

Regulación genética de la aceleración biológica del movimiento dentario ortodóncico



María Cadenas de Llano Pérula

TESIS DOCTORAL

Dpto de Estomatología,
Facultad de Odontología de Sevilla
Sevilla, Marzo 2014

Directores:

Dr. D. Alejandro Iglesias Linares,
Dr. D Enrique Solano Reina





**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGÍA**

TESIS DOCTORAL

Regulación genética de la aceleración biológica del movimiento dentario ortodóncico

María Cadenas de Llano Pérula

Universidad de Sevilla, Marzo 2014.

DIRECTOR Y CODIRECTOR

Dr. D. Alejandro Iglesias Linares

Dr. D. Jose Enrique Solano Reina

D. Jose Enrique Solano Reina, Catedrático de Ortodoncia de la Universidad de Sevilla y **D. Alejandro Iglesias Linares**, Profesor de la Universidad Complutense de Madrid, CERTIFICAN:

Que el trabajo presentado por Dña. María Cadenas de Llano Pérula bajo el título “*Regulación genética de la aceleración biológica del movimiento dentario ortodóncico*”, ha sido realizado bajo nuestra dirección como trabajo de investigación enmarcado en el programa de Doctorado que cursa la interesada.

Que el citado trabajo es original y cumple todos los requisitos éticos y formales, se ajusta con exactitud al método científico y es coherente con la trayectoria investigadora de su autora y con su proyecto de investigación.

Para que conste, a efectos académicos, firmo el presente certificado en Sevilla el día 14 de Marzo de 2014.

Fdo. D. Jose Enrique Solano Reina

Fdo. D. Alejandro Iglesias Linares

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría expresar mi gratitud a todas aquellas personas que, de un modo u otro, me han ayudado a completar la realización de este trabajo:

En primer lugar, al Dr. D. Enrique Solano Reina por aceptarme en la línea de trabajo de su grupo de investigación en Ortodoncia, dándome la posibilidad de llevar a cabo este proyecto. Junto a él quiero agradecer al resto de Profesores y Alumnos del Departamento de Estomatología de la Universidad de Sevilla, por fomentar siempre un buen ambiente de trabajo, en especial a Alejandro Iglesias Linares, por prestarme sin dudar su ayuda ante las dificultades, tratando siempre de encontrar soluciones y siendo una constante guía.

Al área de experimentación animal de la Universidad de Sevilla y a Genyo Granada, por su flexibilidad y ayuda durante la fase experimental, tanto con el ensayo con animales como con el trabajo de laboratorio.

Al Dr. Guy de Pauw y los profesores y alumnos del Máster de Ortodoncia de la Universidad de Gante (Bélgica) por acogerme como un miembro más durante tres meses en su departamento.

A mis amigos y compañeros, en especial a Débora Bueso, por su constante disposición a ayudarme en todo lo que les ha sido posible y por escucharme y estar ahí allanándome el camino; ésta tesis es tan mía como suya.

Finalmente, a mi familia, mis padres, mi hermano, y el resto de mi gran, gran familia, por quererme y apoyarme siempre, animándome a conseguir todos y cada uno de los retos que alguna vez me he fijado.

A todos, muchas gracias.

ÍNDICE

1. Introducción	17.
1.1. Bases biológicas del movimiento dentario ortodóncico	18.
1.1.1. Introducción histórica	18.
1.1.2. Alteraciones celulares debidas al estrés mecánico.	19.
1.1.2.1. Papel de la matriz extracelular en el movimiento dentario ortodóncico.....	21.
1.1.2.2. Papel del citoesqueleto en el movimiento dentario ortodóncico.....	22.
1.1.3. Teorías biológicas del movimiento dentario ortodóncico	23.
1.1.3.1. Teoría de la presión-tensión.....	24.
1.1.3.2. Teoría de la deformación ósea.....	24.
1.1.3.3. Teoría bioeléctrica.....	25.
1.1.3.4. Teoría mecanobiológica.....	26.
1.1.4. Fases del movimiento dentario ortodóncico	27.
1.1.5. Sistemas de regulación del movimiento dentario	28.
1.1.5.1. Regulación endocrina.....	28.
1.1.5.2. Regulación molecular de la osteoclastogénesis en el movimiento dentario...30.	
1.1.5.3. Regulación molecular de la osteogénesis en el movimiento dentario.....	31.
1.1.6. Implicaciones del tipo de fuerza ortodóncica	32.
1.1.6.1. Linealidad temporal de la fuerza.....	32.
1.1.6.2. Magnitud de la fuerza.....	33.
1.2. Expresión génica en el MDO	35.
1.2.1 Conceptos generales	35.
1.2.2. Microarray	40.

1.3. Osteoclasto, osteoblasto y osteocito.....	43.
1.3.1. El osteocito.....	43.
1.3.2. Vías de regulación osteoblasto/osteoclasto.....	46.
1.4. Células madre en el movimiento dentario ortodóncico.....	49.
1.4.1. Biología de las células madre.....	49.
1.4.2. Evolución en la investigación con células madre.....	54.
1.4.3. Usos para la regeneración de tejidos.....	59.
1.4.4. Revascularización.....	61.
1.4.5. Células madre y regulación del movimiento dentario.....	62.
1.5. Métodos de modificación del movimiento dentario ortodóncico...64.	
1.5.1. Métodos de deceleración del movimiento dentario ortodóncico...65.	
1.5.1.1. Químicos.....	65.
1.5.2. Métodos de aceleración del movimiento dentario ortodóncico...69.	
1.5.2.1. Químicos.....	69.
1.5.2.2. Quirúrgicos.....	73.
1.5.2.3. Láser de baja frecuencia.....	81.
1.5.2.4. Campos magnéticos.....	84.
1.5.2.5. Terapia génica.....	85.
2. Hipótesis de trabajo.....	89.

3. Objetivos.....	93.
3.1. Objetivos generales.....	94.
3.2. Objetivos específicos.....	95.
4. Material y Métodos.....	97.
4.1. Búsqueda bibliográfica.....	98.
4.1.1. Protocolo de búsqueda.....	98.
4.1.2. Fuentes de información.....	98.
4.1.3. Estrategia de búsqueda.....	98.
4.1.4. Criterios de selección.....	99.
4.1.5. Selección de los artículos.....	99.
4.1.6. Recolección de los datos.....	100.
4.1.7. Determinación del riesgo de sesgo en artículos individuales.....	100.
4.1.8. Análisis de los datos.....	101.
4.2. Diseño del estudio experimental.....	101.
4.2.1. Diseño experimental <i>in vivo</i>	101.
4.2.1.1. Distribución muestral.....	101.
4.2.1.2. Selección, diseño e instalación de la aparatología.....	103.
4.2.1.3. Procedimiento quirúrgico: Corticotomía.....	104.
4.2.2 Registros clínicos de movimiento dental.....	105.
4.2.3 Sacrificio de los especímenes y toma de muestras de tejido óseo...106.	

4.3. Procesamiento y análisis muestral	106.
4.3.1. Extracción de ARN del tejido óseo	106.
4.3.2. Microarray de expresión génica	108.
4.3.2.1. Preprocesado.....	109.
4.3.2.2. Normalización y cálculo del Ct.....	109.
4.3.2.3. Expresión, diferenciación y cálculo del DD _{Ct}	110.
4.3.2.4. Análisis de agregación.....	110.
4.3.3. Procedimientos histológicos	111.
4.4. Análisis estadístico y bioinformático	112.
5. Resultados	114.
5.1. Resultados de la revisión bibliográfica sistemática	115.
5.2. Registros clínicos de movimiento dentario ortodóncico	117.
5.3. Resultados del procesado <i>in vitro</i> y preparación muestral	119.
5.3.1. Resultados del aislamiento, cuantificación y calidad del ARN	119.
5.3.2. Resultados del preprocesado de las muestras de ARN para determinación de expresión mediante array	121.
5.3.3. Resultados del array de expresión génica tras inducir movimiento dentario ortodóncico	122.
5.3.3.1. Expresión génica a las 24 horas.....	124.
5.3.3.2. Expresión génica a los 3 días.....	125.
5.3.3.3. Expresión génica a los 7 días.....	125.
5.3.3.4. Expresión génica a los 12 días.....	126.

5.4. Resultados histológicos.....	126.
6. Discusión.....	129.
7. Conclusiones Finales.....	147.
8. Referencias bibliograficas.....	151.
9. Anexos.....	184.
9.1. Comité Ético de Experimentación Animal.....	186.
9.2. Lista completa de genes para Taqman® Array.....	187.
9.3. Informe de calidad del ARN.....	189.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Bases biológicas del movimiento dentario ortodóncico.

1.1.1. Introducción histórica.

La evolución del conocimiento acerca de las bases biológicas sobre las que se sustenta el movimiento dentario inducido ortodóncicamente, ha sido tan larga y prolífica como la de la ciencia misma, y su avance ha dependido en gran medida del desarrollo tecnológico de los métodos de visualización y análisis.

La primera referencia bibliográfica que encontramos de movimiento dentario inducido es la descrita en el año 1 D.C. por Celso ⁽¹⁾, que recomendaba presión digital para mover los dientes, y hasta el siglo XVII no encontraremos la primera descripción de un aparato ortodóncico, que realizó Fauchard ⁽¹⁾, proponiendo la unión de las piezas dentales a un arco de alambre.

Pero no sería hasta el siglo XVIII cuando Hunter ⁽²⁾ daría la primera explicación biológica acerca del movimiento dental, estableciendo que bajo presión mecánica, el hueso ofrecía “una reacción”, definida posteriormente por Delabarre ⁽³⁾ en el siglo XIX como un proceso inflamatorio. Farrar ⁽⁴⁾, en 1888 fijó la remodelación del hueso alveolar como causa subyacente del movimiento de los dientes sometidos a fuerza ortodóncica, y Wolf ⁽⁵⁾ en 1892 estableció que la arquitectura interna del hueso neoformado dependía de la magnitud y dirección de las fuerzas que actuaban sobre él.

Más tarde, ya en el siglo XX, se publicaron los primeros ensayos en animales que incluían informes acerca de la histomorfología ósea. Sandstedt ⁽⁶⁾ en 1904, utilizó un perro como modelo animal para demostrar que los cambios inducidos por las fuerzas mecánicas sobre los dientes tienen su efecto sólo sobre el ligamento periodontal y sobre el hueso alveolar inmediatamente adyacentes, y que tres semanas después de la aplicación de la

fuerza se da un nuevo crecimiento óseo en el lado de tensión y un proceso reabsortivo en el lado de compresión, ocurriendo muerte celular cuando la fuerza es demasiado intensa.

Oppenheim (7) en 1910 ofreció sin embargo unos datos que contradecían la afirmación inicial de Sandstedt, constatando que los cambios se daban en todo el hueso alveolar creándose un nuevo tipo óseo que se trabeculaba en la dirección de la fuerza aplicada. Sin embargo, al estar realizada su investigación sobre un simio cuya dentición era aún decidua, la comunidad científica de la época achacó sus resultados más al crecimiento y erupción propia de los dientes y las bases óseas que al movimiento ortodóncico propiamente dicho.

Entre 1941 y 1944, Sicher (8) y Weinemann (9) establecieron que el movimiento de erupción dental se debía al crecimiento conjunto del cemento radicular y el hueso alveolar. Fue un trabajo pionero que descartaba el papel pasivo que anteriormente se había adjudicado al hueso en cuanto al movimiento dentario. En 1957, Fukada y Yasuda (10) publicaron que, en presencia de presión mecánica, las células óseas manifestaban una serie mensurable de cambios de potencial de membrana en áreas de tensión y compresión, hallazgo que, como veremos, sería posteriormente de gran relevancia.

Reitan (11), publicó entre los años 50 y 80 una gran cantidad de estudios en animales centrándose en la histología y estableciendo definitivamente que las células del ligamento periodontal proliferan en áreas de tensión y sufren una lenta reabsorción en lugares de presión.

1.1.2. Alteraciones celulares debidas al estrés mecánico.

Durante el siglo XIX, se trataba de discernir cuál era la causa real del movimiento dentario inducido mediante fuerzas mecánicas externas, y se proponían dos hipótesis básicas: que fuera responsable el efecto de tensión/presión sobre el ligamento periodontal o

que el movimiento fuera realmente fruto de una remodelación en el seno del hueso alveolar. Posteriormente, ya en el siglo XX, se extendió la hipótesis de que estos dos procesos se daban de forma concomitante, y que era la respuesta celular a la aplicación de fuerzas mecánicas externas la que provocaba tal remodelación.

Según describió Davidovitch ⁽¹²⁾ en 1991, las fuerzas mecánicas alteran la estructura celular creando una distorsión estructural en la matriz de colágeno que provoca la cristalización de los filamentos del citoesqueleto y abre los canales iónicos transmembrana. La generación de estos fenómenos bioeléctricos (potenciales generados por estrés y potenciales de flujo) alteran la carga de la membrana produciendo respuestas osteogénicas, como ya vaticinaban Fukada y Yasuda ⁽¹⁰⁾.

Se ha sugerido que la matriz de proteoglicanos de la célula animal sea la que posibilite que pequeñas alteraciones en la membrana provoquen cambios de potencial, lo cual se ha denominado “strain memory” o memoria de deformación. Además, no sólo las señales mecánicas sino también las químicas (endo, para y autocrinas) son capaces de alterar las células del ligamento periodontal, lo cual es consistente con la teoría de Storey ⁽¹³⁾ de que el intervalo de fuerzas óptimas para el ser humano varía dependiendo de los cambios hormonales.

Cuando se ejerce presión sobre el diente, hay una alteración de los fluidos en el ligamento periodontal que distorsiona la célula y la matriz ósea, liberando neurotransmisores vasoactivos que activan a los leucocitos, los cuales segregarán citoquinas y factores de crecimiento en los capilares adyacentes, alterando el ligamento y remodelando el alveolo mediante un proceso de reabsorción y aposición ósea que posibilitará el movimiento ortodóncico. Hay, por tanto, muchos tipos celulares implicados en este proceso: células del sistema nervioso, inmune y endocrino; haciendo de esta un área muy amplia donde debe estarse atento a las innumerables interacciones de fenómenos físicos, celulares y moleculares.

Todos los tipos celulares son capaces de reaccionar ante estímulos mecánicos, ya sea intra o extracelulares (14), y en el caso de la aplicación de fuerzas ortodóncicas, las células de la pulpa, el ligamento periodontal (LPD), los tejidos gingivales y alveolares se ven afectados, siendo estos efectos tanto físicos como químicos y frecuentemente interdependientes unos de otros.

Heneman y col. (15) en su artículo de 2008 proponían que el orden de sucesión de los acontecimientos celulares tras la aplicación de carga mecánica era: deformación de la matriz extracelular y movimiento de fluidos; deformación celular; activación y diferenciación celular; y por último remodelación de tejidos. La respuesta bioquímica adaptativa tras la aplicación de las fuerzas ortodóncicas es un proceso altamente complejo. Se produce un entramado de reacciones en las células del ligamento periodontal y del hueso alveolar que traducen la presión mecánica en cambios moleculares y en MDO en última instancia. Estas reacciones, según Masella y Meister (16) se dan a cinco niveles distintos: la matriz extracelular, la membrana celular, el citoesqueleto, las proteínas de la matriz celular y el genoma.

1.1.2.1. Papel de la matriz extracelular en el movimiento dentario ortodóncico.

La matriz extracelular (ECM) es el sustrato principal en el que se dan las señales mediante las que se controlan y regulan los cambios en la forma de la célula, los procesos de adhesión y proliferación y por tanto los cambios morfológicos que tienen lugar en los tejidos. Según Holliday y col. (17) en su artículo de 2005, cuando hay una ausencia de contacto del diente con su antagonista se dan una serie de reacciones en el periápice que preceden al movimiento dental, y en ese momento, la expresión de algunos de los genes específicos de la matriz aumenta (como los de la elastina o la tenascina C) mientras que la expresión de otros disminuye (laminina, catepsina D y metaloproteinasa 11).

Los proteoglicanos por tanto, tendrían un papel significativo durante el movimiento dentario ortodóncico: la acción concomitante de los biglicanos y la elastina daría lugar a la formación de nuevas fibras elásticas ligamentosas, mientras que la tenascina se ha relacionado con la respuesta del ligamento periodontal a las fuerzas mecánicas (18). Estas glicoproteínas están en su mayor parte controladas o mediadas por los factores de crecimiento de la matriz extracelular, especialmente el GF-9 de los fibroblastos que se asocia con la formación ósea a este nivel.

Otras proteínas de la matriz implicadas en este proceso son las metaloproteinasas (MMPs, que son mediadores del crecimiento y migración celular durante el MDO), la catepsina D (asociada a la función de células específicas como los odontoclastos) y la laminina. Esta última es un componente importante de la ECM que aparece disminuido cuando hay movimiento dental. Holliday y col. (17) proponen por tanto que la desintegración de la laminina podría facilitar el movimiento dental.

Cuando aparecen fuerzas mecánicas externas, se produce en la matriz extracelular una cascada de cambios gravitacionales que afecta el equilibrio de fuerzas existente entre esta y las células, desencadenando un cambio en la expresión génica y en última instancia en la producción de proteínas. Son muchas (19) las moléculas implicadas en este proceso (colágeno en gran medida, proteoglicanos, laminina, fibronectina, elastina, ácido hialurónico) que actúan mediante la unión a las fosas de adhesión celular haciendo que las señales se transfieran al interior de la célula.

1.1.2.2. Papel del citoesqueleto en el movimiento dentario ortodóncico.

El citoesqueleto está constituido por tres estructuras moleculares que son las que controlan la forma celular: microfilamentos, microtúbulos y filamentos intermedios. Los microfilamentos conectan proteínas de la membrana celular con las de la membrana nuclear, transfiriendo las fuerzas mecánicas desde la matriz extracelular hacia dentro de la

célula, y de nuevo hacia la matriz a través de integrinas y a las células adyacentes a través de cadherinas.

Este fenómeno se denomina “Tensegrity” (integridad celular dependiente de la tensión) y cuando no se mantiene, se produce la muerte celular (20). Un citoesqueleto laxo será menos eficiente en la transmisión de señales tanto al núcleo como a células adyacentes que un citoesqueleto con mayor tensión.

Las células son, por tanto, más sensibles a las señales externas cuando el balance de tensión externo e interno es parecido que cuando el interno es mucho menor, ya que cambios externos no producirían la alteración esperada en el interior celular. (21)

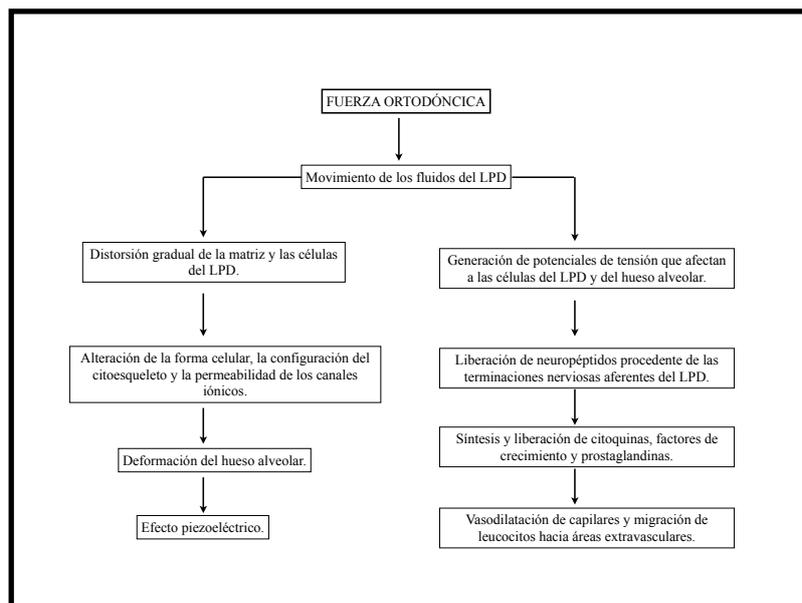


Figura 1. Descripción del proceso de diferenciación osteoblástica. (12)

1.1.3. Teorías biológicas del movimiento dentario ortodónico.

El movimiento dentario ortodónico se ha definido como una respuesta biológica del complejo dentofacial ante la acción de una fuerza externa (22). El funcionamiento de

esta respuesta biológica se ha intentado dilucidar a lo largo de todo el siglo XX, surgiendo cuatro teorías que podemos considerar como principales.

1.1.3.1. Teoría de la presión-tensión.

En el lado de presión, el ligamento periodontal se desorganiza y decrece la producción de fibras, ralentizándose la replicación celular debido al parecer a una disminución en la vascularización (23). En el lado de tensión, el estiramiento de las fibras del ligamento periodontal aumenta la replicación celular, incrementándose la producción de fibras, hipótesis avalada por las teorías de Sansted (6), Oppenheim (7) y Schwartz (24) expuestas durante el primer cuarto del siglo XX.

Histológicamente se observa que cambios en la anchura del ligamento periodontal causan una alteración en las poblaciones celulares aumentando su actividad, rotura de las fibras de colágeno y evidencia de daño tisular. (25) Debido a esto, los macrófagos y osteoclastos de áreas cercanas invaden el tejido necrótico y lo eliminan, proceso que conocemos como reabsorción (26). Según Reitan (27) estos procesos ocurren incluso aunque la aplicación de fuerza sea mínima, y se dan en mayor medida cuanto más corta sea la raíz del diente.

Según este autor, la remodelación se llevaría a cabo en tres fases; una reabsorción frontal o directa (en el LPD y hueso inmediatamente adyacentes), una reabsorción profunda o indirecta y una pérdida de masa ósea en las zonas de presión y aposición ósea en zonas de tensión, siendo esta sucesión de eventos el eje central de la teoría de presión-tensión.

1.1.3.2. Teoría de la deformación ósea.

Baumrind (23) consideraba que el ligamento periodontal funcionaba como un sistema hidrostático continuo que se regía por tanto por la ley de Pascal, por lo que

cualquier fuerza que recibiera, sería transmitida por igual en todas las zonas, afirmación que entraba en clara contradicción con la Teoría de Presión-Tensión.

Sin embargo, tuvo que reconocer que las estructuras que rodea el periodonto son sólidas (dientes, hueso, algunas fracturas sólidas del LPD) por lo que debido a las distintas densidades, la fuerza podría no difundir homogéneamente, pudiendo la presión ser diferencial. Debido a esto, enunció la teoría de deformación del hueso alveolar en 1969, basándose en que la fuerza ortodóncica induce una reorganización ósea, y que la tensión que esto crea es la que modifica el ligamento periodontal. La fuerza ejercida sobre la superficie ósea se disipa en el hueso creando líneas de estrés, y tal deformación aceleraría los procesos de renovación celular. (28)

Esta teoría explicaría hechos como la disminución de la velocidad cuando el diente debe moverse en masa y la relativa rapidez de la resolución del apiñamiento en zonas con menor grosor óseo, así como la mayor velocidad del movimiento dental cerca de un alveolo post-extracción y la aceleración ortodóncica aumentada en niños, donde el hueso es menos calcificado y más flexible que en adultos. Sin embargo, la hipótesis de deformación ósea entra en contradicción con el dogma ortopédico (29) en el que se postula que cualquier fuerza compresiva estimulará la reabsorción ósea mientras que la tensión producirá osteogénesis.

1.1.3.3. Teoría bioeléctrica.

En 1962, Basset y Becker (30) propusieron que tras la aplicación de fuerza mecánica se generaban potenciales eléctricos en los tejidos que movilizaban iones a través de las membranas. Zengo y col. (31) establecían que la zona cóncava del alveolo era electronegativa, lo cual potenciaba la actividad osteoblástica, mientras que en las superficies convexas había neutralidad o positividad eléctrica, lo cual favorecía la osteoclastogénesis.

La piezoelectricidad es un fenómeno que se da en estructuras cristalinas tanto orgánicas como inorgánicas cuando se deforma la estructura, ya que se crea un flujo de electricidad y tráfico de electrones de un lugar a otro (32). Sin embargo, este fenómeno presenta dos propiedades que no se ajustan al movimiento dentario: decae inmediatamente y se da una señal en sentido contrario a la aplicación de la fuerza, como respuesta a la primera.

Borgens (33) determinó que el hueso no sigue estrictamente este patrón, debido a la complejidad de su estructura, compuesta de matrices mineralizadas y no mineralizadas. Sí observó sin embargo la creación de corrientes iónicas endógenas en huesos de ratones, que se comportaban más como potenciales por tensión que como piezoelectricidad, ya que estos se ajustan más al MDO, presentando periodos de duración más largos.

