaciones Cráneo-faciales, Facultad de Odontología, Universidad El Bosque, Bogotá, D.C. Teléfono: (1) 6489000 ext. 1256.

Coinvestigadores:

Erika Martínez Saab, Teléfono: 6489000 ext. 1256

María Camila Bohada Martínez, Teléfono: 3125079474

María Camila del Castillo Casas, Teléfono: 3107563261

Ingrid Mora, Teléfono: 6489000 ext. 1256

Parte 2: Formulario de Firmas.

He sido invitado(a) a participar en el estudio “**COMPARACIÓN DE LA EXPRESIÓN RANKL Y OPG EN ADOLESCENTES Y ADULTOS TRATADOS CON ORTODONCIA CORRECTIVA**”

Entiendo que mi participación consistirá en permitir la recolección de fluido de la zona derecha del canino superior teniendo claro que todas las muestras corresponderán al mismo diente. Se me tomarán 4 veces: La primera vez cuando me pongan los aparatos de ortodoncia, la segunda vez dos meses después de puestos los aparatos, la tercera vez al mes de empezar a mover el canino y la cuarta vez tres meses después de mover el canino.

Entiendo que la firma de este consentimiento autorizará también el uso de las muestras obtenidas en investigaciones futuras de la misma índole, es decir, estudios que requieran estas mismas muestras para evaluar la relación o expresión de diferentes moléculas generados por el tratamiento de ortodoncia.

He leído y entendido este documento de Consentimiento Informado o el mismo se me ha leído o explicado. Todas mis preguntas han sido contestadas claramente y he tenido el tiempo suficiente para pensar acerca de mi decisión. No tengo ninguna duda sobre mi participación, por lo que estoy de acuerdo en hacer parte de esta investigación. Cuando firme este documento de Consentimiento Informado recibiré una copia de este (partes 1 y 2).

Autorizo el uso y la divulgación de mi información a las entidades mencionadas en este Consentimiento Informado para los propósitos descritos anteriormente.

Acepto voluntariamente participar y sé que tengo el derecho de terminar mi participación en cualquier momento. Al firmar esta hoja de Consentimiento Informado no he renunciado a ninguno de mis derechos legales.

Nombre del Participante

Firma del Participante y Fecha

Investigador principal

Firma del Investigador y Fecha