Pollack y col. (34) sugerían que el hueso estaba rodeado de una membrana con carga eléctrica y que los cambios de potencial alterarían la carga de las membranas celulares. Davidovitch y col. (35) propusieron que en tejidos hidratados los potenciales por estrés o tensión predominan, y que alteraciones de 1 minuto al día eran suficientes para crear una respuesta osteogénica, atribuyendo este hallazgo a la memoria de tensión de la matriz celular de proteoglicanos.

1.1.3.4. Teoría mecanobiológica.

Cuando se aplican fuerzas mecánicas, las células, así como la matriz extracelular del ligamento periodontal y el hueso alveolar responden de forma concomitante, resultando en una remodelación de tejidos. Durante fases tempranas, los fluidos del ligamento periodontal se ven afectados, produciéndose distorsión celular y de la matriz, e interaccionando entre ellas. (12) En respuesta a estos fenómenos físico-químicos, se liberan citoquinas, factores de crecimiento, factores estimuladores de colonias y neurotransmisores

vasoactivos, iniciando y manteniendo la remodelación, hecho por el cual se posibilita el MDO en última instancia. (36)

1.1.4. Fases del movimiento dentario ortodóncico.

En 1966 Burstone (37) determinó que existían tres fases en el movimiento dentario ortodóncico. La fase inicial se caracteriza por un movimiento rápido inmediatamente secundario a la aplicación de fuerza, debido al movimiento del diente en el espacio del ligamento periodontal. Se produce en esta primera fase una compresión de las fibras del ligamento, iniciándose el reclutamiento de progenitores de osteoclastos y osteoblastos en los lugares de presión y tensión respectivamente. También ocurre una extravasación de células inflamatorias.

Esta primera etapa va seguida por una segunda de latencia, con bajas tasas de movimiento o no movimiento dentario. Se ha propuesto que esto podría deberse a la hialinización que ocurre en el lado de compresión. Esta fase no terminaría hasta que las células renovaran todo el tejido necrótico. Se distinguen bien a este nivel las áreas de compresión por la distorsión de las fibras del ligamento periodontal, lo cual interrumpe el aporte sanguíneo provocando la hialinización e interrumpiendo el movimiento dentario. (38)

Aparecen macrófagos y osteoclastos de áreas adyacentes no dañadas que eliminan el tejido necrótico e inician la reabsorción ósea en el lado de presión. Mientras, en el lado de tensión, osteoblastos quiescentes comienzan a activarse, produciendo nueva matriz osteoide. Se reclutan también progenitores de osteoblastos de las poblaciones de fibroblastos cercanas a los capilares que rodean al LPD. Después de esto, se daría una tercera y última fase de post-latencia, con un aumento gradual de movimiento.

Sin embargo, los estudios de Vas Leeuwen y col. (39), dividen el MDO en cuatro fases, siendo la primera y segunda similares a las propuestas por Burstone (37). La primera

tendría una duración de 24 horas a dos días, y correspondería al movimiento inicial del diente en el alveolo. La segunda duraría de 20 a 30 días y no habría movimiento dentario, debido a los procesos anteriormente expuestos.

En las fases tercera y cuarta, denominadas respectivamente de aceleración y lineal, tendría lugar un aumento del movimiento dentario tras la remoción del tejido necrótico inicial, encontrándose fibras de colágeno desorganizadas, y superficies óseas irregulares. Este período comenzaría a los 40 días de la aplicación de la fuerza y comprendería la mayor parte del tratamiento ortodóncico.

Melsen ⁽²⁹⁾ hipotetizaba que la reabsorción ósea era un procedimiento continuo a lo largo de todo el movimiento dentario, y que no constituía una reacción a la fuerza, sino el intento de los tejidos de eliminar los restos necróticos.

1.1.5. Sistemas de regulación del movimiento dentario.

1.1.5.1. Regulación endocrina.

El metabolismo del calcio está regulado por la hormona paratiroidea (PTH), los metabolitos de la Vitamina D y la Calcitonina. Cuando los niveles de calcio sérico están disminuidos, la PTH estimula la resorción ósea, aumentando la reabsorción renal de calcio y fomentando la conversión de la vitamina D hacia su metabolito activo (hidroxilación de 25 dihidroxicolecalciferol en 1,25 dihidroxicalciferol) que es un potente estimulador de la reabsorción ósea. ⁽⁴⁰⁾

El calcio sérico regula la secreción de PTH a través de un mecanismo de retroalimentación: la hipocalcemia estimula la liberación de PTH mientras que la hipercalcemia la suprime. La vitamina D se absorbe a través de los alimentos y se sintetiza

en la piel tras la exposición solar; su metabolito activo (1,25 DHCC) aumenta el calcio sérico; además aumenta la absorción de fosfato por el intestino.

Se ha considerado por tanto que la vitamina D juega un papel importante en el MDO, ya que interviene en el equilibrio homeostático del calcio, por lo que algunos estudios como el de Kawakami y col. (41), proponen su uso mediante inyección intragingival con el fin de acelerar el movimiento dentario, ya que, según este grupo, es un potente estimulador de la reabsorción ósea, diferenciando precursores en osteoclastos y aumentando la actividad de los ya existentes.

En esta misma línea, experimentos como los llevados a cabo por Soma y col., proponen la aplicación de PTH con fines similares. En 1999 (42) sugerían su aplicación sistémica y en 2000 (43) su aplicación local, aunque esta debía ser administrada de forma continuada, diariamente durante al menos un mes, lo que dificultaba su aplicación clínica. Aunque es cierto que la administración local disminuye en gran medida la dosis necesaria, no pueden ignorarse los riesgos inherentes a la aplicación de una hormona en un paciente por lo general adolescente.

Xu y col. (44) repasaron la relación entre la remodelación ósea y otras hormonas como el estrógeno, que mediante su unión a receptores periodontales promueve la formación ósea e inhibe la reabsorción, y sus fluctuaciones pueden variar los niveles séricos de algunos marcadores óseos.

Según su hipótesis, si nos centráramos en aplicar la fuerza ortodóncica en fases del ciclo hormonal con bajos niveles de estrógeno, podríamos acelerar el movimiento dentario.

1.1.5.2. Regulación molecular de la osteoclastogénesis en el movimiento dentario.

La regulación de la osteoclastogénesis se ve inducida principalmente por dos procesos; el daño tisular, que desencadenará un proceso inflamatorio, y la deformación del hueso alveolar, que generará señales bioeléctricas. (45) La inflamación conlleva un aumento de citoquinas (especialmente interleuquina 1(IL1), IL6 y factor de necrosis tumoral, TNF α) que actuarán de forma sinérgica con la síntesis de prostaglandinas para iniciar la reabsorción ósea, estimulando la diferenciación de progenitores en osteoclastos.

El sistema RANK/RANKL/OPG es otro de los mecanismos de regulación de la actividad osteoclástica, ya que, según Kanzaki y col. (46), las fuerzas compresivas estimulan la expresión de RANKL (Ligando del Receptor Activador del factor Nuclear Kappa) a través de la prostaglandina tipo 2, (PGE₂) lo cual promocionará la osteoclastogénesis, mientras que la transferencia génica de osteoprotegerina (OPG) local a los tejidos circundantes tendrá un efecto inhibitorio sobre el osteoclasto y por tanto sobre el MDO. (47) Las fuerzas mecánicas son recibidas en la superficie del osteoclasto por moléculas que actúan como receptores (integrinas, proteínas de adhesión y citoesqueleto) que activan las vías de la kinasa y la caspasa promoviendo la apoptosis del osteoclasto y provocando una necrosis secundaria del tejido. (48)

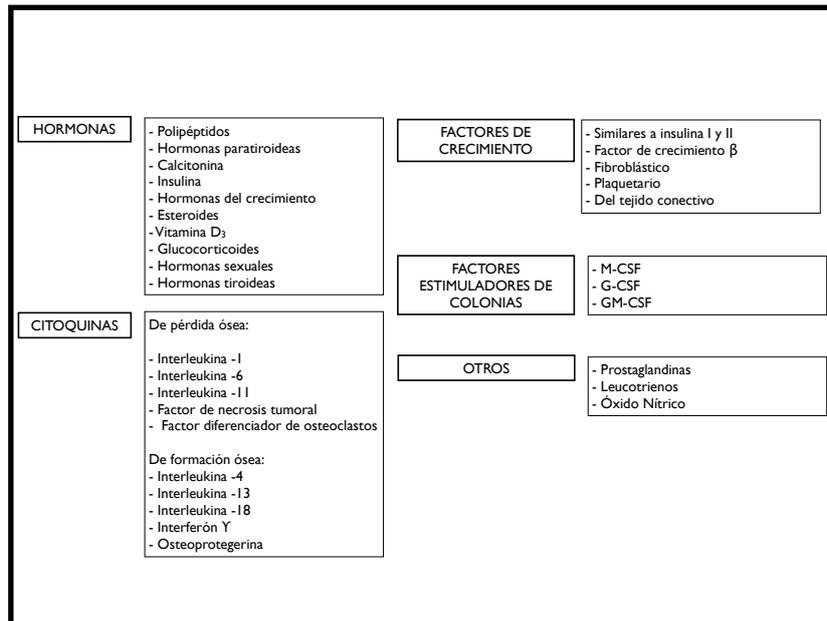


Figura. 2. Factores que afectan al proceso de remodelación ósea. (36)

1.1.5.3. Regulación molecular de la osteogénesis en el movimiento dentario.

Por su parte, las fuerzas de tensión estimularán el reclutamiento de osteoblastos. Según Forwood y Turner (49), las cargas estáticas no tendrán efecto inductor sobre la osteogénesis, sino que será la tasa, amplitud y duración de los potenciales de tensión sobre el tejido lo que activará a los osteoblastos.

Algunas de las moléculas que se han considerado como osteoinductivas son el factor de crecimiento beta, TGF β (50), algunos tipos de proteínas óseas como las BMPs (Proteínas Morfogenéticas Óseas o *Bone Morphogenic Proteins*) (51), la sialoproteína, y el factor de crecimiento epidérmico (EGF). (52) La acción principal de estas moléculas, cuyas vías de actuación no son del todo conocidas, es la estimulación de los promotores para su conversión en osteoblastos maduros, encargados en última instancia de la formación ósea.

1.1.6. Implicaciones del tipo de fuerza ortodóncica.

1.1.6.1. Linealidad temporal de la fuerza.

Para poder describir adecuadamente una fuerza hay que definir su magnitud, dirección y duración, así como su punto de aplicación. Las fuerzas continuas decaen rápidamente y es difícil distinguir cuando se ven interrumpidas. ⁽⁵³⁾

Al parecer, las fuerzas de intensidad baja que se aplican de forma continua y se ven interrumpidas en algún punto por estructuras anatómicas por ejemplo, son beneficiosas biológicamente, ya que favorecen la hialinización del LPD en zonas de presión y la fuerza decrece rápidamente al eliminarse el tejido necrótico por lo que se potencia un estadio posterior de retención pasiva durante el cual se calcifica el osteoide neoformado. ⁽⁵⁴⁾

Cuando la fuerza es demasiado intermitente (impulsos cortos en un largo periodo de tiempo o un corto periodo de aplicación continua de fuerza) como ocurre con la aparatología removible, se produce lo que Reitan ⁽¹¹⁾ denominó “semi-hialinización”. Esto significa que no todas las fibras del LPD se comprimen, y la necrosis no es completa.

Quinn y Yoshikawa ⁽⁵⁵⁾ establecieron cuatro posibles modelos de relación entre la magnitud de la fuerza y la reacción tisular. En primer lugar, que funcionara como un interruptor que se activara a partir de un determinado nivel de fuerza, por encima del cual se conseguiría siempre la misma tasa de movimiento ortodóncico. En segundo lugar, que la relación fuera lineal, es decir, a mayor fuerza, mayor reacción ⁽⁵⁶⁾. La tercera opción establecía una relación dosis-dependiente mientras la fuerza aplicada fuera ligera, alcanzándose una meseta a partir de la cual la aplicación de una mayor fuerza disminuiría el movimiento dentario, lo cual concuerda con la hipótesis de fuerza diferencial de Begg. ⁽⁵⁷⁾ En el cuarto modelo, no se admite que fuerzas altas disminuyan la tasa de MDO, sino que simplemente no lo aumentan.

Según estudios más recientes como los de Böhl y col. (58) establecen que el factor que determinará el movimiento dentario es la hialinización del LPD, además de características individuales como la tasa de remoción del tejido necrótico o la morfología, metabolismo y densidad del hueso. Clínicamente, el movimiento dentario ortodóncico necesita una aplicación de fuerza de al menos seis horas al día. Davidovitch (59) determinó que se necesitan al menos tres horas para conseguir concentraciones suficientes de AMP cíclico en el hueso alveolar y LPD tras la aplicación de la fuerza.

El óxido nítrico se ha interpretado como un marcador inicial del movimiento ortodóncico, ya que es segregado por varios tipos de células en vasos sanguíneos y terminaciones nerviosas (60). Se ha detectado su actividad desde las primeras tres horas tras la aplicación de la fuerza, alcanzando su máximo a las seis horas.

1.1.6.2. Magnitud de la fuerza.

Según Krishnan y Davidovitch (61), una fuerza ortodóncica óptima es aquella capaz de mover eficientemente el diente sin causar dolor al paciente ni daño a los tejidos, evitando que las raíces impacten en áreas anatómicas potencialmente peligrosas.

Las fuerzas ortodóncicas se han catalogado como ligeras o intensas, siendo las primeras más fisiológicas, aunque Storey (13) observaba que siempre se crea un trauma al aplicar una fuerza mecánica externa en los tejidos, independientemente de su magnitud.

El debate acerca de cuál debía ser la fuerza óptima para que el movimiento ortodóncico fuera estable sin causar daños tisulares fue iniciado por Schwartz (24) en 1932, cuando recomendó el uso de fuerzas ligeras y fijó la presión sanguínea de los capilares (15-20 mm Hg o 20-26 g/cm² de superficie radicular) como el máximo de fuerza a aplicar. Al contrario que en animales, en humanos parecía haber un rango más amplio de fuerzas óptimas, por lo que Storey (61), propuso que la variación dependía de la fuerza aplicada y de cambios hormonales complejos.

Observó así mismo que cuando la fuerza aplicada está dentro del rango adecuado, el hueso neoformado es más maduro, y que una fuerza excesiva resulta en un hueso de calcificación más pobre, pudiendo producirse la necrosis del ligamento periodontal. Sin embargo, si la fuerza es demasiado ligera, el movimiento puede enlentecerse, sobretodo en huesos compactos, así como recidivar. En animales de más edad, vio un descenso en la tasa de movimiento ortodóncico que atribuyó a la menor activación celular que se da en los organismos adultos con respecto a los jóvenes.

De acuerdo por tanto con sus estudios (62), a fuerzas muy ligeras el hueso respondía con una *deformación bioelástica*, es decir, que al estar compuesto de fibras, sufría una deformación elástica bajo estrés mecánico externo unida a una activación celular. Cuando la aplicación de fuerza sobrepasaba el límite elástico se daba una *deformación bioplástica* (proliferación adaptativa y remodelación) que, si la magnitud de fuerza seguía aumentando y se pasaba el límite plástico, provocaría una *deformación biodisruptiva*, con isquemia, muerte celular e inflamación.

Actualmente se considera que la fuerza óptima será aquel estímulo mecánico extrínseco que provoque una respuesta celular con el objetivo de restaurar el equilibrio mediante la remodelación de los tejidos de soporte periodontales. Esto significaría que hay una fuerza de magnitud y características temporales determinadas capaz de producir una tasa de MDO máxima sin daño tisular y con el máximo confort del paciente. (63)

Esta fuerza óptima variaría en función del diente y del paciente. Es imposible sin embargo, con los instrumentos actuales, medir la cantidad de fuerza aplicada a cada parte del diente, ya que la gran mayoría está cubierta por la encía. Se prefieren por tanto las fuerzas ligeras que producen reabsorción ósea frontal en contra de las intensas, que pueden necrosar el LPD y provocar reabsorciones óseas profundas, así como reabsorción radicular.

1.2. Expresión génica en el movimiento dentario ortodóncico

1.2.1. Conceptos generales

La síntesis y modificación de proteínas a partir de la expresión de los genes es la base de todos los procesos celulares, incluido el movimiento dentario inducido por la ortodoncia, que en definitiva activa la expresión génica y la síntesis proteica de las células del ligamento periodontal y el hueso alveolar. La adaptación del hueso a la fuerza ortodóncica depende de que la regulación de la expresión génica de osteoclastos y osteoblastos orqueste la secreción de proteínas adecuadas de un modo pautado y secuenciado. La comunicación se produce mediante mensajeros moleculares siendo un proceso reversible ya que aquellas moléculas que actúan como activadoras de otras también son susceptibles de ser posteriormente inhibidas. (16)

Un metabolismo óseo óptimo determina el comportamiento del hueso, aunque los factores ambientales también influirán sobre el movimiento ortodóncico, lo que hace aún más compleja la predicción del mismo. Aunque muchas de las moléculas reguladoras ha sido identificadas, (64) la coordinación sinérgica entre expresión génica y síntesis proteica encargada de orquestar la diferenciación, proliferación y apoptosis celular es un sistema muy complejo que sigue sin descifrar en su mayor parte.

La reabsorción del hueso alveolar y de la superficie radicular de los dientes se ha descrito ligada a los osteoclastos, cuya formación a su vez depende de varios tipos distintos de citoquinas, tales como el M-CSF (factor estimulador de colonias de macrófagos), RANKL (Ligando del Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa B), RANK (Receptor Activador del Factor Nuclear Kappa B), OPG (Osteoprotegerina), (64) IL-1 β (Interleukina 1 β), TNF-a (factor de necrosis tumoral alfa) y las BMP (proteínas morfogenéticas óseas) (65), entre otras.

Se considera que el M-CSF juega un papel crucial en la reabsorción y remodelado óseo (66); así como en la destrucción ósea relacionada con la enfermedad periodontal (67) y es inducido por el TNF alfa. Regula la osteoclastogénesis durante la erupción dental, siendo indispensable para que las BMCs humanas se conviertan en osteoclastos. Para esto último también es necesaria la presencia de RANKL.

En 2013, Rhim et al (68) utilizaron microarrays específicamente diseñados para comparar la expresión génica en células del ligamento periodontal (PDL) cultivadas inmediatamente después de la extracción dental y también de dientes criopreservados. Encontraron un aumento de M-CSF dos veces mayor en las células del PDL criopreservadas inmediatamente. Al mismo tiempo, confirmaron que las células de la médula ósea son capaces de diferenciarse en osteoclastos TRAP positivos (fosfatasa ácida tartrato-resistente) cuando se estimulan con RANKL junto con las secreciones M-CSF.

En 2002, Graves y col. (69) publicaron un estudio experimental en ratones que relacionaba la expresión génica con el movimiento dental. Estudiaron el movimiento dental eruptivo en ratones y su relación con el gen MCP-1 (*Monocytic Chemoattractant Protein-1*) observando que la tasa de erupción se aceleraba en fases iniciales cuando se suprimía de modo artificial la actividad de este gen comparado con los grupos control, dónde actuaba de manera normal, aunque en fases tardías se aceleraba en ambos grupos.

Esto, junto con el aumento de iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) e interleukina -11 y -6 que intervienen en la resorción ósea, les llevó a pensar que el MCP-1 controlaba el reclutamiento de monocitos y de osteoclastos modulando por tanto la reabsorción ósea, y que en fases tempranas de la erupción, el reclutamiento de monocitos ocurre mediante vías independientes de este gen, que es fases tardías cuando se ve implicado, acelerándose el movimiento eruptivo.

Huang et al. en 2009 (70) compararon la expresión génica que se daba durante la erupción natural de los dientes con la ocurrida tras un movimiento dental inducido

ortodóncicamente, encontrando que el proceso metabólico del hueso en ambos procesos se daba a través del mismo mecanismo, y que es la aplicación de fuerza (interna en el caso de la erupción y externa en el caso del MDO) la que inicia el movimiento dental. Así mismo, demostraron la relación entre la reabsorción específica y localizada de hueso mediada por osteoclastos y la expresión de MMPs (*Matrix Metalloproteinases*) 2 y 13, que se daba por igual en procesos eruptivos y en MDO.

La Interleukina-1 es una citoquina que se encuentra en el fluido crevicular gingival (GCF) y que existe en dos formas: IL-1 α e IL-1 β . La primera de ellas, la IL-1 α , es una citoquina multifuncional altamente inflamatoria localizada en su mayor parte en células mononucleares, osteoclastos, osteoblastos y fibroblastos, está asociada a células excepto en caso de patología severa. Aparentemente predomina en roedores (71) y de acuerdo con algunos estudios no suele encontrarse en el torrente circulatorio o fluidos corporales de forma fisiológica. (72)

La IL-1 β , por el contrario, es conocida por promover la reabsorción ósea en áreas de compresión e inhibir la formación de hueso. (73) Ésta citoquina se regula mediante el antagonista del receptor de la Interleukina-1 (IL-1RA), que compite con la IL-1 β con el fin de bloquear su interacción con sus receptores e inhibir su actividad, (74.) evitando por tanto la reabsorción ósea. Debido a esto, el IL-1RA se ha convertido en un objetivo terapéutico en enfermedades relacionadas con la reabsorción ósea como la artritis reumatoide o la enfermedad periodontal. (75) El balance entre éstas dos moléculas mantiene el metabolismo óseo.

Las Interleukinas han sido asociadas previamente con la reabsorción radicular post ortodóncica. (*external apical root resorption*, EARR), y se ha encontrado incluso una correlación específica entre las variantes genéticas del cluster de genes de la interleukina-1 y la predisposición a que ocurra la EARR (76). Newman (77) y Harris (78) fueron los primeros en sugerir la posibilidad de una predisposición genética a la EARR, y más recientemente,

Al-Quawasmi et al (79) determinaron que un marcador genético en ciertos sujetos podría desembocar en una tendencia mayor a ésta. Bastos et al (80) comprobaron finalmente que un polimorfismo en el gen de la IL-1 β estaba relacionado con la tendencia a una reabsorción radicular aumentada.

Nuestro perfil genético determina nuestra respuesta individual al medio ambiente. Las mutaciones ocurren de manera habitual en nuestra secuencia genética, y a pesar de que solo un porcentaje muy pequeño de ellas da lugar a cambios importantes en la expresión génica, siendo capaces de dar lugar a enfermedades y síndromes genéticos, la mayoría de las mutaciones sólo desencadenan cambios sutiles. (81) Cuando una mutación se da en más del 1% de la población, se denomina polimorfismo. Se ha descrito en la literatura que un polimorfismo en el cluster de genes de la IL-1 modula los niveles de IL-1 β /IL-1RA. (82) Más concretamente, un polimorfismo en el exón 5 (+3954) del gen de la IL-1 β da lugar a dos alelos: homocigótico (A1/A1), que daría una secreción normal de IL-1 β ; heterocigótico (A1/A2) que provocaría una secreción dos veces mayor y homocigótico (A2/A2) que daría una secreción de IL-1 β hasta cuatro veces mayor. Para la IL-1RA, el comportamiento es similar. Un polimorfismo en el intrón 2 se asociaría a secreción proteica aumentada de IL-1RA (83) en aquellos pacientes con al menos una copia del alelo 2 (A2+).

Incluso aplicando la misma fuerza, existen diferencias entre individuos de hasta 4 veces más o menos MDO (81), y tanto la IL-1 β como la IL-1RA han sido identificadas como las responsables de más del 60% de la variación interindividual de la velocidad del MDO. (72)

Mientras el papel de la IL-1 β en el MDO parece estar mucho más claro, no hay mucho escrito sobre la IL-1 α a éste respecto. De acuerdo con Dinnarello et al (84), la producción de IL-1 α aumenta durante la inflamación secundaria a procesos infecciosos y enfermedades autoinmunes, por lo que su producción puede interrumpirse con

corticoesteroides. Ésta molécula y su receptor están implicados en la homeostasis y remodelación tisular durante el MD fisiológico. (85) Bletsa et al (86) encontraron un aumento en la expresión de IL-1 α y TNF- α en áreas de tensión y compresión incluso un día después de la aplicación de la fuerza, y esa expresión podía observarse en hueso, tejidos gingivales, PDL o dientes bajo MDO.

La mayoría de las publicaciones a éste respecto miden la fuerza en gramos, pero se ha publicado que la mejor manera de medir el estrés y la presión sobre el PDL es en KPa, (87) como evidencia de las reacciones que el MD ejerce sobre los tejidos circundantes. En cuanto a la intensidad de la fuerza usada, Luppapornlarp (88) encontró mayores niveles de IL-1 β 24 h y 2 meses después de la aplicación de una fuerza continua de 150 g, pero tras 2 meses, la misma cantidad de movimiento dentario se consiguió con 50 g y menores molestias al paciente. Esta ausencia de consenso acerca de la magnitud y unidades de medida de la fuerza ortodóncica dificulta aún más el establecimiento de comparaciones absolutas entre estudios.

Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son un grupo de proteínas osteoinductivas obtenidas de matriz ósea no mineralizada. Se considera que son capaces de estimular a las células madre óseas mesenquimales a diferenciarse en osteoprogenitores. Es bien conocido que las BMP-2 tienen un papel crucial en el control de la proliferación diferenciación y secreción de osteoblastos por parte de la matriz ósea, mediante la estimulación de programas de transcripción específicos necesarios para la formación ósea durante el desarrollo esquelético embrionario y la remodelación ósea postnatal.(89)

Últimamente, la acción de las BMP'S sobre la regeneración ósea en fracturas y su capacidad para aumentar la respuesta ósea alrededor de materiales aloplásticos han llevado a su uso como estrategia terapéutica. De acuerdo con Diaz-Sanchez et al, (90) sería posible en un futuro próximo que las BMP's reemplacen a los injertos óseos tanto autólogos como alogénicos. La aplicación de factores de crecimiento específicos orientados a la

osteoinducción, sin necesidad de usar un injerto óseo constituye un impacto importante en la regeneración ósea.

La BMP-2 recombinante humana se ha usado en estudios animales consiguiendo aumentar la tasa de creación de hueso intramembranoso y de cemento durante la cicatrización ósea. ⁽⁹¹⁾ Sin embargo, los efectos de las BMPs están modulados por una serie de factores que incluyen el acondicionamiento de la raíz, la carga oclusal, la dosis de BMP's, las características del portador y la idoneidad del modelo de estudio para poder comparar debidamente los resultados. Estos factores pueden afectar la tasa de osteogénesis, cementogénesis y regeneración de PDL inducida por BMP's tanto en fases tempranas como tardías de la cicatrización. ⁽⁹²⁾

Las MMPs 1 y 2, junto con sus inhibidores endógenos (Inhibidor tisular de metaloproteinasas, TIMP 1 y 2) son muy importantes para la remodelación de la matriz extracelular en PDL humano, y su expresión es sensible al estrés mecánico. Varios estudios han demostrado que las fuerzas tensoras y compresivas inducen la expresión de MMPs y TIMPs a nivel proteico y del mRNA en células del ligamento periodontal. ^{(93) (94)}

Zheng et al, ⁽⁹⁵⁾ analizaron en su artículo de 2012 cómo la presión sobre el PDL era el responsable de regular el sistema de expresión de las MMP's. Concluyeron que el estrés altera los fluidos alrededor del PDL y que esto regula las MMP-1, 2 y la expresión de TIMP-1 y 2

1.2.2. Microarray

Determinar el perfil de expresión génica constituye una frontera crucial a la hora de explicar y anticipar el comportamiento celular. Durante las últimas dos décadas se han

desarrollado un gran número de técnicas con éste objetivo, como por ejemplo las PCR cuantitativas en tiempo real (Real-Time PCR), el “enzyme-linked immunosorbent assay” (ELISA), Western blot, o la inmunofluorescencia.

El análisis por microarray en particular, es capaz de establecer una diferencia en los patrones de expresión génica de una amplia variedad de muestras y comparar la expresión de tejidos fisiológicos y patológicos. Los microarrays de alta densidad pueden analizar el transcriptoma del genoma completo de un organismo cualquiera y mostrarnos una instantánea de la expresión génica en la muestra de tejido concreta que se analiza, en el momento exacto que el ARN fue aislado. Tanto colecciones homogéneas como heterogéneas de células pueden usarse para generar un perfil genético, y el nivel del ARN mensajero (mRNA) normalmente puede oscilar entre baja y alta disponibilidad. (96)

Con el fin de estudiar la expresión génica relativa al movimiento dentario, los cambios en el hueso alveolar y procesos tales como la reabsorción radicular, pueden construirse plantillas adaptadas conteniendo los genes elegidos, incluyendo OPG, RANKL, RANK, M-CSF, IL-1b, TNF-a y BMPs. (68)

Un primer paso crucial a la hora de analizar la expresión génica en los tejidos mediante métodos como la “real-time PCR” o el microarray es el aislamiento previo de ARN viable y de buena calidad. En hueso, este paso constituye un reto especial debido a la baja cantidad de células que presenta el tejido, que además están embebidas en una matriz altamente mineralizada. (97)

Tradicionalmente, el hueso congelado se envolvía en láminas y era introducido en nitrógeno líquido hasta solidificarse y convertirse en polvo, pulverizándolo con un martillo o herramienta similar. (98) Tras esto, el hueso se trasladaba a otro recipiente usando un reactivo con base de fenol-guanidina para el aislamiento del ARN. (99) Sin embargo, existe cierta preocupación acerca de que la realización de múltiples pasos pueda aumentar la

posibilidad de pérdida de la muestra y de contaminación cruzada, ya que la extremada facilidad con que el ARN se degrada es un problema añadido a la hora de extraerlo. (100)

En 2012, Carter et al (101) desarrollaron una “técnica en un paso” que podría simplificar la extracción de ARN de múltiples muestras de tejido óseo orientadas a su uso para análisis mediante procesos altamente exigentes como el microarray. Este procedimiento ayudaría a mantener temperaturas cercanas a la congelación conteniendo las muestras en microtubos Eppendorf y colocándolos rodeados de nitrógeno líquido. Se centrifugarían manteniéndolas a 4°C en una habitación refrigerada, previamente enfriados con hielo y para la homogeneización, pulverización del hueso y posterior aislamiento del ARN se utilizaría RNeasy MiniKit (Qiagen). Mediante ésta técnica, encontraron que las muestras no se degradaban tan fácilmente y que la disponibilidad de ARN de alta calidad aumentaba en ocho veces, con números de integridad de ARN (RNA integrity numbers, RIN) entre 6.7 (102) y 9.2. (101)

Debido a la importancia de la calidad del ARN para la exactitud de los resultados, antes de su uso para microarray, las muestras pueden seleccionarse de acuerdo a su integridad mediante varias técnicas como espectrofotometría UV o medición mediante electroforesis. Para ello, se usa una plataforma para la separación de biomoléculas mediante electroforesis denominada Byoanalyzer. (103) (104) Sin embargo, Harrington et al describen en su artículo de 2009 (105) que en presencia de abundante ARN, la sensibilidad de detección de mARN en ésta plataforma puede verse reducida, como ocurre por ejemplo en muestras de sangre. (106)

1.3. Osteoclasto, osteoblasto y osteocito.

1.3.1. El osteocito.

Los osteocitos son las células constitutivas del tejido óseo, y funcionan como mecanosensores (107). Están conectados entre sí y a las células de la superficie ósea por dendritas o procesos citoplasmáticos.

El mecanismo por el que se produce la activación de los osteocitos tras la aplicación de carga mecánica ha sido objeto de hipótesis como la del movimiento de fluidos (108) que sostiene que al producirse la fuerza, el fluido intersticial se mueve alrededor de la matriz extracelular no mineralizada que rodea a las células óseas alterando la tensión que se recibe en la membrana celular de los osteocitos, lo cual iniciaría su actividad.

El intrincado sistema de señales celulares que se da desde que se produce la estimulación mecánica en la superficie ósea hasta que se activa el osteocito no es bien conocido, por lo que son muchos los estudios que se han centrado en la descripción de aquellas moléculas que podrían estar implicadas en la regulación de la función del osteocito, siendo las más representativas las que se exponen a continuación.

Segundos después de la aplicación de una fuerza mecánica externa, se eleva la síntesis de productos anabólicos como el óxido nítrico, las prostaglandinas y el ATP, y en minutos, productos propios del metabolismo de los osteocitos como la glucosa 6-lactato-deshidrogenasa y el c-FOS mRNA. Alrededor de 4 horas después, se eleva la síntesis de factores de crecimiento y de marcadores específicos de los osteocitos, como la proteína de la matriz dentinaria 1, MEPE (109) y esclerostina.

Los osteocitos son las únicas células que producen esta última, que es un producto del gen SOST y antagoniza las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) encargadas de la formación de hueso y de la osteoblastogénesis (son las encargadas de activar a los precursores mesenquimales de los osteoblastos) (110) por lo que se ha propuesto a la esclerostina como un regulador de la función osteoblástica derivado del osteocito.

Según Gluhak-Heinrich y col. (109), son las proteínas de la matriz como la fosfoglicoproteína de la matriz extracelular (MEPE) y la proteína de la matriz dentinaria 1 (DMP1) las que intervienen en la mineralización y desmineralización de espacio que rodea al osteocito, ya que son sensibles a la carga mecánica externa. Los hallazgos de este grupo de investigadores sugieren que las respuestas de ambas proteínas son independientes, actuando la DMP1 más rápidamente, mientras que MEPE ejercería una acción retardada.

Además, se ha observado que los osteocitos emiten señales para activar la cascada de reabsorción ósea a través de la secreción de Factor Estimulador de las Colonias de Macrófagos (M-CSF) y mediante su propia apoptosis en lugares donde se ha producido un daño óseo (microfracturas, grietas...). Controlan también la expresión de RANKL en el osteoblasto (Receptor Activador del Ligando NF- κ B), ejerciendo así mismo un control indirecto sobre la diferenciación del monocito en osteoclasto, ya que este proceso ocurre en presencia de RANKL y M-CSF. (111)

Cuando las fuerzas mecánicas actúan sobre el osteocito, alteran su estado metabólico haciéndole secretar factores osteotrópicos (MLO-Y4) capaces de estimular los receptores de superficie de los osteoblastos. Esta comunicación intercelular se da por medio de las conexinas, y como consecuencia, el osteocito secretará PGE₂ que activará finalmente al osteoblasto. La estimulación mecánica induce también la expresión de CTGF (Factor de crecimiento del tejido conectivo) (112) en los osteoblastos y osteocitos que se encuentran alrededor del tejido inmediatamente anexo al ligamento periodontal de aquellos dientes que han sido sometidos a movimiento ortodóncico.

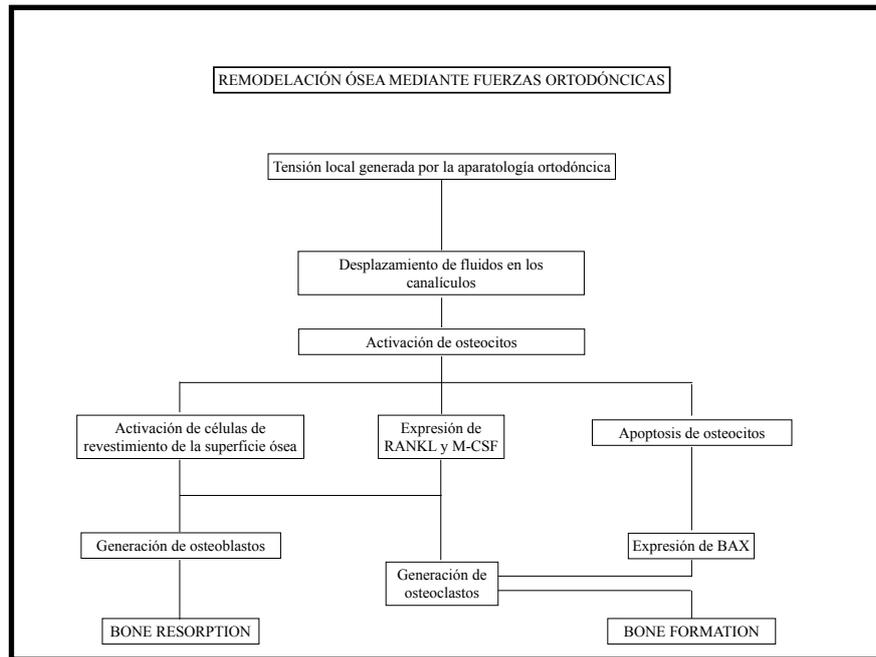


Figura. 3. Papel del osteoclasto, osteoblasto y osteocito en la secuencia de las etapas de remodelación ósea durante el tratamiento ortodóncico. (20)

En los ensayos realizados por Yamashiro y col. (112) tras 12 horas de aplicación de fuerza, la expresión aparecía aumentada, extendiéndose a osteoclastos de capas profundas de la matriz ósea alveolar, lejos del LPD, tanto en el lado de presión como en el de tensión. Por ello, estos investigadores sugerían la posibilidad de que el CTGF tuviera un papel importante en la regulación de la función del osteocito durante la estimulación mecánica del hueso.

Sakai y col. (113) hipotetizaron que la expresión génica del CTGF y la inducción de apoptosis de osteocitos por parte del movimiento ortodóncico podrían estar conectados, ya que en su experimento de 2009, observaron un aumento en la expresión génica de CTGF dos horas después de la aplicación de la fuerza, seguida de apoptosis de osteocitos tras 6 horas. Como consecuencia se produjeron lagunas óseas 24 horas después y un aumento de osteoclastos al tercer día, teniendo lugar una aceleración del movimiento dentario alrededor del día 10.

1.3.2. Vías de regulación osteoblasto/osteoclasto.

El osteoblasto es la célula del tejido óseo encargada de la producción y aposición de nuevo tejido mineralizado, mientras que el osteoclasto se encarga de la reabsorción ósea. El control de la producción de estos dos tipos celulares se lleva a cabo mediante el balance RANKL/RANK/OPG. (20)

El Ligando del Receptor Activador del factor Nuclear Kappa (RANKL) regula la formación y activación de osteoclastos y ejerce su efecto uniéndose al receptor RANK de los precursores de osteoclastos. La unión desencadena una rápida diferenciación de estos precursores hematopoyéticos en osteoclastos maduros. Por otra parte, la osteoprotegerina (OPG) es un receptor de la superficie del osteoblasto que compite con el RANK por la unión de RANKL. La OPG inhibe las fases terminales de la diferenciación osteoclástica, suprime la actividad de los osteoclastos ya maduros e induce su apoptosis. Mediante este balance se regula la remodelación ósea de los tejidos.

El RANKL es liberado por progenitores osteoblásticos en mayor proporción, pero en casos de inflamación como la que tiene lugar por ejemplo en la artritis reumatoide, el movimiento dentario ortodóncico o la periodontitis, el RANKL es producido también de forma abundante por los linfocitos T (114). Además del RANKL, el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) también promueve la osteoclastogénesis en condiciones de inflamación. (115)

El fluido crevicular gingival es un exudado inflamatorio que se encuentra en el surco gingival y que aumenta en volumen con la inflamación y el incremento de permeabilidad en los capilares. Aunque compuesto principalmente por suero, el fluido crevicular puede variar su composición (116) en función de los cambios que tengan lugar en los tejidos circundantes, por lo que muchos estudios recientes se han centrado en los

componentes de este fluido para encontrar marcadores biológicos que indiquen los distintos estados de salud del periodonto y el hueso.

Mogi y col. ⁽¹¹⁷⁾ describieron en sus estudios un aumento en la concentración de RANKL y una disminución de OPG en pacientes con periodontitis, sugiriendo que este sistema podía tener un papel decisivo en la destrucción osteoclástica del hueso, y Yamaguchi y col. reportaron en 2009 ⁽¹¹⁸⁾ una alta concentración de RANKL encontrada en el fluido crevicular durante el movimiento dentario ortodóncico.

Este último grupo proponía por tanto que el conocimiento de los mecanismos que componen este sistema podría abrir la puerta a métodos de modificación del movimiento ortodóncico como el propuesto por Fujita y col. ⁽¹¹⁹⁾ en el que irradiando con láser de baja frecuencia los tejidos sometidos a fuerza ortodóncica se estimularía la velocidad del movimiento dentario vía sistema RANKL/RANK/OPG. También se ha propuesto la transferencia génica del gen RANKL, que será expuesta en capítulos posteriores.

El movimiento ortodóncico conlleva cambios en el patrón de remodelación ósea, produciéndose reabsorción en el lado de presión y formación de hueso en el lado de tensión. Son muchos los grupos de investigación que han propuesto diferentes métodos de modificación del movimiento dentario ortodóncico, ya sea aumentándolo o disminuyéndolo mediante el uso de agentes, como el citado RANKL, la OPG, inhibidores de la integrina, inhibidores de las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) y relaxinas. ⁽¹²⁰⁾

La reabsorción ósea puede inhibirse de dos maneras: evitando la diferenciación del osteoclasto desde los precursores o impidiendo su conversión en osteoclasto maduro capaz de reabsorber hueso, aunque ninguno de los dos procesos tiene consecuencias claras. ⁽¹²¹⁾

Holliday y col. ⁽¹²²⁾ informaron de que el osteoclasto sufría una polarización al entrar en contacto con señales de activación relacionadas con el hueso. Tal polarización es

necesaria para que se produzca la reabsorción ósea e implica mecanismos altamente específicos que podrían ser objetivo de terapias específicas centradas en el osteoclasto, bloqueando el MDO y consiguiendo anclaje.

En su investigación buscaron nuevos inhibidores del MDO mediante péptidos o pequeñas moléculas que modularan la actividad osteoclástica, que se liberaban de una membrana (ELVAX) implantada subgingivalmente en ratas sometidas a MDO. Vieron que tanto la inhibición de integrinas como de MMPs tenía demasiados efectos colaterales como para ser usadas en la práctica clínica. (123)

Por otra parte, la OPG y moléculas como el Denosumab (anticuerpo monoclonal que bloquea el RANKL) realizan una actividad reguladora inmune. Incluso, la doble acción moduladora ósea y activadora de la respuesta inmunitaria llevada a cabo en el hueso por las citoquinas y el RANKL se ha denominado osteoinmunología (124) y nos lleva a pensar que la inhibición de RANKL podría disminuir la resistencia a patógenos orales.

Para que los osteoclastos maduros reabsorban hueso, debe haber señales de activación que provoquen reorganización profunda del citoesqueleto del osteoclasto, resultando en la formación de estructuras como anillos de actina en la superficie donde el osteoclasto contacta con el hueso. (125), (126) Estos anillos están vinculados al transporte vesicular desde y hacia las membranas onduladas. Una de las moléculas que más comúnmente se transporta es la ATPasa vacuolar (V-ATPasa) (127) que saca protones de la célula disminuyendo el pH hasta 5.0, que es el necesario para que se produzca la reabsorción.

Sólo unos pocos tipos de células más, como las células renales y algunas del tracto reproductivo de mamíferos (128),(129) son capaces de llevar a cabo un proceso de acidificación debido a la existencia de grandes depósitos de ATPasa vacuolar (V-ATPasa) en el citoplasma. Es mediante este procedimiento como el osteoclasto acidifica las lagunas de reabsorción.

La V-ATPasa está compuesta de varias subunidades. (130) La subunidad B interactúa con la actina de los microfilamentos lo cual es vital para la función del osteoclasto. La propuesta de Holliday y col. (131) es identificar una molécula que inhiba la interacción entre la V-ATPasa y los microfilamentos mediante técnicas químicas computarizadas.

En el lado de tensión, el proceso de formación ósea tiene lugar mediante la atracción química de precursores de osteoblastos al lugar donde debe realizarse la osteogénesis. Los osteoblastos se superponen formando una matriz osteoide que se remineraliza tras trece días siguiendo una tasa de 1 micra al día hasta que se sella por completo el defecto óseo. (132)

En las capas del fondo los osteoblastos tienen grandes núcleos y forman una gruesa capa de osteoide. Las células se van alisando y entrando en quiescencia, quedando algunas dentro de la matriz ósea neoformada. (132) Los osteoblastos que quedan rodeados por la matriz calcificada formando lagunas óseas son los denominados osteocitos.

1. 4. Células Madre en el movimiento dentario ortodóncico.

1. 4. 1. Biología de las células madre

Es importante conocer la biología de las células madre para comprender el alcance de sus posibilidades en cuanto al tratamiento de numerosas enfermedades ya que presentan múltiples usos, como la regeneración tisular y la revascularización, por lo que son de incalculable valor en el campo de la medicina regenerativa.

Una célula madre es una célula con dos características principales: capacidad de proliferación (mediante divisiones mitóticas, dando lugar a células madres y otros progenitores) y capacidad de diferenciación en distintas líneas celulares. (133) Por la

posesión de estas dos características se dice que las células madre tienen capacidad de autorenovación.

Existen dos tipos de células madre en función de su grado de multipotencialidad, las embrionarias, con alta capacidad proliferativa y pluripotentes (diferenciación a cualquier tipo de célula) y las células madre propias de tejidos, con capacidad proliferativa limitada y multipotentes (diferenciación sólo a células específicas del tejido del cual proceden).⁽¹³⁴⁾ Las células madre embrionarias sólo se encuentran cuando el embrión está en fase de blastocisto, mientras que las propias de tejidos pueden encontrarse durante toda la vida del organismo multicelular, y participan en el mantenimiento de tejidos, ya que se mantienen en latencia hasta que tiene lugar un daño tisular y activan a los precursores aumentando la tasa de producción celular.⁽¹³⁵⁾ Las células madre pueden derivar del ectodermo, como las de los tejidos del sistema nervioso (células de la glia: neuronas, astrocitos, oligodendrocitos) o del endodermo, como las células mesenquimales (médula ósea, entre otros tejidos)⁽¹³⁶⁾

El nicho celular es el hogar de las células madre. Es una entidad tanto estructural como funcional que funciona en dos direcciones: el nicho regula la biología de las células madre (proliferación, destino de la progenie y evitar el agotamiento o la muerte de las células) y estas a su vez conservan la integridad del nicho. Las células madre mesenquimales (MSCs) se hallaron por primera vez en la médula ósea (BMMSCs), y la búsqueda de MSCs en tejidos específicos ha llevado al descubrimiento de una gran variedad de células madre en todos los órganos y tejidos del cuerpo en las últimas décadas.

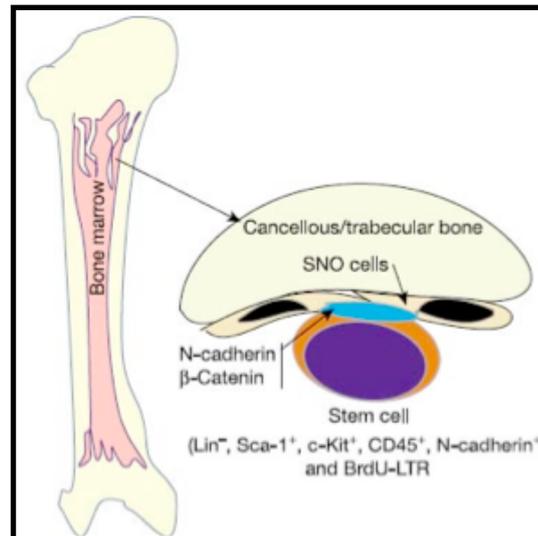


Figura. 4. Nicho celular de las células madre hematopoyéticas. (137)

En la cavidad oral existen dos tipos básicos de células madre: del tejido dental y de la mucosa oral (hOMSCs). Se han encontrado varios tipos de células madre mesenquimales derivadas del tejido dental: de la pulpa (DPSCs), de dientes deciduos exfoliados (SHED), del ligamento periodontal (PDLSCs), de la papila apical (SCAP) y del folículo dental (DFPCs).

Las células madre de la pulpa pueden obtenerse directamente de tejido pulpar, tienen clara capacidad osteogénica (ya que son capaces de regenerar dentina y tejido óseo), pero no tan clara capacidad neurogénica. Sin embargo, las células madre de la mucosa tienen probada capacidad tanto neurogénica como osteogénica y se obtienen de cultivo de explantes de mucosa. (138) Una de las diferencias entre las BMMSCs y las células madre dentales es que estas últimas están más vinculadas al desarrollo odontogénico que al desarrollo osteogénico. (139)

Las células madre mesenquimales de la médula ósea (BMMSCs) se han descrito como “*colony-forming unit-fibroblasts*” (CFUFs), siendo capaces de diferenciarse en células del tejido óseo pero también en otras muchas líneas celulares (osteogénica,

condrogénica, adipogénica, miogénica y neurogénica, entre otras) cuando se cultivan en determinadas condiciones *in vitro*. Los tejidos dentales son tejidos especializados que no son objeto de remodelación continua, al contrario que el tejido óseo. Así, las células madre que derivan de los tejidos dentales pueden tener un menor potencial de diferenciación que las BMMSCs.

Una característica importante de las células de la pulpa es su potencial de diferenciación odontoblástica: pueden ser inducidas *in vitro* a diferenciarse en células odontoblásticas, caracterizadas por cuerpos celulares polarizados y acumulación de nódulos mineralizados.

Por su parte, las células de dientes deciduos exfoliados (SHED) proliferan más rápido que las DPSC y BMMSCs (SHED>DPSC>BMMSCs), y una característica notable de estas células es que tienen capacidad osteoinductiva, algo que no se atribuía a las DPSC (inducen que determinadas células receptoras se diferencien en células encargadas de generar hueso). También se está estudiando el potencial de desarrollo neuronal mediante la inyección de SHED en el hipocampo de ratones inmunodeficientes. (140)

La papila apical hace referencia a los tejidos blandos de los ápices de dientes permanentes en desarrollo. (141) Este tejido se localiza más hacia apical de la membrana epitelial y consiste en una zona rica en células. Las células madre derivadas de la papila apical (SCAP) parecen ser una fuente primaria de odontoblastos, responsables de la formación de la dentina de la raíz, mientras que las DPSC son probablemente una fuente de odontoblastos de reemplazo que forma dentina reparativa.

El papel de la papila apical en la formación de raíces fue investigado por Huang y col. en 2008 (142) con un ensayo en modelo animal: la extirpación quirúrgica de la papila apical de la raíz en una fase temprana de su formación dio lugar a la detención del desarrollo radicular, a pesar de seguir intacta la pulpa. Por el contrario, los dientes en los

que esta papila permanecía, continuaban con su normal crecimiento y desarrollo. Existe evidencia científica de que en el ligamento periodontal se encuentran poblaciones celulares que pueden diferenciarse en cualquier célula generadora de cemento (cementoblastos) o de hueso (osteoblastos). La presencia de múltiples tipos de células dentro del ligamento periodontal sugiere que el tejido contiene células progenitoras (PDLSCs) para mantener la homeostasis y la regeneración de los tejidos periodontales.

El folículo dental es un tejido ectomesenquimal que se encuentra alrededor del órgano del esmalte y de la papila del germen dental en desarrollo antes de la erupción. Este tejido contiene células progenitoras (DFPCs) que forman el periodonto, es decir, cemento, ligamento periodontal, y el hueso alveolar. Estas células precursoras se han aislado de folículos dentales de los terceros molares retenidos. Las diferencias y puntos comunes entre las células madre derivadas de la médula ósea y las derivadas de tejidos dentales se dan a múltiples niveles, como veremos a continuación. En cuanto al inmunofenotipo, en conjunto, la evidencia actual sugiere que las vías bioquímicas implicadas en la diferenciación de DPSC a odontoblastos funcionales son similares a las vías de diferenciación de BMMSCs en osteoblastos. Además, según lo publicado por Shi y col. (143), las DPSC comparten un patrón similar de expresión de la proteína con BMMSCs *in vitro*. En lo que concierne a la expresión génica, se encontró un nivel similar de expresión entre DPSC y BMMSCs en más de 4000 genes humanos, a excepción de algunos como el colágeno XVIII alfa-1, el factor de crecimiento parecido a insulina tipo II (IGF2), y la ciclina-quinasa dependiente tipo 6 entre otros, que están altamente expresados en DPSC, mientras que otros, como por ejemplo el colágeno tipo I alfa-2 se expresan con más frecuencia en BMMSCs.

Con respecto al potencial de diferenciación; aunque las células madre derivadas del tejido dental y las de la médula ósea están reguladas por factores similares y comparten un perfil de expresión proteica común, estas poblaciones difieren significativamente tanto en su capacidad proliferativa como en su potencial de diferenciación durante el desarrollo *in*

vitro, donde las BMMSCs forman sólo tejido óseo.

El potencial condrogénico de DPSC parece débil, y tanto DPSC como SCAP son más débiles en la adipogénesis en comparación con BMMSCs. En teoría, el potencial de desarrollo neuronal de las células madre dentales podría ser más potente que de las células madre procedentes de médula ósea, debido a que tienen su origen en la cresta neural. Por otra parte, el nicho celular de las células DPSC en la pulpa dental humana fue identificado por los anticuerpos contra STRO-1, CD146, y el antígeno de pericitos asociados (3G5) y se encontró que se localizaba en las regiones de la vaina perivascular y perineural.

1.4.2. Evolución en la investigación con células madre

Desde finales de los años 90 y principios de los 2000 se han empezado a estudiar más en profundidad las características de este tipo de células para orientar su potencial al amplio campo de la terapéutica clínica.

Las posibilidades son muy variadas: células de la médula ósea para leucemia y quimioterapia, células nerviosas para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, Alzheimer, células cardíacas para tratar los infartos, células del páncreas para la diabetes y un largo etcétera. Identificar los tipos de células madre propias de tejidos ha sido el primer paso: médula ósea, tejido neural, etc.

Gronthos y col. en el año 2002 ⁽¹⁴⁴⁾ establecían la posibilidad de la existencia de células madre derivadas de la pulpa dental humana (DPSCs). Previamente se había constatado la existencia de células madre derivadas de la médula ósea (BMSSCs) con capacidad para diferenciarse en diferentes tipos de células como osteoblastos, condrocitos, adipocitos, células musculares y neurales.

Este grupo describía que las células madre de la pulpa presentan varios puntos comunes con las BMSSCs, ya que expresan marcadores como sialoproteínas, fosfatasa alcalina, colágeno tipo I y osteocalcina (al igual que los osteoblastos). Además su diferenciación está mediada por reguladores de la formación ósea como el factor de crecimiento tisular β y las citoquinas, y los perfiles de expresión génica entre ambas líneas celulares son muy parecidos.

Partiendo de esta base, se intentan identificar las DPSCs como una nueva población de células madre con alto potencial proliferativo, capacidad de autorenovación y diferenciación en varias líneas celulares.

En su artículo anterior del año 2000, ⁽¹⁴⁵⁾ Gronthos y col. describieron ya que estas células eran capaces de regenerar un “complejo pulpa-dentina compuesto de una matriz mineralizada tubular con odontoblastos, además de tejido fibroso con vasos sanguíneos en una distribución similar al complejo dentino-pulpar encontrado en dientes humanos”.

En este nuevo artículo tomaron células DPSCs y las transplantaron a un ratón inmunocomprometido que generó tejido en forma de complejo dentino-pulpar, demostrando así la capacidad de autoproliferación de estas células. Además fueron capaces también de generar adipocitos y células neurales.

Por otra parte, se estudió el potencial odontogénico de 12 cepas de DPSCs, dos tercios de las cuales generaron abundante cantidad de dentina ectópica *in vivo*, y en el tercio restante sólo se detectó una cantidad limitada de dentina. Esto indica que las colonias difieren entre ellas en su potencial odontogénico. Todos estos resultados indican que las DPSCs se comportan como células madre, con capacidad autoregenerativa y de diferenciación.

Años después, cuando la existencia de células madre propias de la pulpa dental era ya un hecho más que constatado, Sloan y col. en su artículo de 2008 ⁽¹⁴⁶⁾ revisaron de forma más amplia lo escrito hasta entonces sobre las células madre de los tejidos orales, resaltando que las células madre se estructuran en nichos que están quiescentes cuando el tejido está sano y activos cuando sufre algún daño, ya que mueren odontoblastos, lo cual estimula una cascada de señales.

Existen varias teorías sobre dónde se localiza el nicho del que provienen las células madre pulpares y que promueve la proliferación de odontoblastos tras un daño pulpar. Se hipotetiza que esté en la misma pulpa, bajo la zona dañada, generando células derivadas de fibroblastos, o que se encuentre en regiones perivasculares adyacentes, migrando desde ahí a la zona dañada. Cuando se activan los progenitores, aumenta la expresión génica de NOTCH, que es una molécula de señalización que controla la actividad de la célula madre, y que se activa tras daño pulpar en diferentes localizaciones, como la pulpa, las capas subodontoblásticas o las estructuras perivasculares.

Estudios recientes sugieren que existe más de un progenitor de células madre en la pulpa dental madura, de diferente origen embrionario, uno tipo cresta neural y otro mesenquimal. Esto explicaría las diferentes respuestas de capacidad osteogénica, proliferativa y los distintos patrones de señalización NOTCH obtenidos en anteriores estudios, así como el hecho de que células madre de otros tejidos como la pulpa de dientes temporales y el periodonto tengan diferentes genotipos y patrones de expresión proteica.

Sloan y col. ⁽¹⁴⁶⁾ repasaban otras líneas de células madre dentales recientemente descritas por aquel entonces : SHED (de dientes temporales) y PDLSCs (del ligamento periodontal), estableciendo que mantienen un mayor potencial de crecimiento que las líneas celulares derivadas de médula ósea (BMSSCs). Además establecían que las SHED tienen mayor proliferación y mayor capacidad osteoinductiva que las DPSCs, pudiendo así mismo diferenciarse en odontoblastos. Son inmunorreactivas a sialofosfoproteína, pero no

pueden formar complejo dentino-pulpar, lo que las diferencia de las DPSCs y según se ha sugerido, podrían ser una línea previa de progenitores más inmadura.

El primer tipo de células madre dentales aisladas fueron del tejido pulpar (hDPSCs) de terceros molares de pacientes adultos jóvenes (mayores de 19 años) en la etapa de raíz en formación ó raíz recientemente completa. Debido a que en la mayoría de los casos estos pacientes no necesitan terapia de regeneración, se está estudiando la posibilidad de conservar estas células madre mediante técnicas como la criopreservación. (147)

El desarrollo dental es un proceso complejo que comprende varias etapas: corona completa, raíz en formación y raíz completa. En concreto, el desarrollo del tercer molar ocurre entre las siguientes edades: 12-16 años (corona completa), 15-20 años (raíz en formación), 18-25 años (raíz completa). Un gran número de pacientes presentan terceros molares que son potencialmente perjudiciales para los tejidos circundantes y dientes vecinos, de ahí que diversos estudios aislen células madres de estos dientes los cuales son extraídos por propósitos ortodóncicos o profilácticos.

Takeda y col., en 2008, (148) aislaron células madre de la pulpa del tercer molar en una etapa más temprana, tras la formación de la corona, para determinar la inducción de la osteo/odontogénesis, inducción de la adipogénesis, determinar la diferenciación neural y el número de duplicaciones. Los resultados sugirieron que el aislamiento de hDPSCs durante una etapa temprana del desarrollo del tercer molar mostraba un potencial de diferenciación comparable con los recogidos en estudios donde aislaban hDPSCs en etapas más tardías del desarrollo dental. También se realizó el trasplante de hDPSCs cultivadas a la superficie dorsal de ratones inmunodeprimidos. Las células generaron una matriz a las 8 semanas del trasplante y a las 15 semanas se produjo la formación de dentina y pulpa como tejido conectivo. Igualmente se observó una matriz de colágeno perpendicular a la capa de odontoblastos y existía evidencia de calcificación de la matriz dentinaria.

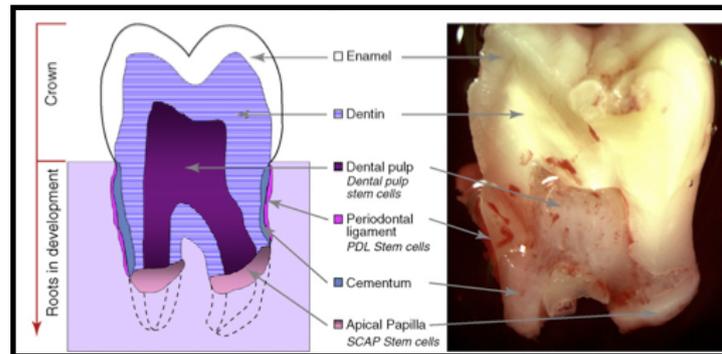


Figura. 5. Tercer molar humano en desarrollo. (149)

Esto sugiere que la pulpa dental contiene células madres capaces de generar dentina incluso cuando son aisladas en etapas tempranas del desarrollo dental. Así mismo, los autores del estudio observaron un potencial de proliferación mayor en esta etapa de desarrollo aunque la observación de células en cultivo a largo plazo reveló una pérdida en la capacidad de diferenciación tanto *in vitro* como *in vivo*.

Ding y col. constataron (147) que las células madre de la papila apical (SCAP) representaban una nueva población de células madres pluripotenciales, proposición que venía avalada por su capacidad de diferenciarse en odontoblastos y adipocitos y por su expresión de altos niveles de survivina y telomerasa, dos proteínas que juegan un papel crítico en la proliferación celular.

En comparación con las células madre del ligamento periodontal, las de la papila apical muestran un aumento de la capacidad de formación del tejido dentinario, lo que sugiere que la papila apical de la raíz contiene una población de células madres superior para la regeneración de tejidos. Estas células madre tienen un papel importante en el desarrollo radicular, apexogénesis, regeneración de pulpa y dentina e importantes aplicaciones por tanto en la ingeniería tisular.

1.4.3. Usos para la regeneración de tejidos

La regeneración de tejidos mediada por células madre mesenquimales es un acercamiento prometedor a la medicina regenerativa con un amplio abanico de aplicaciones. Sonoyama y col. ⁽¹⁴¹⁾ usando un modelo animal, transplantaron células madre SCAP y del ligamento periodontal (PDLSCs) para generar un complejo radiculo-periodontal capaz de dar soporte a una corona de porcelana que dé lugar a una unidad funcional.

Las células de la papila apical tienen más capacidad de proliferación que las de la pulpa (DPSCs), (lo cual se determina por la gran actividad de la telomerasa) así como un mayor potencial de regeneración de tejidos. Según Sonoyama y col. ⁽¹⁴⁰⁾, son además fáciles de obtener porque de un sólo diente obtenemos un gran número de ellas, e incluso podrían obtenerse de la papila apical de los cordales al extraerlos, y almacenarse en bancos en caso de necesidad de posteriores trasplantes autólogos.

En primer lugar se llevó a cabo un estudio de viabilidad: se tomaron células SCAP de la papila apical de la raíz de un diente porcino; y para comprobar si estas células podían diferenciarse, así como su capacidad dentinogénica, se transplantaron a un ratón inmunocomprometido usando un vector para el transporte de hidroxiapatita/tricalciofosfato (HA/TCP).

Observaron que se creaba dentina y tejido conjuntivo, y se pasaron también células madre del ligamento periodontal (PDLSCs) al ratón para ver si generaban cemento. Ocho semanas después de ser transplantadas *in vivo*, había cemento y Fibras de Sharpey (colágeno) ancladas a éste.

Estudios muy recientes, como el de Volponi y col., de 2010 ⁽¹⁴⁹⁾ se atreven a ir un paso más allá en la regeneración de tejidos, y clasifican los tipos de células madre del

tejido oral en función al potencial reparativo que estas tendrían con respecto a las distintas partes del diente susceptibles a la patología. Los dientes tienen una capacidad limitada de respuesta a la agresión y las células madre pueden ser la respuesta para el reemplazo de células dañadas y la reparación del tejido.

Las células madre orales pueden obtenerse muy fácilmente constituyendo una fuente autóloga de células para restaurar la vitalidad pulpar tras infección, regenerar el ligamento tras enfermedad periodontal o para generar estructuras dentales parciales o completas que funcionen como “implantes biológicos”. Como las células madre dentales comparten propiedades con las células madre mesenquimales, tienen también un considerable potencial para el tratamiento de desórdenes celulares mesenquimales, como por ejemplo la enfermedad de Parkinson.

Hay varias áreas en las cuáles se considera hoy en día que las células madre dentales pueden tener potencial reparativo, como, por ejemplo, la reparación de tejido dental como dentina, ligamento periodontal, pulpa e incluso esmalte. Se ha sugerido así mismo su uso para regeneración de tejidos no dentales como el tejido óseo y nervioso. (150)

Volponi y col. (149) tomaron células del ligamento periodontal de un tercer molar extraído que implantaron posteriormente en otra localización dónde hubiera un daño periodontal, y observaron cómo se regeneraba el ligamento y se creaba cemento neoformado, mientras que Huang y col. (151) consiguieron la regeneración pulpar completa de un diente desvitalizado introduciendo células madre derivadas de la pulpa y de la papila apical. Es muy importante asegurarse de que aunque se haya eliminado la pulpa sigue habiendo un aporte adecuado de sangre (mantenimiento de la vascularización en el ápice).

Cuando se ha perdido por completo una pieza dental la opción terapéutica más frecuente es la colocación de un implante metálico en el hueso. Una de las razones del fallo de los implantes es que en ausencia de ligamento periodontal, las fuerzas se transmiten

directamente al hueso. Hoy día se prefiere un implante con base celular antes que metálica.

Lo más importante es conseguir la formación de la raíz con su ligamento periodontal, y su aporte nervioso y sanguíneo, y esto requiere la existencia de dos tipos de células: epiteliales y mesenquimales. Hay dos maneras de conseguir la regeneración: con inducción epitelial de células mesenquimales o viceversa.

Sólo se han encontrado células madre embrionarias epiteliales capaces de proporcionar una respuesta odontogénica, excepto las de la Vaina Epitelial de Malassez, que contienen restos de células embrionarias y pueden encontrarse en dientes adultos. Se ha visto que el cultivo de estas células puede crear estructuras de esmalte. También se han tomado células de la mucosa oral que consiguen crear partes dentales aunque en ningún caso un diente completo.

Sin embargo, la capacidad odontogénica de las células mesenquimales ha sido sobradamente probada tanto *in vitro* como *in vivo*, y son mucho más fáciles de conseguir como hemos visto anteriormente, por lo que la tendencia actual en investigación se decanta por esta segunda opción.

Las células disociadas (separación de células epiteliales y mesenquimales) tienen la capacidad de reorganizarse formando aquellas estructuras para las que estaban programadas cuando vuelven a asociarse, de modo que si las obtenemos ya disociadas de la lámina primordial embrionaria de los dientes, se puede conseguir crear una nueva estructura dental mediante reagregación celular.

1.4.4. Revascularización

La revascularización de la pulpa parcialmente necrótica en una raíz inmadura presenta relación con las células madre vitales localizadas en la papila apical. Estas pueden

sobrevivir a la necrosis pulpar incluso en presencia de una infección periradicular. Son capaces de resistir bajo condiciones extremas, como quimioterapia o radiación, de ahí la recurrencia de algunos tumores. (152)

Al inducir la formación del coágulo con limas más allá del ápice, las células madre de la papila apical emergen dentro del conducto y se diferencian posteriormente en odontoblastos. Estos odontoblastos secundarios permiten la posterior deposición de dentina. La supervivencia de las células madre se ve beneficiada por un suministro sanguíneo a la papila apical, lo que contribuye a la revascularización de la pulpa y a la finalización del desarrollo radicular. Una raíz más larga y más gruesa disminuye el riesgo de fractura del diente, problemática que surge con los procedimientos de apicoformación (153). Además un diente con tratamiento exitoso de revascularización no requiere tratamiento adicional, a diferencia de la apicoformación.

Por lo tanto, la literatura actual está siguiendo un protocolo de no instrumentación del canal en todo el procedimiento de revascularización con el fin de preservar estas células madres de la papila apical. Sin embargo, se necesita una mayor evidencia científica para determinar si las células madres de la papila apical son totalmente responsables de la diferenciación en odontoblastos y posteriormente de la deposición de dentina implicada en la maduración de la raíz. Tampoco se ha determinado el estado y la duración de la patología que dará lugar a la destrucción completa de células mesenquimales apicales y supervivencia de células madre de la pulpa dental

1.4.5. Células madre y regulación del movimiento dentario.

Hasta el momento, no es mucho lo que se ha publicado acerca de la relación entre células madre y movimiento dentario, pero varias afirmaciones publicadas en los últimos años han ido abriendo camino para futuras investigaciones.

En 1992, Zahrowski y Turley ⁽¹⁵⁴⁾ estudiaron los efectos en ratas de la magnitud de la fuerza sobre la actividad celular de los progenitores osteoblásticos durante la expansión palatina, encontrando que las fuerzas mayores de 100 gramos se correspondían con un aumento en el número de células osteoblásticas, aunque a partir de una fuerza determinada disminuía el número de progenitores, y a fuerzas de 200 gramos no había diferencia con los controles, con lo que sugerían que la formación ósea podía maximizarse variando la magnitud de la fuerza y la distancia al punto de aplicación de la misma.

En 1997, Basdra y Komposch ⁽¹⁵⁵⁾ realizaron un análisis concluyendo que los fibroblastos del LPD en humanos exhibían *in vitro* características fenotípicas consistentes con las de las células osteoblásticas. Este hecho les llevó a sugerir la posibilidad de que tuvieran el potencial de diferenciarse en osteoblastos, osteoclastos y/o cementoblastos, aunque aún se desconoce qué factores mediarían este proceso. En 2001, Zetner y col. ⁽¹⁵⁶⁾ realizaron un experimento en ratas que demostraba que la fuerza mecánica no sólo activaba precursores de células óseas sino que también inducía una progresión mayor del ciclo celular de células progenitoras de fibroblastos gingivales. En 2008, Nayak y col. ⁽¹⁵⁷⁾ publicaron un estudio en el que se transplantaban células madre del ligamento periodontal para lograr su total cicatrización, a la vez que realizaba un movimiento ortodóncico. Este autor postulaba que el rango de recuperación del ligamento periodontal tras haber sido dañado era muy limitado, y que los intentos por recuperarlo mediante el uso de diferentes moléculas como algunos componentes de la matriz extracelular, factores de crecimiento ⁽¹⁵⁸⁾, ⁽¹⁵⁹⁾ e incluso trasplantes celulares, no habían tenido el éxito esperado. En este último caso, el problema residía en que las nuevas células introducidas no estaban marcadas, haciendo imposible saber con posterioridad cuantas de las células encontradas provenían de la nueva colonia y cuáles no.

Los resultados de su estudio fueron que en un entorno de movimiento dentario ortodóncico, las células madre del ligamento periodontal transplantadas se diferenciaron en tipos celulares osteogénicos y no osteogénicos, y tal diferenciación se inició alrededor de

las áreas perivasculares de los vasos sanguíneos del periodonto, de forma simultánea a la entrada de las nuevas células en el tejido dañado.

En aquellos tejidos donde el movimiento dentario ortodóncico haya sido extenso, el trasplante de células madre progenitoras del ligamento periodontal puede ser usado para potenciar la cicatrización y el restablecimiento de los tejidos, ya que, al parecer, el movimiento ortodóncico potencia la neoformación celular. La alta vascularización que se produce a consecuencia de la aplicación de fuerza mecánica externa sobre el diente, hace que las células transplantadas migren con más facilidad, proliferando y diferenciándose más rápidamente.

Recientemente, los estudios de Yu y Barnouti, ambos de 2011, avalados por estudios anteriores, confirman el papel de diferentes moléculas en la proliferación de promotores celulares óseos. Según Yu y col. ⁽¹⁶⁰⁾, una sobre expresión de Osteoprotegerina induce la diferenciación de pre-osteoblastos en osteoblastos maduros y de acuerdo con Barnouti y col. ⁽¹⁶¹⁾ las BMPs, especialmente las de tipo 2 y 4, aceleran la diferenciación de células mesenquimales en células óseas.

1.5. Métodos de modificación del movimiento dentario ortodóncico.

La modificación del movimiento dentario ortodóncico comprende todas aquellas técnicas que, de forma coadyuvante a la clásica aplicación de fuerzas ortodóncicas (mediante aparatología diseñada para tal propósito), ejerzan algún efecto sobre la tasa neta de movimiento dentario, ya sea acelerándola, disminuyéndola o inhibiéndola totalmente. En las últimas dos décadas, han sido muchos los métodos descritos en la literatura científica acerca del MDO, con resultados contradictorios e incluso en ocasiones, controvertidos. Con la idea de poder establecer un esquema claro de los mismos, se ha realizado una revisión sistemática, incluyendo aquellos artículos que conciernan el MDO

modificado biológicamente, tanto para aumentarlo como para disminuirlo. No se establecieron límites temporales y la revisión se actualizó hasta Febrero de 2014.

Debido a la creciente importancia de la medicina basada en la evidencia, nuestro propósito es analizar aquellos artículos que ofrezcan experimentación sobre la modificación del movimiento dentario ortodóncico, resumiendo los datos expuestos de forma que pueda realizarse una comparación efectiva entre métodos, incluyendo así mismo un análisis de calidad de los citados artículos, con el fin de crear un esquema claro y comprensible de los métodos existentes y su efectividad, abriendo la puerta a las múltiples posibilidades que ofrece la terapia ortodóncica acelerada. En líneas generales podemos encontrar cinco grandes grupos de investigación: métodos quirúrgicos, farmacológicos o químicos, láser, uso de campos magnéticos y terapia génica.

1.5.1. Métodos de deceleración del movimiento dentario ortodóncico

1.5.1.1. Químicos.

Los métodos químicos que retardan o incluso inhiben el movimiento dentario ortodóncico, están relacionados sobretodo con el uso de fármacos por parte del paciente y con la utilización de diferentes moléculas biológicas cuya aplicación podría según los autores, proveer al clínico de un anclaje diferencial.

Los bifosfonatos son análogos sintéticos del pirofosfato orgánico (PPi), un regulador endógeno de la mineralización ósea. Su estructura de fosfonato-carbón-fosfonato (P-C-P) les proporciona su habilidad para unir iones metálicos divalentes como por ejemplo el calcio. (162) Debido a esto, los bifosfonatos se eliminan rápidamente del torrente circulatorio y se unen a las superficies óseas *in vivo* en lugares de remodelación ósea activa, particularmente en áreas en las que esté ocurriendo un proceso de reabsorción osteoclástica.

Además, son altamente selectivos por los osteoclastos, por lo que su objetivo es alcanzar el hueso y almacenarse allí hasta que son liberados localmente cuando ocurre una reabsorción ósea. ⁽¹⁶³⁾ Suprimen la actividad osteoclástica, se pierde la integridad del citoesqueleto, el borde ondulado del osteoclasto y finalmente se produce la apoptosis de la célula. Los bifosfonatos inhiben la expresión de RANKL y potencian la producción de OPG por parte de las células de la médula ósea y los osteoblastos de modo que la interacción RANK-RANKL queda interrumpida, provocando la disminución de la reabsorción ósea. ⁽¹⁶⁴⁾

El papel de los bifosfonatos en el movimiento dentario ortodóncico ha sido discutido largamente durante las últimas dos décadas. Choi y col., en su estudio de 2010 ⁽¹⁶⁵⁾ establecieron una relación entre el uso de Clodronato y el movimiento ortodóncico en ratas Wistar usando dos concentraciones: 10 y 2,5 mg/mol, encontrando un descenso en el movimiento dentario en ambos grupos.

Estos resultados son consistentes con los publicados por Adachi y col. ⁽¹⁶⁶⁾ Igarashi y col. ⁽¹⁶⁷⁾ y Liu y col. ⁽¹⁶⁸⁾ en los que se describe que el MDO disminuye cuando se inyectan bifosfonatos intragingivalmente, el movimiento dental ortodóncico decrece, como consecuencia de los cambios en forma y función que se inducen en el osteoclasto que reducen la expresión de H(+)-ATPasa y catepsina K durante el MDO. ⁽¹⁶⁹⁾ De acuerdo con sus estudios, el Risedronato sería el de mayor acción contra el MDO, seguido del Clodronato y el Pamidronato, que al parecer decrece el número de osteoclastos sin afectar de forma relevante al MOD.

Más recientemente, en 2013, estudios como los de Kaipatur et al, ⁽¹⁷⁰⁾ confirman el papel inhibitor de los bifosfonatos, encontrando un 65% menos de MDO cuando éste se hacía al mismo tiempo que la administración de Alendronato, y el 86% cuando se hacía 3

meses después de la administración del mismo. Toro et al, (171) en un estudio similar en ratas, confirmó que tanto el Alendronato como la Bis-enoxacina inhiben el MDO.

Se ha propuesto también que los bifosfonatos podrían tener un efecto de disminución de la reabsorción radicular, y podrían así mismo ser usados para proveer anclaje diferencial y evitar la recidiva, aunque es importante resaltar que la mayoría de los estudios que proponían el uso de bifosfonatos para proporcionar anclaje y evitar la recidiva fueron publicados antes del 2003, año en que Migliorati publicó el primer informe que relacionaba bifosfonatos con osteonecrosis mandibular, por lo que las hipótesis deben ser tomadas con cautela. (172)

Por otra parte, las prostaglandinas son mediadores de la inflamación muy conocidos, y el dolor que causa en el paciente el tratamiento ortodóncico puede con frecuencia hacer que necesite tomar algún analgésico. Los antiinflamatorios no esteroideos o AINES actúan como inhibidores de la síntesis de prostaglandinas vía ciclooxigenasa, que es la enzima que regula su síntesis. Según los estudios consultados, los AINES y otros inhibidores selectivos de la COX-2 como el Rofecoxib y el Celecoxib disminuyen el MDO.

En 1984 Sandy (173) estudió los efectos del Fluribuprofeno en conejos aplicando 100g de fuerza con un muelle cerrado, y Arias y col. en 2006 (174) realizaron una comparación en ratas entre el Ibuprofeno, el ácido acetyl salicílico (AAS) y el acetaminoprofeno. Ambos estudios llegaban a conclusiones similares: los AINES disminuyen el número de osteoclastos mediante la inhibición de las prostaglandinas decreciendo por tanto el MDO. Sin embargo, el acetaminoprofeno, que pertenece a la familia de los paraminofenoles ejerce acción analgésica sin interferir con el movimiento dental. Esto mismo ocurría con el Tenoxicam, de la familia oxicam, estudiado por Arantes y col. en 2009 (175) en un ensayo clínico randomizado a doble ciego en 36 pacientes.

Los inhibidores selectivos de la COX₂ como el Rofecoxib fueron comparados por De Carlos y col. en su artículo de 2006 ⁽¹⁷⁶⁾ con un AINE (Diclofenaco) usando en ratas dos intensidades diferentes de fuerza (50 y 100 g) encontrando una inhibición parcial y total con el Rofecoxib y el Diclofenaco respectivamente. Más tarde, en su estudio de 2007 ⁽¹⁷⁷⁾, comparó tres terapias diferentes de Coxib (Rofecoxib, Parecoxib y Celecoxib), estableciendo que para uso terapéutico, el primero era el menos adecuado y el Celecoxib era el de uso recomendado como analgésico durante la terapia ortodóncica.

Gameiro y col. en 2008 ⁽¹⁷⁸⁾ comprobaron los efectos del uso de Celecoxib a corto y largo plazo en ratas demostrando que aunque el número de osteoclastos no disminuía significativamente, su actividad celular sí lo hacía, en detrimento por tanto del MDO, que se enlentecía. Debe tenerse en cuenta que los experimentos revisados utilizan unos rangos de fuerza muy altos (hasta 100 g en conejos) y que el estrés causado en los animales por las terapias de administración por vía parenteral continuada podría influir en los resultados. ⁽¹⁷⁸⁾

Karsten y col., en su artículo de 1997 ⁽¹⁷⁹⁾, describieron el significativo descenso que se observaba en la expansión palatina ortodóncica cuando se inyectaba Fenitoína (un fármaco anticonvulsivo) de forma intragingival en ratas con un dispositivo de expansión que ejercía una fuerza de 15g. Este descenso puede deberse a la inhibición de la actividad osteoclástica encontrada en la superficie ósea alveolar y al incremento de densidad de los fibroblastos del ligamento periodontal en el lado de presión, mientras que en el lado de tensión, la Fenitoína aumenta la aposición de hueso no mineralizado. La administración de Fluoruro, tal y como se muestra en los artículos de Gonzales en 2011 ⁽¹⁸⁰⁾ y Hellsing en 1991 ⁽¹⁸¹⁾ disminuyeron el MDO en un 74% y un 52% respectivamente. La administración oral de fluoruro se ha utilizado en el pasado para evitar la caries y la desmineralización ósea, y a pesar de que suprime la reabsorción radicular durante el tratamiento ortodóncico, también disminuye su velocidad, tal y como se demuestra en los artículos de Hellsing y Gonzales.

Finalmente, Meh, en 2011, ⁽¹⁸²⁾ encontró un descenso de MDO usando Cetirizina, un antagonista de los receptores de histamina, demostrando que el uso crónico de antihistamínicos en los pacientes de ortodoncia podría suprimir el MDO.

1.5.2. Métodos de aceleración del movimiento dentario ortodóncico.

1.5.2.1. Químicos

Prostaglandinas

La inhibición de las prostaglandinas disminuye el MDO, por lo que derivándose de este principio, la utilización de estas debería aumentarlo. Basados en esta premisa destacan los estudios de Seifi y col. en 2003 ⁽¹⁸³⁾ y de Gurton y col. ⁽¹⁸⁴⁾ en 2004. Seifi y col. ⁽¹⁸⁵⁾ inyectaron PgE₂ en ratas encontrando un claro incremento de movimiento dentario ortodóncico y al combinarlo con calcio, aunque la tasa de MDO pasó de 0,47 a 0,40 mm, parecía haber mayor control sobre la reabsorción radicular. Gurton y col. ⁽¹⁸⁴⁾ compararon dos análogos de las prostaglandinas, prostaciclina (PGI₂) y tromboxano (TxA₂), con dos inhibidores de estos, indometacina e imidazol. Los análogos aumentaron significativamente el número de osteoclastos multinucleares y la tasa de MDO en ratas, ejerciendo una acción mucho más intensa la prostaciclina que el tromboxano. Por su parte, los inhibidores disminuían el MDO cuando se inyectaban en altas concentraciones aunque no se observaron diferencias relevantes entre ambos en cuanto a su potencial inhibitorio.

Estos resultados son consistentes con los publicados por Chung y col. en 2007 ⁽¹⁸⁵⁾ inyectaron antagonistas de la EP₄ en el lado de tensión para estimular la producción de prostaglandina (PGE₂) induciendo por tanto una respuesta ósea anabólica a la carga externa. Durante el movimiento dental inducido por estrés mecánico, el LPD y los osteoblastos producen prostaglandinas tipo E, que realizan una doble tarea: promover la reabsorción ósea (aumentando por tanto el MDO) y promover la formación ósea.

Por esa razón, el propósito de estos autores es inducir la síntesis de PGE, aunque es importante recordar que aunque los tres experimentos se realizaron en ratas, los rangos de fuerza usados, así como los dispositivos ortodóncicos, varían mucho entre ellos: Gurton usó un resorte de acero inoxidable que aplicaba 20 g de fuerza, Seifi un muelle cerrado de Niquel-Titanio que ejercía 60 g y Chung, arcos de Niquel-Titanio de 6,5 g, por lo que es difícil establecer comparaciones entre ellos.

Antagonistas de los receptores ET_A:

La endotelina 1 (ET-1) es liberada en situaciones de estrés intravascular, hipoxia e isquemia por parte de células endoteliales, fibroblastos y osteoblastos entre otras células (186) y estimula la formación de hueso predominantemente vía receptores ET_A de los osteoblastos. Por tanto, la aplicación de un antagonista de la endotelina 1 que actúe de forma selectiva sobre los receptores ET_A debería acelerar el MDO. Sin embargo, los estudios acerca de la influencia de la ET-1 sobre la reabsorción ósea son controvertidos. Mientras, algunos autores como Chiao y col., en el año 2000 (187), defienden la teoría de que inhibe la reabsorción, otros como Stern y col., 1995 (188), creen que la potencia. El Tezosentan, un antagonista de los receptores ET_A y ET_B aumenta la reabsorción ósea y el MDO. Sprogar y col., en 2007 (189) informó de un descenso significativo en el MDO en ratas tratadas con TBC3214, un antagonista altamente selectivo de los receptores ET_A.

Como explicación a este hallazgo propuso dos hipótesis; en primer lugar que la endotelina 1 potencie la reabsorción ósea vía receptores ET_A por lo que un antagonista selectivo de este disminuiría el MDO. En segundo lugar, que la endotelina 1 inhiba la reabsorción ósea indirectamente: una mayor actividad de los receptores ET_B versus ET_A resultaría en una disminución de MDO porque la eliminación de endotelina está mediada por los receptores ET_B que al aumentar la retirarían antes.

Hormonas:

Por su parte, la aplicación local y sistémica de PTH para aumentar el MDO ha fue estudiada por Soma y col. (42) entre varios autores. En su artículo publicado en el año 2000, (43) se utilizaban inyecciones intragingivales de PTH combinadas con un gel de metilcelulosa para retardar su liberación, consiguiendo un aumento de 1,6 veces en el movimiento dentario ortodóncico y encontrando en análisis histológico reabsorción osteoclástica del hueso y ensanchamiento del espacio periodontal en el lado de compresión. Aunque la aplicación local de PTH presenta la ventaja de necesitar 1/32 veces menos concentración de la requerida en aplicaciones sistémicas, debe ser inyectada constantemente para mantener niveles óptimos en los tejidos circundantes. Aún combinada con el gel de metilcelulosa, debía ser aplicada cada 72 horas, haciendo de la alta frecuencia de aplicación uno de los mayores inconvenientes para su uso en la práctica clínica. Li et al, (190) encontraron en 2013 un 38% más de MDO en ratas inyectando diariamente 4µg/100g de peso durante 12 días seguidos.

Hellsing en 1991 (181) halló un 32% más de MDO en ratas embarazadas comparándolo con el que se daba en ratas no embarazadas, argumentando que los estrógenos junto con una desmineralización ósea aumentada debido a la osteoporosis podrían ser la causa de la aceleración del MDO. Salazar et al, a su vez (191) realizaron un experimento en ratas sometidas a ovariectomía cuya falta de estrógenos había inducido un estado osteoporótico. Las trataron con teriparatida, una fracción de la PTH humanas, encontrando un aumento en el MDO del 15%, proponiendo por tanto el uso de teriparatida como un tratamiento para la osteoporosis con menores efectos secundarios para la ortodoncia que los bifosfonatos clásicos.

Simvastatina, colestasis y opioides:

Nilforoushan y col. en 2002, ⁽¹⁹²⁾ realizaron ligaduras de los conductos biliares en ratas y tras la aplicación de fuerzas ortodóncicas encontraron una aceleración en el MDO que al combinarse con naltrexona (un opiáceo), no tuvo lugar. Han y col. ⁽¹⁹³⁾ en 2010, utilizaron simvastatina, un fármaco que se usa para disminuir las concentraciones de colesterol séricas, para disminuir la recidiva ortodóncica, encontrando que el fármaco estimulaba la formación ósea osteoblástica disminuyendo significativamente el MDO.

La colestasis hepática es una enfermedad asociada con osteopenia y dificultad en el remodelamiento óseo. Resulta de la deficiencia de sales biliales intraluminales, esenciales para la absorción de vitamina D, que conlleva una reducción de la función osteoblástica y del factor de crecimiento 1 ⁽¹⁹⁴⁾. Además, esta enfermedad se asocia con un aumento en la neurotransmisión mediada por opiáceos. Los resultados de Nilforoushan y Han son consistentes con este hecho, la inducción de un estado colestásico en ratas puede aumentar el MDO mientras el uso de simvastatina lo disminuiría. Finalmente, Akhoundi in 2010, ⁽¹⁹⁵⁾ estudió el efecto de la morfina sobre el MDO en ratas, encontrando un descenso del 52% que no tuvo lugar cuando se usó otro opioide, la naltrexona.

Otros:

Se considera que el M-CSF es capaz de inducir la diferenciación temprana de osteoblastos. Brooks en 2011 ⁽¹⁹⁶⁾ encontró un aumento del 14% al utilizarlo. Las fibras nerviosas periféricas juegan un papel crucial en los procesos inflamatorios causados por el MDO. Davila en 2011, ⁽¹⁹⁷⁾ examinó el efecto de la denervación causada por la administración neonatal de capsaicina en ratas, que no afectó finalmente la tasa de MDO.

1.5.2.2. Quirúrgicos

Existen dos tipos de técnicas quirúrgicas principales aplicadas a la aceleración del movimiento dentario ortodóncico: la corticotomía y la distracción ósea ó la osteotomía.

La *corticotomía* (198) consiste en realizar pequeñas perforaciones en el hueso cortical que desencadenan una respuesta inflamatoria reparativa que eleva la actividad de varias citoquinas acelerando por tanto el MOD. Este efecto puede explicarse mediante el Fenómeno de Aceleración Regional o RAP descrito por Frost en 1983 (199), por el cual el hueso que rodea las raíces dentales se desmineraliza durante un periodo de tiempo corto durante el cual puede obtenerse MDO más rápido, antes de que la remineralización comience de nuevo, sosteniendo que era un sistema de alarma diseñado para potenciar la cicatrización ósea local como defensa tisular a la agresión. Al infligir un daño tisular, se aceleran procesos como la renovación celular ósea y cartilaginosa y la remodelación ósea en la zona de la lesión. (200)

Shin y Norrdin (201) realizaron estudios en animales acerca de la cicatrización de los defectos óseos, induciendo heridas quirúrgicas en huesos largos para observar el proceso de remodelación ósea que tenía lugar. Así, demostraron que el RAP potencia la reorganización de los tejidos alrededor de la herida, así como la cicatrización mediante la formación transitoria de tejidos mineralizados y no mineralizados después de un daño óseo cortical.

Bollander y col. (202) aseguraban que el RAP comenzaba justo después del daño óseo, y se veía influenciado por factores mecánicos, genéticos inmunológicos y hormonales cuyo funcionamiento detallado es desconocido, aunque sí se sabe que el hueso pasa por todos los estadios de cicatrización hasta que se calcifica por completo. Estos estudios sugieren que los niveles disminuidos de calcio y la menor densidad ósea que se dan durante el fenómeno de aceleración regional son los factores que facilitan el

movimiento acelerado del diente durante el tratamiento ortodóncico inducido por corticotomía.

En 2001, los doctores Wilcko (198) desarrollaron la corticotomía como parte de un proceso acuñado como “Ortodoncia Osteogénica Acelerada”, basado en la realización de corticotomías alveolares seguidas de un agregado trióxido mineral en combinación con la terapia ortodóncica convencional, con la cual puede conseguirse la finalización del tratamiento usando entre un tercio y un cuarto del tiempo que se empleaba en la finalización de los tratamientos tradicionalmente. (203)

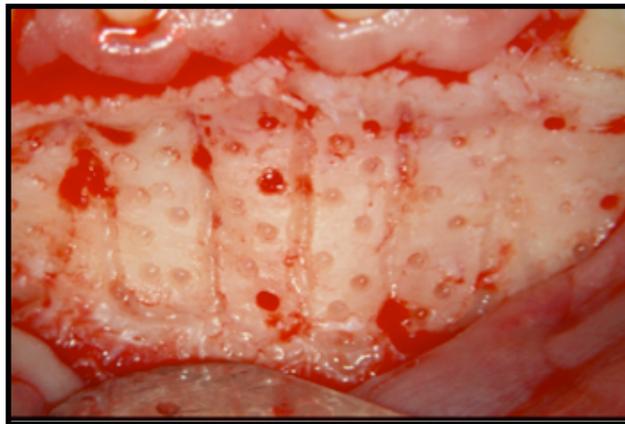


Figura. 6. Esquema convencional de corticotomía. (200)

No obstante, la corticotomía para facilitar el tratamiento ortodóncico no es un procedimiento quirúrgico reciente, ya que Guilford en 1898 (204) publicó los primeros informes en inglés sobre esta técnica. Sin embargo, Köle (205) fue el que proporcionó en primer lugar una descripción detallada del procedimiento. Él creía que el hueso cortical era el responsable del enlentecimiento del movimiento ortodóncico por lo que al interrumpir su solución de continuidad, se acentuaría el movimiento.

En su técnica, se practicaban cortes interdentes verticales y un corte horizontal supra-apical más parecido a una osteotomía en el caso de realizarse en la arcada superior, donde en ocasiones se alcanzaba la membrana sinusal de Schneider. En arcada inferior sin

embargo, el corte horizontal se realizaba de forma más parecida a la corticotomía para no interferir con las estructuras nerviosas.

Según su punto de vista, si la médula ósea permanecía intacta se prevenía el daño periodontal y se mantenía la vitalidad pulpar, evitándose también la reabsorción radicular ya que lo que se movía eran “unidades de hueso” y no dientes. Al terminar con la técnica quirúrgica, se colocaban una serie de aparatos ortodóncicos y el tratamiento, según Köle (205), se concluía en 12 semanas, y la retención podía ser tan solo de 6-12 meses debido a que la cicatrización ósea proporcionaba un “soporte añadido” a los dientes. Al ser un tratamiento complejo que incluía una cirugía extensa, el procedimiento no fue muy aceptado.

Bell y Levy (206) estudiaron la posible interrupción de la vascularización, que según ellos se daba con la técnica de Köle, en Monos Rhesus. Determinaron, que particularmente en los incisivos centrales, semanas después, ocurría una isquemia y cambio de coloración. Propusieron como explicación el hecho de que las raíces están más próximas y el hueso es más denso, menos esponjoso en esa zona, y al realizar los cortes, se interrumpía el aporte sanguíneo apical. Sin embargo no aplicaban estrictamente la técnica de Köle, sino que todos los cortes eran corticotomías a los que se les aplicaba un distractor óseo, haciendo que la movilización de los segmentos cortara el aporte vascular.

Posteriormente, en 1975, Duker (207) investigó los efectos de la corticotomía sobre el periodonto y el tejido pulpar. Siguió en líneas generales la técnica de Köle con una salvedad, los cortes interdentes debían quedar a 2 mm al menos de la cresta alveolar, ya que según este autor, esa medida evitaría daños periodontales y pulpares, tal y como avalaron sus resultados.

Desde los años 70 hasta la década de los 90, varios autores como Mossaz (208) continuaron aplicando y desarrollando esta técnica, haciéndola más asequible para la

práctica diaria, aplicando de forma inmediata fuerzas altas e investigando el posible daño periodontal, del que no parecía haber constancia en ningún caso, según Kerdvongbundit (209) podía deberse a la corta duración del tiempo de tratamiento. Sin embargo, el método por el que histológicamente se movían los dientes era aún desconocido.

En 1998 Liou y Huang (210) variaron la técnica original practicando en lugar de cortes de mayor profundidad, unas perforaciones o estrías en el hueso, que resultaron ser igualmente efectivas simplificando en gran medida la técnica. Este hallazgo sorprendió a la comunidad científica, que no se explicaba por qué los resultados eran tan similares a los obtenidos con la técnica inicial.

Ya en 2001, los Doctores Thomas y William Wilcko (198) patentaron la técnica denominada por ellos como “*Accelerated Osteogenic Orthodontics*” u Ortodoncia Osteogénica Acelerada (AOO). La diferencia principal con el resto de técnicas es que incluye el suplemento con hueso sintético en la región alveolar pretendiendo evitar la pérdida de altura de la cresta ósea preservando el periodonto (se evitan dehiscencias, recesiones gingivales o bolsas) y facilitando la formación ósea, comprobada por medio de tomografías seriadas.

La repetición de las tomografías mostraba hasta dos años después de la finalización del procedimiento (que puede completarse entre 4 y 6 meses según los Doctores Wilcko) la existencia de un tejido óseo remineralizado en diferentes grados (mayor capacidad de remineralización cuanto más joven fuera el paciente) alrededor de las raíces dentales, lo que avalaba que el MDO se producía a consecuencia del RAP y no por el desplazamiento de los segmentos óseos.

Gran parte de la literatura publicada acerca de la corticotomía se basa en informes de casos (Wilcko 2005 (211)) y se sabe muy poco de la base celular que hay detrás de estos procedimientos. Los estudios de Lee y col. (212) y Wang y col. (213) apoyan la teoría de Frost

(199); se trata de una respuesta local en la que la inflamación provocada por el trauma conlleva una desmineralización ósea transitoria que aumenta las citoquinas y facilita el MDO.

Iino en 2007 ⁽²¹⁴⁾, Mostafa ⁽²¹⁵⁾ en 2009, Sanjideh ⁽²¹⁶⁾, Teixeira ⁽²¹⁷⁾ en 2010 y Baloul en 2011 ⁽²¹⁸⁾ estudiaron los efectos de la corticotomía sobre el MDO mediante experimentos en perros y ratas respectivamente, y aunque los rangos de fuerza diferían ampliamente (de 200 a 50 g) muestran datos similares: el MDO consigue una tasa de aceleración del doble cuando se utiliza corticotomía. Fischer ⁽²¹⁹⁾ publicó en 2007 una investigación en 6 pacientes con impactación bilateral de caninos, y el uso de corticotomía disminuyó el tiempo de tratamiento entre un 28 y un 33%. Aboul-Ela en 2011 ⁽²²⁰⁾ encontró a su vez doble tasa de MDO cuando se utilizaba corticotomía para la retracción bilateral de caninos en 13 pacientes.

Más recientemente, hemos observado que existe una tendencia a disminuir la extensión de las intervenciones quirúrgicas, y estudios como el ensayo clínico randomizado realizado en 2013 por Alikhani, ⁽²²¹⁾ muestra un aumento en el MDO de 2.3 veces más cuando se realizan microperforaciones en el hueso cortical, sin necesidad de colgajo previo. Kim YS et al, ⁽²²²⁾ también en 2013, encontró 3.26 y 2.45 veces más MDO en maxilar y mandíbula respectivamente en su estudio en perros, cuando se realizaba “piezocisión” o perforaciones corticales a través del tejido blando, sin realización de colgajo tampoco en este caso.

Sin embargo, en la corticotomía, como en la mayoría de los procesos locales, los efectos son temporales, por lo que la aceleración inicial disminuye. Se han observado tres fases en la cicatrización ósea en ratas ⁽²¹³⁾: una fase resortiva a los 3 días, reemplazamiento a los 21 días y remineralización a los 60 días, por lo que entre los días 20 y 30 se necesitaría una segunda cirugía si no se ha completado el movimiento. Sanjideh y col. ⁽²¹⁶⁾ llevaron a cabo un experimento en perros en el que se repetían las cirugías a los 28 días sin

encontrar diferencias significativas con el movimiento logrado mediante corticotomías realizadas una única vez.

Al ser un fenómeno local afecta al lugar del trauma y al hueso adyacente, por lo que encontramos como inconveniente que si se necesita enderezamiento en la arcada completa, necesitaríamos realizar múltiples intervenciones (con los riesgos inherentes que ello conlleva) y como ventaja que la corticotomía podría conseguir un anclaje diferencial. (213) Aunque la inflamación controlada puede funcionar en nuestro beneficio, puede crear también daño periodontal y dental además de pérdida ósea si se descontrola.

Actualmente se piensa que la razón del MDO es que el hueso tras una agresión quirúrgica entra en un estado de desmineralización que lo hace más susceptible a los cambios, un estado que se ha denominado de osteopenia alveolar y que se caracteriza por recambio óseo acelerado, descenso de masa ósea mineralizada y aumento de la matriz osteoide no mineralizada, manteniendo el volumen total de masa ósea pero disminuyendo su densidad. Esta osteopenia es inducida por la corticotomía y es reversible. (223)

La *Osteotomía* fue descrita por primera vez en la literatura por Codivilla en 1905 (224) y desarrollada posteriormente por Ilizarov en 1988 (225). Está basada en la Distracción Osteogénica, en la que un segmento de hueso se separa por completo, formándose un callo óseo.

La osteotomía como acelerador del MDO fue analizada por Liou y col. en 2000. (226) Según sus afirmaciones, el movimiento dental podía facilitarse cuando se realizaba a través de hueso fibroso neoformado tras distracción ósea. Sus resultados sugieren que el MDO puede darse cuatro veces más rápido cuando se comienza inmediatamente después de la distracción comparándolo con la aplicación simultánea de ambas técnicas.

Iseri (227), Kumar (228) y Kharkhar (229) realizaron por su parte distracciones óseas con el fin de acelerar la retracción de los caninos en casos de extracciones en 10, 8 y 6

pacientes respectivamente. Iseri y col., en 2005 (227) establecieron que el movimiento se daba un 50% más rápido que en el lado control, consiguiendo la retracción canina completa en un plazo de 8 a 14 días. Kumar y col. en 2009 (228) completaron la retracción en 20 días, y un año después Kharkhar y col. (229) lo consiguieron en 12 días. Ninguno de ellos describe pérdidas de la vitalidad pulpar, lesión gingival o reabsorción radicular.

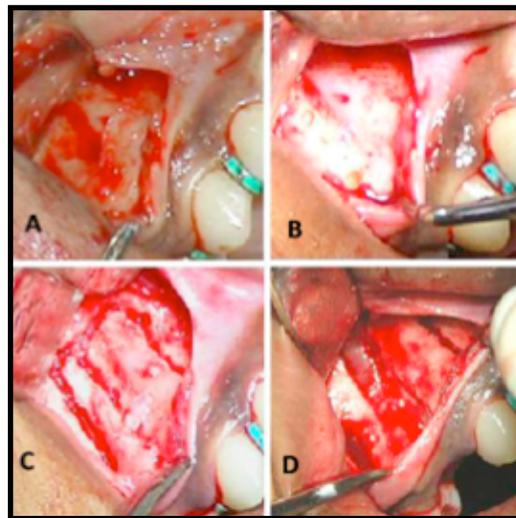


Figura 7. Distracción Dentoalveolar. A) Incisión, B) Realización de perforaciones, C) Conexión de las perforaciones, D) Remoción de espículas óseas. (174)

Para realizar osteotomía con fines de acelerar el MDO, hay que conseguir la resección completa del hueso cortical dejando de 0,5 a 1 mm del hueso alveolar adyacente a los dientes a mover, colocando un dispositivo de distracción o tornillo de disyunción que conecte ambos lados del hueso. Según Liou y col. (210), se necesita un periodo de latencia de 7 días después del cual, el tornillo puede activarse 1 mm al día. En los estudios consultados (Iseri (227), Kumar (228) y Kharkhar (229)) la activación se realizó inmediatamente y 2 y 3 días después de la colocación del dispositivo, aplicando 0,5 y 0,8 mm/al día.

Los efectos a largo plazo de la distracción ósea son desconocidos y algunos de los estudios consultados describen ciertos efectos secundarios que deben estudiarse con más profundidad, como extrusión de molares, pérdida de anclaje e inclinación mesial de la

corona del canino. Como justificación para esta última se han propuesto la resistencia del hueso interseptal y la existencia de interferencias óseas en la región apical de alveolo que podrían encontrarse durante el movimiento del diente.

Las diferencias en cuanto al tiempo de tratamiento entre estudios podrían ser fruto de variaciones en la técnica quirúrgica o a la diferente rigidez de los dispositivos. Aunque no se han descrito cambios pulpares, con la inclinación del diente al moverse podría darse un estrechamiento de los vasos sanguíneos a nivel del ápice que podría causar alteraciones pulpares, por lo que sería deseable un seguimiento a medio-corto plazo.

Un informe parecido fue el realizado por Hässler y col. en 1999 ⁽²³⁰⁾, comparando la retracción de los caninos justo después de la extracción de premolares comparada con la retracción en el lado contralateral donde el alveolo post-extracción había cicatrizado. Encontró un incremento significativo del MDO en el lado dónde la extracción aún estaba reciente, que podía estar causada por la condición fibrosa del hueso neoformado, y la inclinación indeseada de los caninos podría deberse una combinación entre la pobre calcificación del hueso y la técnica ortodóncica usada, aunque estas afirmaciones se basaban en suposiciones ya que el estudio no incluía registros histológicos. La osteogénesis mediante distracción ósea conlleva cuatro fases. En primer lugar se realiza una osteotomía, en la que el hueso se segmenta manteniendo intactos los tejidos encargados de la osteogénesis.

A continuación hay que observar un tiempo de latencia, es decir, un periodo de pausa entre la cirugía y la separación activa de los segmentos, que oscila en la literatura entre 5 y 21 días, aunque Constantino y col. ⁽²³¹⁾ propusieron que no debía exceder de 10 días ya que el rico aporte sanguíneo craneofacial resulta en una cicatrización ósea más rápida.

Después de esto se procede a realizar la distracción, que consiste en la separación de los segmentos mediante un dispositivo activo de distracción o expansión ósea. Ilizarov

(225) recomendó una activación diaria de 1 mm al día, ya que tasas más elevadas podrían evitar la unión y tasas más bajas producirían unión prematura. Finalmente se pasa a la fase de consolidación; el periodo de tiempo que transcurre entre la inactivación del distractor y la maduración completa del hueso neoformado.

Lee, en 2008 (212) comparó corticotomía y osteotomía usando un resorte de Níquel-Titanio de 100g encontrando la osteotomía como más rápida pero sin diferencias estadísticamente significativas. Mediante micro tomografías seriadas constató que ambos procedimientos estaban basados en fenómenos tan diferentes como el RAP y la distracción.

Estos resultados fueron confirmados por Wang en 2009 (213) mediante un experimento similar: la reabsorción ósea inducida por la corticotomía alrededor de las raíces dentales bajo tensión era reemplazada por tejido fibroso tras 21 días y por hueso tras 60 días, mientras que en el caso de la osteotomía se llevaba a cabo una osteogénesis post-distracción sin conllevar una etapa de reabsorción ósea regional.

Son muchos los factores que contribuyen a la estabilidad del tratamiento ortodóncico. Se ha estudiado la influencia de condiciones tan variadas como el diseño del retenedor hasta el efecto neuromuscular sobre la oclusión. La capacidad de adaptación de los tejidos periodontales a la nueva situación es un factor principal en la estabilidad post ortodóncica, y el fenómeno de aceleración regional potencia la reorganización tisular, pero lo cierto es que la estabilidad del tratamiento a largo plazo es aún desconocida.

1.5.2.3. Láser de baja frecuencia

Una aplicación de láser por debajo de 500 mW se considera Terapia con Láser de Baja Frecuencia (Low-Level Laser Therapy, LLLT) y sus beneficios sobre el recambio óseo, la vascularización y el alivio del dolor han sido estudiados mediante experimentación animal siguiendo patrones comunes: aplicación de una onda continua a 860 nm de láser de

Galio, Aluminio y Arsénico (GaAlAs) combinado con la fuerza ortodóncica generada por un muelle cerrado de Niquel-Titanio. Los resultados, sin embargo, son confusos.

Yoshida ⁽²³²⁾ y Yamaguchi ⁽²³³⁾ en 2009 y 2010, con experimentos muy similares en ratas Wistar, encontrando un incremento en el MDO del 46 % y el 32% respectivamente, mientras De Silva Sousa, ⁽²³⁴⁾ realizó retracción bilateral de caninos en humanos un 93% más rápido usando LLLT en comparación con los controles. En 2000, Kawasaki & Shimizu ⁽²³⁵⁾ realizaron uno de los primeros experimentos en este campo usando un muelle cerrado de acero inoxidable que ejercía una fuerza de 10 g en 48 ratas Wistar, e informaron de un aumento en el MDO de 1,3 veces en comparación con el grupo no irradiado.

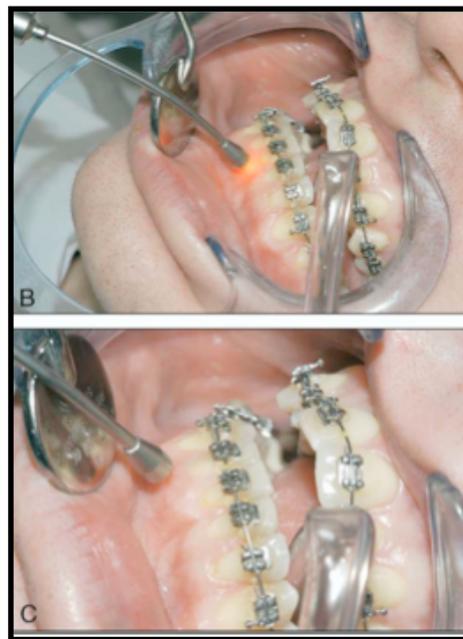


Figura 8. Protocolo para irradiación con LLLT (B) y placebo (C). ⁽²³⁶⁾

Posteriormente, Kim ⁽²³⁷⁾ y Abi-Ramia y col. en 2010 ⁽²³⁸⁾ llevaron a cabo estudios parecidos, (aunque los rangos de fuerza eran ligeramente distintos (18 y 34,86 J/cm² respectivamente) se usaron las mismas fuentes de láser y aparatos ortodóncicos similares) y ninguno de los dos pudo encontrar diferencias significativas. Ambos autores referenciaron el potencial del láser de baja intensidad para fomentar la formación ósea, la

síntesis de colágeno tipo I y fibronectina, facilitando la reorganización del tejido conjuntivo durante el MDO y la vascularización, que podría ser un modo de disminuir el daño pulpar.

Limpanichkul y col. (239) reprodujeron en 2006 el mismo experimento en un ensayo clínico aleatorizado a doble ciego en 12 pacientes sin obtener diferencias relevantes en cuanto a MDO, que podrían deberse a la baja intensidad de las fuerzas aplicadas (25J/cm² con respecto a los 54 J/cm² del informe de Kawasaki y col. en 2000). (235)

Kim y col. en 2009 (240) combinaron LLLT con corticotomía obteniendo que a pesar de que por separado ambas técnicas consiguen un aumento en el número de osteoblastos y de tejido mineralizado, la combinación de ambos disminuye la tasa neta de MDO en una proporción alta. Fujiyama y col. en 2008 realizó un ensayo clínico aleatorizado a simple ciego en 90 pacientes usando terapia con láser de CO₂ sin encontrar cambios en el MDO aunque sí un claro efecto analgésico. (241)

Sin embargo, Seifi encontró en 2007 una disminución del MDO en un 40,6% y en 50, 6% respectivamente usando láser continuo e intermitente en conejos. (183) El láser de CO₂ fue usado por Fujiyama en 2008 (241) en un ensayo clínico randomizado en 90 pacientes, sin encontrar diferencias en el MDO pero sí un claro efecto sobre el control del dolor. Finalmente, Gama en 2010 (242) utilizó fototerapia con láser infrarojo (790 nm, 40mW) en roedores, sin encontrar aumentos significativos en el MDO.

Los estudios de Kawasaki, (235) Yoshida (232), Yamaguchi (233) y De Silva Sousa (234) muestran diferentes niveles de aumento de MDO utilizando un diodo de Galio, Aluminio y Arsénico (Ga-Al-As) de 808 nm y 100W. Los cuatro estudios son similares, aunque sólo uno de ellos se realizó en humanos.

Youseff et al en 2008 ⁽²⁴³⁾ realizaron un experimento en 15 pacientes de entre 14 y 23 años, aplicando láser de GaALAs 809 nm, 100 mw en la hemiarcada derecha superior e inferior al primer, tercer, séptimo y catorceavo día durante la retracción de caninos. Encontraron MDO 3.6 veces mayor en el lado experimental comparado con los controles. También encontraron significativamente menor dolor para el paciente en el lado irradiado, aunque debe tenerse en consideración que en este estudio el nivel de dolor se determinaba por los mismos pacientes puntuándolo en una escala.

Aunque ligeramente diferentes, las técnicas usadas por Markezan, ⁽²⁴⁴⁾ Abi-Ramia ⁽²³⁸⁾ y Kim ⁽²³⁷⁾ en 2010 pueden compararse, usando la misma intensidad que los artículos mencionados anteriormente (808 nm/100 w) y tanto la fuerza ortodóncica como la aparatología es similar, aunque ninguno de ellos pudo encontrar diferencias en el MDO. Sin embargo, todos ellos defienden el potencial osteogénico del LLLT, así como sobre el colágeno tipo I, la síntesis de fibronectina y la vascularización. Duan et al, en 2012, ⁽²⁴⁵⁾ encontró un incremento del 30% en el MDO utilizando onda continua e intermitente de 2, 4 y 8 Hz en ratas Wistar, sin diferencias relevantes entre grupos. Finalmente, Genc et al, ⁽²⁴⁶⁾ en 2013, encontraron 42% más MDO con LLLT comparado con los controles en un estudio realizado en humanos durante la retracción de caninos.

1.5.2.4. Campos Magnéticos

Los estudios a propósito del uso de fuerzas magnéticas se publicaron en su mayor parte en los años 90, y su relación con la aceleración del movimiento dentario se centra más en el daño que puede infligirse en los tejidos que en los efectos netos sobre el movimiento dental. Rechazan la teoría de que ciertas aleaciones con los llamados elementos de “tierras raras” en contacto con piel y mucosas podrían adelgazar el epitelio y disminuir la formación ósea ⁽²⁴⁷⁾.

Darendeliler y col. en 1995 ⁽²⁴⁸⁾ utilizaron imanes de Samario y Cobalto junto con muelles cerrados de Niquel-Titanio en 18 cerdos de guinea encontrando formación de

hueso en áreas de tensión y un aumento en la tasa de MDO del doble. Sin embargo, Linder-Aronson y col. en 1996 ⁽²⁴⁹⁾ no obtuvo resultados concluyentes en sus ensayos con monos en los que usaba el mismo tipo de imanes y los comparaba con muelles cerrados de Sentalloy, aunque no menciona los rangos de fuerza usados. Las grandes diferencias halladas entre los dos estudios pueden deberse entre otros factores al reducido tamaño muestral de este último estudio, y, según Darendeliler, los imanes podrían haber causado una reducción en la fase de “latencia” observada en ocasiones en el movimiento ortodóncico.

Con técnicas tradicionales, se necesitan sesenta horas para inducir cambios en los osteoclastos, y la presencia de un campo magnético podría haber inducido una diferenciación mucho más rápida de células madre multipotenciales en osteoclastos activos, aumentando la reabsorción ósea y por tanto el MDO. ⁽²⁵⁰⁾

El artículo de Tengku et al, en 2000 ⁽²⁵¹⁾ se basa en éstas premisas, aunque no se encontraron diferencias relevantes con respecto al MDO utilizando un campo magnético estático, sin embargo, la exposición a los imanes aumentó la reabsorción radicular y provocó el ensanchamiento del PDL.

Tanto Darendeliler ⁽²⁴⁸⁾ como Linder-Aronson ⁽²⁴⁹⁾ descartaron posibles efectos secundarios en los tejidos provocados por los campos magnéticos, aunque en el primero de los dos artículos se encontró doble tasa de MDO mientras en el segundo, con un tamaño muestral muy reducido, no se encontraron diferencias relevantes. De acuerdo con Darendeliler, los imanes podrían causar una reducción en la fase de latencia del MDO.

1.5.2.5. Terapia Génica

Uno de los problemas más importantes que surgen en cuanto a la aplicación local de agentes químicos como aceleradores del movimiento ortodóncico es que, debido al gran aporte sanguíneo que conlleva la inflamación generada por fuerzas ortodóncicas, se

requiere en la mayoría de los casos la inyección o aplicación del fármaco de forma diaria, lo que constituye una traba para la aplicación clínica real de numerosos ensayos realizados con administración de agentes naturales o sintéticos inductores de movimiento dentario durante la terapia ortodóncica.

En 2004, Kanzaki y col. ⁽²⁵²⁾ observaron que cada tres días se realizaba una transferencia genética de osteoprotegerina a los tejidos periodontales que inhibía la osteoclastogénesis mediada por RANKL, disminuyendo así la aceleración inicial del MDO inducida experimentalmente. A la luz de estos resultados, en 2006 ⁽²⁵³⁾ este grupo de investigación propuso la transfección local de RANKL en los tejidos periodontales como factor acelerador del movimiento dentario por la ruptura en el equilibrio observado respecto a la osteoprotegerina.

Esto conservaba la capacidad de aceleración del movimiento ortodóncico de forma mantenida evitando las anteriores desventajas. El proceso por el cual se produjo la transfección génica fue el siguiente: se utilizó una envuelta viral inactiva del Virus Hemaglutinante de Japón (HVJ) que contenía un plásmido con la información para la expresión génica de RANKL, y se inyectó el preparado periódicamente de forma intragingival alrededor de los dientes sometidos a fuerza ortodóncica.

Kanzaki y col. ⁽²⁵²⁾ describieron un aumento significativo del MDO tras la transferencia local de RANKL, aumentando la osteoclastogénesis sin efectos sistémicos indeseados, y sugiriendo el uso de esta técnica no sólo para disminuir el tiempo de tratamiento sino para mover por ejemplo dientes anquilosados que pudieran estar fusionados al hueso circundante.

Ya en 2010, Iglesias-Linares y col. ⁽²⁵⁴⁾ establecieron una comparativa entre la terapia génica y la corticotomía como métodos de aceleración del movimiento ortodóncico, con un experimento en roedores que apoyaba la propuesta de Kanzaki sobre la capacidad

osteoclastogénica de la transfección génica de RANKL. Como resultados, se observaron unas tasas de movimiento dentario del 10,58%, 25% y 43,3% superior al grupo control en los días 2, 10 y 32 de observación utilizando transfección génica y de un 21,13%, 23,7% y 16,37% cuando se realizaban corticotomías. Concluyeron por tanto que, aunque ambos métodos aceleraban el MDO, la transfección génica de RANKL era un 26,93% más efectiva que la corticotomía como método de aceleración del movimiento dentario

La aplicación de la terapia génica sobre el movimiento dentario ortodóncico no sólo puede realizarse de forma directa, como la que hemos visto anteriormente, sino también de forma indirecta, localizando y reparando aquellas mutaciones que afecten a genes asociados al movimiento ortodóncico, restaurando la función normal o la síntesis de proteínas de la matriz extracelular. (16)

La ortodoncia se acerca a un cambio en la forma de enfocar nuestros tratamientos, el uso de células madre para controlar de forma específica la remodelación de tejidos la utilización de ingeniería genética para reparar mutaciones o intervenir de forma específica a nivel celular son terapias que comienzan su incorporación en el ámbito biomédico, y que, no obstante, aún requieren una extensa fase de investigación, ya que se enfrentan a obstáculos como la variación interpersonal de todas las respuestas biológicas, dependientes del genoma y de los patrones de expresión proteica.

2. HIPÓTESIS

Los defensores de la corticotomía alveolar como coadyuvante del tratamiento ortodóncico argumentan que la aceleración del movimiento ortodóncico obtenida con esta técnica quirúrgica, se produce a expensas de una disminución en la resistencia física que opone el entramado alveolar al movimiento de la unidad dental, que ocurre de forma concomitante con el denominado fenómeno de aceleración regional (RAP). Este último ha sido explicado como un proceso inflamatorio inducido por una agresión quirúrgica inespecífica a los tejidos, que desencadena un aumento de mediadores de la inflamación y otras moléculas resultando en una reabsorción ósea aumentada. A pesar de estas propuestas, la realidad científica es que las verdaderas bases celulares que centran el fenómeno de aceleración ortodóncica secundaria a la corticotomía alveolar permanecen aún sin esclarecer.

Paralelamente, se ha descrito en la literatura reciente ⁽²⁵⁵⁾, evidencia de la activación selectiva de progenitores celulares de modo secundario a una agresión quirúrgica en procesos de distracción ósea. Del mismo modo, la activación, supervivencia y diferenciación de las células osteoclasticas, se ha descrito íntimamente ligada a procesos de regulación por parte de la colonia de células madre mesenquimales. ⁽²⁵⁶⁾

El planteamiento conjunto de estos conceptos, suscita varias preguntas: ¿podría extrapolarse esta afirmación a la corticotomía?, ¿es posible que el procedimiento quirúrgico que se practica induzca una liberación de estímulos selectivos para la colonia de células madre en la región del hueso alveolar, modulando la quiescencia celular de esta colonia? Partiendo de esta base, ¿se vería modulada positivamente la diferenciación de los precursores osteoclasticos con repercusión clínica sobre el movimiento dentario ortodóncico?.

“Si la base molecular subyacente al MDO acelerado mediante corticotomía es diferente de la del MDO no acelerado, los perfiles génicos de ambos también diferirán en cantidad y/o tipos de genes implicados, y habría por tanto diferencias en sus patrones de expresión génica. Conocer la secuencia exacta de genes implicada en estos procesos así como la cantidad de proteínas que median ambos, nos ayudaría a identificar la respuesta celular y molecular que se desencadena tras la aplicación de una fuerza externa con motivos ortodóncicos, un tema que ha sido objeto de larga polémica.”

Además, si existe una conexión real entre la activación de células madre mesenquimales responsables del aumento de la osteoclastogénesis tras la inflamación causada por la agresión quirúrgica a los tejidos, y somos capaces de comprobarlo aclarando el patrón genético implicado, sería posible en un futuro próximo utilizar células madre como una técnica segura y muy específica diseñada con el fin de acelerar el MDO individualmente, evitando la agresividad, riesgos y efectos secundarios de este tipo de cirugías.

3. OBJETIVOS

En línea con este planteamiento, se enmarcan con el proceso experimental los objetivos siguientes:

3.1. Objetivos Generales

- Dar sustento bibliográfico actual a la secuencia biológica molecular implicada en el movimiento dentario ortodóncico.
- Repasar los métodos biológicos descritos en la literatura para acelerar el movimiento ortodóncico, así como los factores que puedan retrasar el tratamiento.
- Realizar un análisis crítico de la efectividad de los métodos expuestos, así como de la calidad del ensayo clínico o del experimento en modelo animal sobre el que se ha testado.
- Establecer las ventajas e inconvenientes de los métodos biológicos de modificación del MDO así como su viabilidad para la práctica clínica.
- Recopilar y analizar los datos encontrados en la literatura a propósito de este tema, realizando un resumen sobre el conocimiento existente acerca de los métodos de modificación biológica del movimiento ortodóncico
- Describir las bases celulares del movimiento dentario ortodóncico; cómo responde la unidad celular ante la aplicación de fuerza mecánica externa y qué reacciones se dan a nivel tisular.
- Profundizar en las bases biológicas osteoclásticas y del metabolismo óseo.
- Aclarar el perfil genético y por lo tanto el patrón de expresión génica implicado en el MDO, abriendo la puerta a nuevas líneas de investigación en éste campo.

3.2. Objetivos Específicos

- Validación de un nuevo modelo experimental ortodóncico de aplicación animal, de fácil reproducción con el fin de simplificar las comparaciones en futuras investigaciones similares.
- Utilización de una nueva técnica de gran utilidad, el análisis por microarray, al campo del MDO, con el fin de aclarar las bases biológicas subyacentes al mismo.
- Determinación de la validez clínica de la corticotomía alveolar como método de aceleración ortodóncica.
- Comparación estadística, histológica y clínica de las modulaciones del movimiento ortodóncico clásico y acelerado.
- Estudio de la expresión genética a lo largo del MDO.
- Comparación de los perfiles genéticos del movimiento ortodóncico clásico y acelerado.
- Comprobar a nivel molecular la base biológica de los métodos de aceleración, con el objetivo de orientar nuestros esfuerzos a crear una nueva técnica de modificación del MDO sin los riesgos inherentes a la cirugía.
- Conectar las reacciones tisulares que se producen tras la aplicación de de fuerza ortodóncica con la respuesta de las células madre óseas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Búsqueda bibliográfica:

4.1.1 Protocolo de búsqueda

Para realizar la presente revisión sistemática se siguió un protocolo de búsqueda no registrado con anterioridad al inicio de la misma. Se siguieron las líneas PRISMA establecidas por Liberati et al en 2009. (257)

4.1.2. Fuentes de información

La revisión bibliográfica sistemática se completó mediante la búsqueda en la base de datos MedLine (Entrez PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov), incluyendo publicaciones sin límite anterior de tiempo y actualizada hasta el 7 de Febrero de 2014. Con el fin de detectar literatura no publicada por los canales convencionales que pudiera ser relevante para nuestra búsqueda, se utilizó la base de datos OpenGrey de la Asociación Europea para la Explotación de "Literatura Gris" ó EAGLE (European Association for Grey Literature Explotation), también actualizada hasta el 7 de Febrero de 2014.

Las bases de datos SCOPUS, Embase, Ebscohost y SCIRUS también se exploraron con el objetivo de encontrar artículos que coincidieran con nuestros criterios de selección, sin límite de tiempo anterior y hasta el 7 de Febrero de 2014. Además, las principales revistas de Ortodoncia indexadas en el JCR (*Journal Citation Report*) se revisaron a mano para identificar estudios potenciales no incluidos en los criterios de selección designados para esta búsqueda.

4.1.3. Estrategia de búsqueda

Con el fin de que la búsqueda fuera lo más exhaustiva y exacta posible, se utilizaron los términos descriptores o términos MeSH (Medical Subject Heading) "tooth movement"

AND “time factors” en búsqueda cruzada con los siguientes términos: “gene therapy”, “drug”, “piezocision”, “corticotomy”, “electromagnetic fields”, “low-level laser therapy” AND “bioelectric energy sources”. La búsqueda se realizó de acuerdo con las líneas establecidas por el “National Health Service Centre for Reviews and Dissemination” (258), y se actualizó hasta el 7 de Febrero de 2014.

4.1.4. Criterios de selección

Los artículos elegibles para el presente estudio debían cumplir los siguientes criterios de selección, estructurados según el formato PICO:

Población: Animal; cualquier estudio experimental en animales, investigaciones clínicas o *in vitro* que incluyan al menos un grupo experimental y uno control, y que contemplen un mínimo de 5 animales o muestras por grupo experimental.

Intervención: métodos de base biológica que aumenten o disminuyan el movimiento dentario con aplicación de fuerza mediante un aparato ortodóncico ú ortopédico.

Comparación: grupo control que no incluya métodos para acelerar biológicamente el MDO y/o sin movimiento dentario ortodóncico.

Objetivo medido: tasa de movimiento dentario ortodóncico.

Se excluyeron series de casos, informes a propósito de un caso, estudios descriptivos, artículos de revisión, artículos de opinión, cartas y todos aquellos que no se ajustaran al objetivo de esta revisión ó no incluyeran descripción adecuada de la dirección y magnitud de la fuerza ó descripción correcta de los métodos biológicos de aceleración o inhibición, ya sean técnicas, posología o equivalente.

4.1.5. Selección de los artículos

La selección de los artículos fue llevada a cabo mediante dos observadores (M.C.LL.y A.I.L.) independientes uno del otro. Inicialmente los artículos se seleccionaron en base al título y al abstract, siendo revisado posteriormente el artículo completo en caso de que existiera

duda acerca de su inclusión o exclusión, recurriendo a un tercer observador experimentado (E.S.R) en caso de desacuerdo.

4.1.6. Recolección de los datos.

El primer observador (M.C.L.L) extrajo los datos, elaborando una hoja de trabajo para los mismos sobre la que se revisaba todo. Se contactó directamente con los autores en casos en los que los datos no estaban claros o faltaba información.

Los datos extraídos finalmente a partir de los artículos científicos fueron: autor y año, diseño del estudio, muestra (tamaño, animal o humana, sexo y edad) métodos empleados en los ensayos, características de la fuerza aplicada, tiempo total de experimentación o tratamiento, cambio en la tasa de movimiento ortodóncico con respecto al grupo control, tasa de éxito descrita, efectos secundarios observados, aplicación clínica y citas recibidas.

4.1.7. Determinación del riesgo de sesgo en artículos individuales.

Dos investigadores determinaron de forma independiente la calidad de los estudios incluidos de acuerdo con una modificación de la escala Newcastle-Ottawa. Adaptando el modelo de Chen et al (259), las variables analizadas fueron: diseño del estudio (Ensayos clínicos randomizados, 3 puntos; estudios prospectivos, 1 punto; estudio retrospectivo, 0 puntos), representatividad de la muestra de más de 25 sujetos/especímenes por grupo, análisis estadístico adecuado, evidencia de medidas de ciego, informe de los casos perdidos, estimación previa del tamaño muestral. Basándonos en un sistema de puntos descrito en el artículo de Chen, (259), el riesgo de sesgo y la calidad se puntuaban como bajo, medio y alto. (bajo (>4 puntos) moderado (2-3'5 puntos) alto (< 2 puntos) Se otorgaba un punto por cada criterio cumplido, medio punto si el criterio sólo se cumplía en parte. Estudios con menos de 2 puntos se consideraban como alto riesgo de sesgo, de 2 a 4 puntos riesgo moderado y 4 puntos ó mas, riesgo bajo.

4.1.8. Análisis de los datos

Una vez que se recopiló y analizó la información, aquellos estudios con mayor calidad se analizaron una segunda vez para detectar sesgos de publicación, heterogeneidad en la síntesis de datos y con el objetivo futuro de realizar un meta análisis si fuera apropiado. Se estableció también el índice kappa de concordancia interobservador (0,92)

4.2. Diseño del estudio experimental

4.2.1. Diseño experimental *in vivo*.

Toda actuación sobre animales fue aprobada previamente por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Sevilla, de acuerdo con lo establecido sobre "Protección de los animales destinados a experimentación y otros fines científicos" en el Real Decreto 223/1988, de 14 de marzo (BOE de 18 de marzo) y ratificación posterior mediante Orden Ministerial de 13 de octubre de 1.999 (BOE de 18 de octubre).

4.2.1.1. Distribución muestral

El modelo animal utilizado fue de rata Wistar, realizándose en primer lugar un ensayo piloto con cinco animales y posteriormente un ensayo con veintiocho especímenes para los procedimientos de análisis de expresión génica a nivel del hueso alveolar peridentario. Para dicho análisis se siguió un diseño experimental a boca partida empleándose un total de 56 hemimaxilas que fueron tomadas como unidad experimental para realizar el análisis de expresión génica. Se realizó una monitorización constante de los animales estableciendo un análisis de expresión génica en cuatro puntos temporales estratégicos (T1: 24 horas, T2: 3 días, T3: 7 días y T4 12 días) determinados en ensayos previos. El análisis de datos clínicos de movimiento dentario con y sin cirugía de

corticotomía en los días establecidos (T1-T4) se tomó a partir de las mediciones de 48 hemimaxilas a partir de un número total de 32 animales siguiendo idéntica distribución en grupo sometido a corticotomía y controles. (Fig. 9)

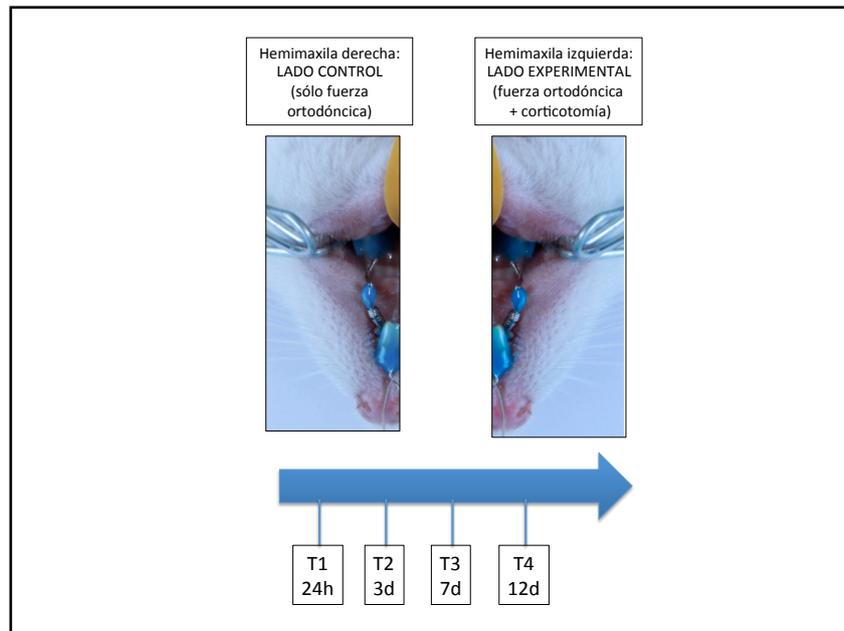


Figura 9. Diseño experimental *In vivo*.

Todos los especímenes se mantuvieron estabulados en grupos de cuatro, a una temperatura estable de 23° C y un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas, con alimentación y agua disponibles *ad libitum*. Se realizó vigilancia diaria para detectar posibles cambios en el peso de los ejemplares y garantizar su correcta alimentación.

Previo a cualquier procedimiento o manipulación, se anestesió a los animales mediante inyecciones intraperitoneales de ketamina (45 mg/kg), así como inyecciones subcutáneas de 5-10 mg/kg de diazepam y 0.04-0.10 mg/kg de atropina. Tras las intervenciones se les proporcionó terapia antibiótica y analgésica durante 3 días mediante inyección subcutánea de 0.05 mg/kg de buprenorfina y tetraciclina.

4.2.1.2. Selección, diseño e instalación de la aparatología.

La aparatología seleccionada para ejercer la fuerza ortodóncica fue una adaptación del modelo propuesto por Ren et al en 2004 ⁽¹⁹³⁾. Se ferulizaron el primer, segundo y tercer molar con una ligadura de acero inoxidable de 0,2 mm de diámetro (Dentaurum) para la preservación del anclaje ferulizado como una única unidad y se insertó un muelle cerrado de Sentalloy de 0,22 mm de diámetro, (GAC, Dentsply Int.) aplicando una fuerza constante de 25 g por hemimaxila y por tanto una fuerza inferior a 10 g por unidad dentaria sometida a movimiento dentario.

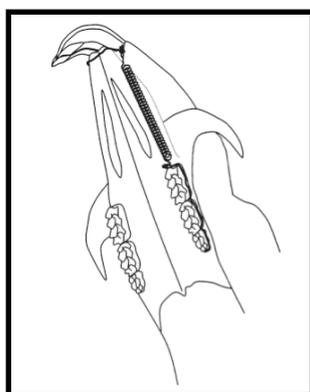


Figura 10. Esquema del modelo
propuesto por Ren. ⁽²⁶⁰⁾

Los dientes, tanto los molares como los incisivos, se acondicionaron previamente con ácido ortofosfórico al 37% (DGM, Hamburg, Germany) durante 10 segundos, tras los cuales se eliminaron cuidadosamente los restos de ácido utilizando torundas de algodón y lavando las superficies con agua abundante dispensada con una jeringa a presión. La cama quirúrgica en la que se realizaron las intervenciones se mantuvo ligeramente inclinada durante este proceso para evitar que el agua pudiera bloquear las vías aéreas de los animales durante el lavado de las superficies así como durante la manipulación con el sangrado habitual de la intervención. Se procedió a continuación al secado de las piezas dentales mediante aire y se aplicó adhesivo fotocurable (3M ESPE). Se colocaron posteriormente las ligaduras con la ayuda de pinzas mosquito y alicates de ortodoncia y se

colocó resina de restauración compuesta de tonalidad azul y fotocurable (3M ESPE) alrededor de las ligaduras y sobre las superficies oclusales de los dientes, así como sobre cualquier superficie cortante de las ligaduras o el muelle, para evitar que la aparatología se desprendiera por efecto de la masticación o se produjeran irritación por roce repetido en los tejidos blandos.

Una vez instaladas de forma segura alrededor de los molares, las ligaduras se introdujeron en un extremo del dispositivo de tracción, y en el otro extremo se insertó otra ligadura que rodeaba los incisivos, quedando el muelle en tensión derivando una fuerza constante e igual en todos los animales de magnitud inferior a 10g por unidad dentaria.

4.2.1.3. Procedimiento quirúrgico: Corticotomía

El procedimiento quirúrgico de corticotomía alveolar fue realizado por un sólo operador siguiendo las líneas propuestas por Sanjideh (216). Se practicó una incisión oblicua con bisturí (hoja nº15, GmbH, Solingen, Germany) mesial al primer molar, continuando a lo largo del borde gingival palatino hasta el tercer molar para facilitar el levantamiento de colgajo y el desbridamiento mucoperióstico del mismo.

Se separó el tejido blando consiguiendo un colgajo de espesor total y se mantuvo el mismo alejado del área quirúrgica mediante pinzas quirúrgicas para evitar dañarlo durante la intervención. Se realizaron decorticaciones verticales en mesial y distal del primer molar, bajo irrigación salina abundante y a baja revolución, junto con perforaciones directas en la tabla cortical utilizando una fresa de micromotor de carburo de tungsteno (H141 010 Komet, GmbH, Lemgo, Germany). Se realizó posteriormente la reposición del colgajo y la sutura del mismo de empleando hilo sintético reabsorbible monofilamento (Caprosyn® 6-0, 30 inches) y mediante nudo doble. Debido a la atropina, las secreciones salivares eran mínimas, y el sangrado de la herida se controló aplicando presión sobre la herida hasta conseguir una adecuada hemostasia. Todos los animales contaron con la hemimaxila

contralateral como control interno no sometida a cirugía de corticotomía alveolar y exclusivamente sometida a idéntica fuerza ortodóncica a la administrada en la hemimaxila intervenida.



Figura 11. Separación del colgajo

4.2.2. Registros clínicos de movimiento dental.

Para obtener las mediciones de movimiento dentario se utilizó un mini-calibre de alta precisión y lentes de aumento. Se realizó un seguimiento temporal de los animales en el que se midió la distancia entre la cara mesial del primer molar y el grupo incisivo, obteniendo el movimiento total de la media de los dobles valores tomados por un único operador tanto en el grupo experimental como en ambos grupos controles. Los valores se ajustaron en todos los grupos mediante la contabilización de pérdida de anclaje anterior producida por volcamiento de los incisivos hacia el espacio intermaxilar. Esto se normalizó a través de la comparación con un grupo de especímenes no sometidos a ningún tipo de intervención ortodóncica ni quirúrgica. La fiabilidad del método de medición se realizó mediante la comparativa de las medidas dobles realizadas por el operador calculando el error intraobservador.

4.2.3. Sacrificio de los especímenes y toma de muestras de tejido óseo.

Siguiendo la monitorización descrita de los animales y cumpliendo con la secuencia temporal marcada se realizó el sacrificio de los especímenes en T1: 24 horas, T2: 3 días, T3: 7 días y T4: 12 días, mediante inhalación con monóxido de carbono y extirpación inmediata de la región ósea requerida a nivel alveolar mediante fractura ósea por tracción. Los fragmentos óseos fueron cuidadosamente diseccionados separándolos del tejido dentario del mismo modo mediante fractura y delimitados a la región implicada en la cirugía y el movimiento dentario ortodóncico. El hueso alveolar maxilar de cada hemimaxila en la que se había realizado tracción ortodóncica con o sin cirugía de corticotomía fue extraído tras sacrificar a los animales siguiendo protocolo descrito. Se extrajo el maxilar superior completo, eliminando todo el tejido blando y los dientes con la ayuda de un escalpelo, ultracongelando las muestras de hueso alveolar inmediatamente mediante inmersión en nitrógeno líquido a -125°C y almacenándolas posteriormente a -80°C hasta el procesado de la muestra para realizar la de extracción y aislamiento de ARN.

4.3. Procesamiento y análisis muestral.

4.3.1. Extracción de ARN del tejido óseo

Las muestras se transportaron al laboratorio en cajas refrigeradas herméticamente selladas, en el interior de tubos de 2.0 ml libres de ADN previamente esterilizados (Eppendorf) con preservación de las condiciones de fría mediante hielo seco evitando el daño sobre la integridad del ARN de las muestras.

El aislamiento y extracción del ARN de células óseas fue realizado en el Centro de Genómica e Investigación Oncológica. Brevemente, se realizó extracción manual con

Trizol (Life Technologies, New York, NY, USA) con homogeización de las muestras mediante fricción. Se realizó la extracción de ARN empleando el minikit QIAamp RNA miRNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA). Se realizó posteriormente cuantificación y control de calidad del ARN obtenido, mediante espectrofotometría (Nanodrop, Fisher) para determinar la absorbancia y fluorimetría (Qubit). Después de la digestión mediante ADNasa y procedimientos de barrido, se midieron las concentraciones del ARN, siendo el mismo alicuotado y preservado a -80°C para el análisis posterior.

El protocolo empleado para la extracción de ARN (minikit QIAamp RNA miRNeasy (Qiagen, Valencia, CA, USA)) se escogió porque permite la purificación del ARN total en un rango a partir de aproximadamente 18 nucleótidos, de todos los tipos tisulares y celulares animales, incluyendo tejidos difíciles de lisar como ocurre con el hueso. Esta purificación permite establecer una comparación directa de los niveles de expresión del mRNA con los de los genes de referencia de interés. También es capaz de ofrecer visibilidad de la presencia de cantidades de ARNs en pequeñas cantidades y purificando con eficiencia el ARN tisular y celular incluso cuando la muestra es reducida, eliminando la posibilidad de contaminación con sales o fenol que pudieran interferir con posteriores análisis.

Este sistema combina la lisis de las muestras con base de fenol/guanidina con la purificación del ARN total basada en membranas de sílice. Utiliza además un reactivo que consiste en una solución monofásica de fenol y tiocinato de guanidina, diseñado para facilitar la lisis de los tejidos, inhibir las ARNasas y eliminar la mayoría del ADN celular y las proteinasas procedentes de la lisis mediante extracción orgánica. Puede usarse además para múltiples análisis, como Northern blot, PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR) y especialmente análisis por array de expresión .

4.3.2. Microarray de expresión génica

La expresión génica se analizó mediante ensayo de expresión a medida tipo Taqman® (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA) que consistió en un par de primers de PCR no etiquetados y una probeta de TaqMan® con una etiqueta de tinción FAM™ ó VIC® en el extremo 5' junto con unión al surco menor (minor groove binder (MGB)) e inhibición de la fluorescencia (nonfluorescent quencher (NFQ)) en el extremo 3' en placa de 96 pocillos.

Se empleó un OpenArray® individualizado y específicamente diseñado para el presente estudio con análisis de expresión génica a nivel de 224 locus específicos, para lo cual se realizó previamente una revisión de la literatura que permitiese optimizar la inclusión y selección de genes de expresión en modelo de rata. Se incluyeron genes de expresión a nivel de células madre mesenquimales (MSCs), hematopoyéticas (HSCs) e hipoxia. En cuanto a los genes de MSCs, se eligieron aquellos implicados en la osteogénesis (*BMP's 2 y 6 ó RUNX2*) pero también en la condrogénesis (*BMP 4, SOX 5, 6 y 9*), adipogénesis (*Adipoq, Rhoa*) miogénesis (*Notch1*) y tenogénesis (*Tgfb1*). Marcadores específicos de MSC's y otros genes asociados también se añadieron, tales como *TNF, IL 1β y 6 ó MMP2*.

Los genes relacionados con las HSCs, se seleccionaron por su capacidad moduladora en cuanto a su actividad incluyendo citoquinas y factores de crecimiento (*IL 11, 12β, 25, 17*), marcadores de superficie celular (*Cd 8, 4, 86*), reguladores de la activación y diferenciación celular (*SPPI*) y factores de diferenciación de células B y T (*Nos2, Hdac 4, 5, 7, 9*). Las HSC's se incluyeron debido a su importante papel en la producción de mediadores inflamatorios, implicados directamente en la regulación del metabolismo óseo y la aplicación de fuerza externa en los tejidos.

Genes relacionados con la hipoxia tisular se incluyeron en esta lista debido a su acción sobre el comportamiento de las células madre ⁽²⁶¹⁾ ⁽²⁶²⁾, y consistieron en genes reguladores de la respuesta angiogénica (*Anxa2*, *MMP9*) el metabolismo (*Pgm2*, *Eno1*), daño y reparación del ADN (*ENOS*) y regulación de la proliferación celular (*Met*, *Mxi1*). En primer lugar se evaluó un set de tres réplicas técnicas con el fin de explorar la calidad de los datos. En los primeros análisis, los experimentos NLY27 y NMV17 se descartaron debido a la baja calidad de los datos. (Ver Figura 16, Matriz de correlación) Las otras dos réplicas técnicas se analizaron de forma independiente, y en este trabajo se incluyen resultados de los análisis NLY26v2 y NMV13v2.

4.3.2.1. Preprocesado

Para el preprocesado se siguieron los siguientes pasos:

- El valor de Ct para detectores “indeterminados” se fijó en 40.
- Para que un detector se considere con una señal sólida, el valor de Ct debe estar por debajo de 36 en al menos el 75% de las réplicas biológicas. (Criterios de detección)

4.3.2.2. Normalización y cálculo del Ct.

La normalización es un paso esencial en los experimentos con qPCR para corregir diferencias en la cantidad de ácidos nucleicos en el material inicial. Para evaluar los mejores endógenos se utilizó Genorm ⁽²⁶³⁾. Los nuevos endógenos se utilizaron para la normalización mediante cálculo del deltaCt del siguiente modo:

$$DC_{tij} = Ct_{ij} - C_{tcj}$$

En éste cálculo, C_{tij} es el valor Ct del gen “*i*” en la muestra “*j*” y C_{tcj} es el valor de Ct del control endógeno en la muestra “*j*”.

4.3.2.3. Expresión Diferencial y Cálculo del DDCT

El análisis de expresión diferencial se realizó para encontrar aquellos genes con cambios de expresión significativos entre cada grupo experimental y su control correspondiente. Para esto se utilizó análisis con modelos lineales (264). En éste contexto, la cantidad de variación (DDCt) se computó como la diferencia entre la media del valor de DCt en la muestra control. La cantidad de variación se expresó entonces como 2^{-DDCT} o valores RQ. (265).

Esto generó un conjunto de documentos con las siguientes columnas: Detector; Valor DDCT; Valor de P; Valor del análisis de expresión diferencial, Valor de P corregido para compensar el error de hacer múltiples test sobre las muestras, Columnas DCt con el valor de DCt para el detector de cada muestra, tres columnas con el estado de Ct basado en los criterios de detección en cada grupo biológico, $\log^{DDCt} -DDCT$; cantidad de variación RQ como 2^{-DDCT} y cantidad de variación en escala logarítmica ($\log_{10}RQ$).

4.3.2.4. Análisis de agregación

Para explorar los patrones de expresión a través del tiempo, realizamos un análisis de agregación utilizando el documento “Matrix2clustering.txt”. Este documento contiene las cantidades de variación en cada punto y una columna adicional indicando los criterios de detección de cada detector (que se denominó como “no_detection” en el caso de encontrar una señal de “no detección” al menos en una condición). Para el análisis de agregación sólo se consideraron aquellos detectores etiquetados como “válidos” en todas y cada una de las condiciones. El análisis de agregación se realizó utilizando el paquete “*Clustering analysis expander package*” (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>).

4.3.3. Procedimientos histológicos

Inmediatamente tras el sacrificio, se realizó la necropsia del maxilar superior de cada animal, y las muestras destinadas a examen histológico fueron procesadas siguiendo protocolo que se describe:

- Fijación: Las muestras se almacenaron en una solución acuosa de paraformaldehído al 4%. Se introdujo cada uno de ellas en solución acuosa tamponada de formaldehído al 4% para la fijación correcta del tejido durante menos de 24 horas.
- Decalcificación: las muestras se incluyeron en una solución acuosa del 45% de ácido fórmico y 20% de citrato sódico, con recambio cada 21 días.
- Inclusión: Una vez decalcificadas, las muestras se deshidrataron por medio de inmersión gradual en concentración alcohólica creciente y se realizó la extracción del alcohol con una solución de Xilano al 100% y posterior inclusión en parafina.
- Obtención de los cortes: Se realizaron cortes seriados de 7µm de espesor a partir de los bloques de parafina en microtomo rotatorio (Microtomo rotatorio. Accu-Cut SRM 200). Se fijaron en porta-objetos (HistoBond®. 1mm. Marienfeld)
- Tinción: Una vez desparafinados los cortes se procedió a la tinción rutinaria de Hematoxilina-Eosina y al posterior montaje en solución no acuosa para cobertura con un cubre-objetos antes de su visualización y análisis.
- Las valoraciones de los cortes histológicos se realizaron en microscopio óptico de luz invertido (Fotomicroscopio Olympus R201). Se tomaron registros de las muestras representativas del conjunto dentro de cada uno de los grupos experimentales en los tiempos estimados de evaluación.

4.4. Análisis estadístico y bioinformático.

Para el análisis de los datos clínicos, todas las mediciones se compilaron en formato Excel para su procesado inicial y posteriormente se importaron al programa SPSS (versión 17.0). Una vez determinada la el no cumplimiento de normalidad y homogeneidad en la muestra se realizó un análisis estadístico no paramétrico con Prueba de Kruskal-Wallis seguido de prueba de la U de Mann-Whitney dos a dos, con ajuste de Bonferroni para el análisis de los grupos de la hemimaxila izquierda y derecha. Paralelamente se realizó el Test de Wilcoxon para muestras pareadas en el análisis comparativo entre grupos.

Para la determinación de la fiabilidad y la precisión del método de medición por parte del examinador se determinó mediante el test t de Student y el cálculo de la fórmula de Dalbberg (266), respectivamente. Para todos los cálculos se consideró un valor de $p < .05$ como estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron a través del software informático SPSS para Windows versión 17.0 (Illinois, CH, USA).

Para el análisis de expression génica se normalizaron previamente las muestras a partir de la expresión de genes endógenos (263) y posteriormente se tomaron los modelos de análisis lineal (264) así como el análisis proporcional siguiendo metodología descrita (265). Asimismo para el análisis de expression por clusters se empleó el *clustering analysis expander package* (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados de la revisión bibliográfica sistemática.

La búsqueda electrónica identificó 218 títulos, como refleja el diagrama de flujo de la Figura 12. Noventa y un artículos completos se revisaron finalmente, de los cuales 74 cumplían los criterios de inclusión, 4 de ellos se añadieron como resultados de búsqueda manual y 1 tras contactar con el autor (228). 19 de los artículos incluidos fueron publicados durante esta revisión e incluidos durante las actualizaciones realizadas. (170-171, 190, 221-222, 245-246, 267-278)

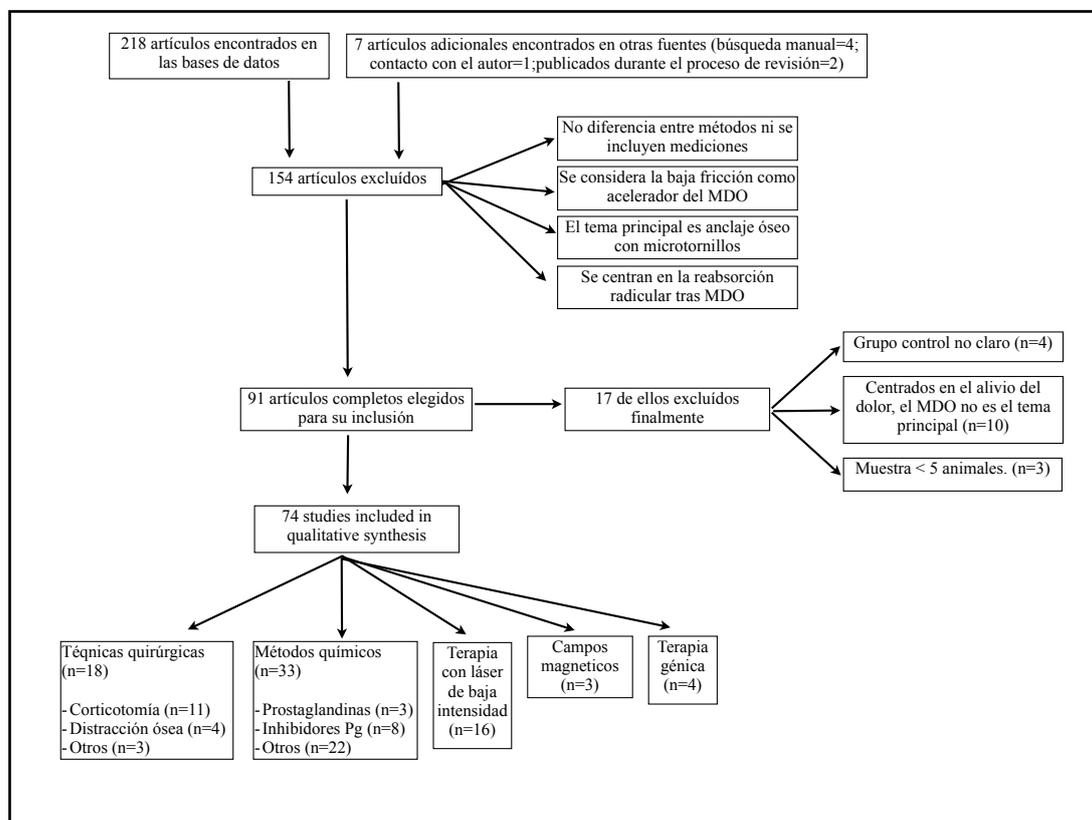


Figura 12. Diagrama de búsqueda bibliográfica.

De los 74 finalmente incluidos, 13 fueron Ensayos clínicos randomizados (175, 220-221, 228-229, 234, 239, 241, 243, 268-271) y se según el sistema de puntos seguido, 12 de los artículos se determinaron como de Calidad alta (HQ), 22 como de Calidad media (MQ):22) y el resto de calidad baja o como alto riesgo de sesgo. (Ver Fig. 13. Tabla de calidad de los artículos incluidos)

Study	Design	Sample	Error Analysis	Statistics	Blinded Assessment	Previous Power Calculation	Drops Out	Total	Risk of bias	Quality
Electromagnetic Fields										
Tengku, 2000 (40)	0	0	1	0,5	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Linder-Aronson, 1996(14)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Darendeliler, 1995(13)	0	0	0,5	0	0	0	0	0,5	HIGH	LOW
Low-Level Laser Therapy										
Kondo, 2013	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	HIGH	LOW
Genc, 2013	3	0	0,5	0,5	0	0	0	4	LOW	HIGH
Duan, 2012	0	0	1	0,5	0,5	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Doshi-Mehta, 2012	3	0	1	0,5	0,5	1	0	5	LOW	HIGH
Altan, 2012	0	0	0,5	0,5	0	0	0	1	HIGH	LOW
Sousa, 2011 (39)	3	0	0,5	1	0	0	0	4,5	LOW	HIGH
Marquezan, 2010 (66)	0	0	0,5	0,5	0	0	0	1	HIGH	LOW
Gama, 2010 (45)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Yamaguchi, 2010 (42)	0	1	0,5	1	0	0	0	2,5	MEDIUM	MEDIUM
Abi-Ramia, 2010 (18)	0	0	0	0	0	0	0	0	HIGH	LOW
Kim, 2010 (17)	0	0	0	0	0	0	0	0	HIGH	LOW
Yoshida, 2009 (41)	0	1	0,5	1	0	0	0	2,5	MEDIUM	MEDIUM
Fujiyama, 2008 (16)	3	1	0,5	0,5	0	0	0	4	LOW	HIGH
Youssef, 2008 (38)	3	1	0,5	0	0	0	0	4,5	LOW	HIGH
Seifi M, 2007 (44)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Limpanichkul, 2006 (15)	3	0	1	1	1	0	0	6	LOW	HIGH
Kawasaki, 2000 (43)	0	1	0,5	0,5	0	0	0	2	HIGH	LOW
Surgical Techniques										
Alikhani, 2013	3	0	1	1	0,5	1	0	6,5	LOW	HIGH
Kim YS, 2013	0	0	0	1	0	0	0	1	HIGH	LOW
Iglesias-Linares, 2012	0	0	1	1	0,5	0	0	2,5	MEDIUM	MEDIUM
Aboul- Ela, 2011 (37)	3	0	0,5	0,5	0	0	0	4	LOW	HIGH
Baloul, 2011 (68)	0	1	1	1	0	0	0	3	MEDIUM	MEDIUM
Teixeira, 2010 (46)	0	0	0	1	0	0	0	1	HIGH	LOW
Kharkhar, 2010 (19)	3	0	0	0	0	0	0	3	MEDIUM	MEDIUM
Sanjideh, 2010 (23)	0	0	1	1	0,5	0	0	2,5	HIGH	LOW
Wang, 2009 (24)	0	0	0	1	0	0	0	1	HIGH	LOW
Kumar, 2009 (20)	3	0	0,5	0,5	0	0	0	4	LOW	HIGH
Mostafa, 2009 (25)	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	HIGH	LOW
Kim, 2009 (28)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Lee, 2008 (26)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Fischer, 2007 (27)	0	0	0	0,5	0,5	0	0	1	HIGH	LOW
Iino, 2007 (69)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Işeri, 2005(21)	0	0	0,5	0	0	0	0	0,5	HIGH	LOW
Liou, 2000 (22)	0	0	0	0	0	0	0	0	HIGH	LOW
Häsler, 1997 (47)	0	0	1	0	0	0	0	1	HIGH	LOW
Chemical Methods										
Toro, 2013	0	0	0	1	0	1	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Li, 2013	0	1	0	0,5	0,5	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Kalpatar 2013	0	0	0,5	0,5	0,5	0	0	2,5	MEDIUM	MEDIUM
Yabumoto, 2013	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	HIGH	LOW
Sirisontoon, 2012	0	0	0,5	1	0,5	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Megorray, 2012	3	0	0,5	0,5	0,5	0	0	4,5	LOW	HIGH
Yoshimatsu, 2012	0	0	0	0,5	0,5	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Hao, 2011	0	1	0	1	0,5	0	0	1,5	HIGH	LOW
Karadeniz, 2011	3	0	0,5	0,5	0	0	0	4	LOW	HIGH
Chen, 2011	3	0	0	0,5	0	0	1	3,5	MEDIUM	MEDIUM
Brooks, 2011 (61)	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	HIGH	LOW
Davila, 2011 (62)	0	1	1	1	0	0	0	4	LOW	HIGH
Meh, 2011 (63)	0	0	1	0,5	0,5	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Salazar, 2011(60)	0	0	0	0,5	0	0	0	0,5	HIGH	LOW
Sodagar, 2011	0	1	0,5	0	0,5	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Gonzales, 2011 (49)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Akhoundi, 2010 (59)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Choi, 2010 (48)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Han, 2010 (58)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Arantes, 2009 (8)	3	0	0,5	1	1	0	0	3,5	MEDIUM	MEDIUM
Hauber Gameiro, 2008 (53)	0	0	1	1	0,5	0	0	2,5	MEDIUM	MEDIUM
De Carlos, 2007(52)	0	0	0	1	0	0	0	1	HIGH	LOW
Sprogar, 2007 (55)	0	0	1	1	0	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Arias, 2006 (9)	0	0	1	1	1	0	0	3	MEDIUM	MEDIUM
De Carlos, 2006 (51)	0	0	1	1	1	0	0	3	MEDIUM	MEDIUM
Gurton, 2004 (10)	0	1	1	1	0	0	0	3	MEDIUM	MEDIUM
Seifi, 2003(6)	0	0	1	1	0	0	0	2	MEDIUM	MEDIUM
Nilforoushan, 2002 (57)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Soma, 2000 (11)	0	0	1	1	0,5	0	0	2,5	HIGH	LOW
Karsten, 1997 (56)	0	0	1	0	0	0	0	1	HIGH	LOW
Hellsing, 1991(50)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Sandy, 1984 (12)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Gene Therapy										
Zhao, 2012 (64)	0	0	1	0,5	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Iglesias-Linares, 2011 (30)	0	0	1	1	0,5	0	0	2,5	MEDIUM	MEDIUM
Kanzaki, 2006 (29)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW
Kanzaki, 2004(65)	0	0	0,5	1	0	0	0	1,5	HIGH	LOW

Fig. 13. Tabla de calidad de los artículos incluidos

La mayor parte de la muestra se componía de estudios experimentales en animales, siendo la rata el modelo animal más frecuente (44 de 74 artículos, 29 Wistar y 15 Sprague-Dawley), seguida por el perro (6 de 74, todos ellos para testar técnicas quirúrgicas) y en siete casos, conejos, cerdos de guinea, monos y ratones. Sólo 16 artículos incluían humanos, y de ellos, únicamente 13 eran ensayos clínicos randomizados, y el resto, tanto en humanos como en animales, eran estudios comparativos cuyo tamaño muestral raramente incluía más de 25 sujetos por grupo (10 de 74 artículos).

Se encontraron medidas de ciego sólo en 21 artículos, 17 ciegos simples y 4 dobles ciegos. (Figura 13) De los 74 estudios, 10 se denominaron como bajo riesgo de sesgo, 22 con riesgo moderado y el resto con riesgo alto de sesgo.

Se identificaron 4 métodos principales de modificación biológica del movimiento dentario ortodóncico, técnicas quirúrgicas (18 artículos de 74, 11 de ellos correspondientes a corticotomía), métodos químicos (33 de 74), LLLT (16 de 74), Campos magnéticos (3 de 74) y Terapia génica (4 de 74)

5.2. Resultados clínicos de movimiento dentario ortodóncico

Se observó una adecuada precisión y fiabilidad del método de medición una vez comparadas las mediciones dobles realizadas ($p > 0.05$). Analizando el movimiento final de cada hemiarcada del conjunto de los animales que componen este grupo experimental y en relación a los objetivos de nuestro estudio, se observó un aumento del movimiento dentario de un 46,24% en la hemiarcada sometida a corticotomía y ortodoncia, comparado con la hemiarcada contralateral sometida únicamente a ortodoncia que sirvió de control interno al final del período experimental. Esto se traduce en una estimulación o aceleración del movimiento dentario en el grupo dónde se ha realizado la intervención quirúrgica (Fig14).

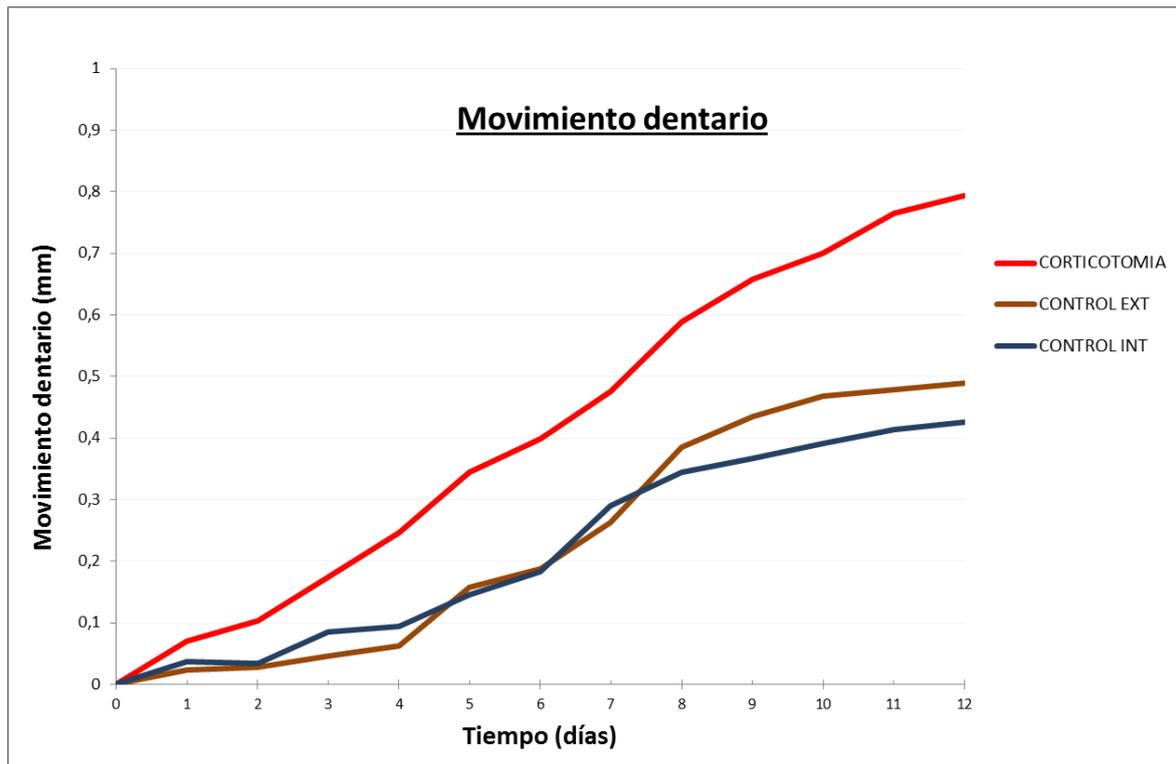


Figura 14. Cuantificación del movimiento dentario en mm.

En un análisis secuenciado pormenorizado de los resultados clínicos obtenidos los datos indican que en el primer, el tercer, el séptimo y el último día de aplicación de fuerza ortodóncica, encontramos que la hemiarcada sometida a cirugía registró una tasa de movimiento porcentual del superior siempre al 38% comparada con la hemiarcada control interno y control externo ($p < 0.001$). Todo el período experimental seleccionado reflejó un aumento estadísticamente significativo con respecto a los grupos de control tanto interno como externo a lo largo del tramo observacional seleccionado. Asimismo de modo coherente no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos controles ($p > 0.05$). (Figura 14)

5.3. Resultados del procesado *in vitro* y preparación muestral.

5.3.1. Resultados del aislamiento, cuantificación y calidad del ARN.

Los resultados en cuanto al volumen, calidad y concentración de la extracción obtenida ARN, se describen en las Tablas 1a y b. “Cuantificación del ARN”.

Se obtuvo una media de 8.18 μg ARN por muestra y una media de 6.44 y 5.70 μg en el grupo de 24 horas en los grupos control y cirugía respectivamente; 5.27 y 9.59 μg en el grupo de 3 días en control y cirugía; 12.62 y 8.32 μg en el grupo de 7 días en control y cirugía y finalmente 9.38 y 8.08 μg en el grupo de 12 días en control y cirugía. La concentración de ARN por muestra se describe en el Anexo 9.3. (Informe de calidad del ARN) Si analizamos los datos por grupo, encontramos una concentración media ARN de 275 y 210.3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para controles y cirugía en el grupo de 24 h; 244 y 336.33 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para controles y cirugía en el grupo de 3 días; 207.33 y 190.67 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para controles y cirugía en el grupo de 7 días, y 277.67 y 246 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ para controles y cirugía en el grupo de 12 días.

MUESTRA	CUANTIFICACIÓN (ng/ μl)	VOLUMEN (μl)	CANTIDAD DE ARN (μg)
1	355,63	15	5,33
2	365,23	15	5,48
3	567,00	15	8,51
4	436,17	15	6,54
5	241,63	15	3,62
6	462,00	15	6,93
7	263,83	15	3,96
8	357,33	15	5,36
9	433,00	15	6,50
10	484,67	15	7,27
11	741,17	15	11,12
12	692,50	15	10,39
13	502,20	15	7,53
14	1179,93	15	17,70
15	842,93	15	12,64
16	186,40	15	2,80
17	800,70	15	12,01
18	676,03	15	10,14
19	857,03	15	12,86
20	650,73	15	9,76
21	367,17	15	5,51
22	270,18	15	4,05
23	365,20	15	5,48
24	981,33	15	14,72

TABLA 1a. Cuantificación del ARN

TIPO DE MUESTRA	NANOGOTA				QUBIT	
	ng/μl	260/280	260/230	Volumen muestral	ng/μl	Volumen muestral
24 h / Control	977,3	2,07	1,93	1 μl	44,8	2 μl
24 h / Control	1065,7	2,09	1,81	1 μl	15	2 μl
24 h / Control	1656,8	2,08	2,04	1 μl	22,1	2 μl
24 h / Cirugía	968,5	2,08	1,73	1 μl	170	2 μl
24 h / Cirugía	526,5	2,01	1,61	1 μl	99,2	2 μl
24 h / Cirugía	1256	2,06	2	1 μl	65	2 μl
3 d / Control	551,5	2,03	1,93	1 μl	120	2 μl
3 d / Control	970	2,07	1,52	1 μl	51	2 μl
3 d / Control	1173	2,08	1,87	1 μl	63	2 μl
3 d / Cirugía	1358	2,08	2,08	1 μl	48	2 μl
3 d / Cirugía	1943,5	2,08	1,8	1 μl	140	2 μl
3 d / Cirugía	1879,5	2,09	1,63	1 μl	99	2 μl
7 d / Control	1428	2,13	1,6	1 μl	39,3	2 μl
7 d / Control	3371,8	2,1	2,04	1 μl	84	2 μl
7 d / Control	2382,8	2,01	2,04	1 μl	73	2 μl
7 d / Cirugía	199,2	2,07	1,8	1 μl	180	2 μl
7 d / Cirugía	2256,1	1,98	1,9	1 μl	73	2 μl
7 d / Cirugía	1832,1	2,09	2,08	1 μl	98	2 μl
12 d / Control	2387,1	2,07	2,01	1 μl	92	2 μl
12 d / Control	1808,2	2,1	2,01	1 μl	72	2 μl
12 d / Control	1021,5	2,12	1,99	1 μl	40	2 μl
12 d / Cirugía	796,5	2,09	1,83	1 μl	7,02	2 μl
12 d / Cirugía	1003	2,1	1,97	1 μl	46,3	2 μl
12 d / Cirugía	2760	2,08	1,41	1 μl	92	2 μl

TABLA 1b. Cuantificación del ARN

El número de integridad del ARN ó “RNA integrity number” (RIN) en el grupo de 24 h resultó ser una media 2.3 y 2.4 para controles y cirugía respectivamente, 2.3 y 2.6 en el grupo de 3 días para controles y cirugía; 2.3 y 2.4 en el de 7 días para controles y cirugía y finalmente 2.3 y 2.6 en el grupo de 12 días para controles y cirugía. Estos datos nos dejan una media total de RIN= 2.4 en el conjunto total de las 24 muestras, 2.4 para los controles y 2.5 para las cirugías.

El análisis de calidad se obtuvo mediante espectrofotometría (Nanodrop, Fisher) para determinar la absorbancia y fluorimetría (Qubit) (Figura 15)

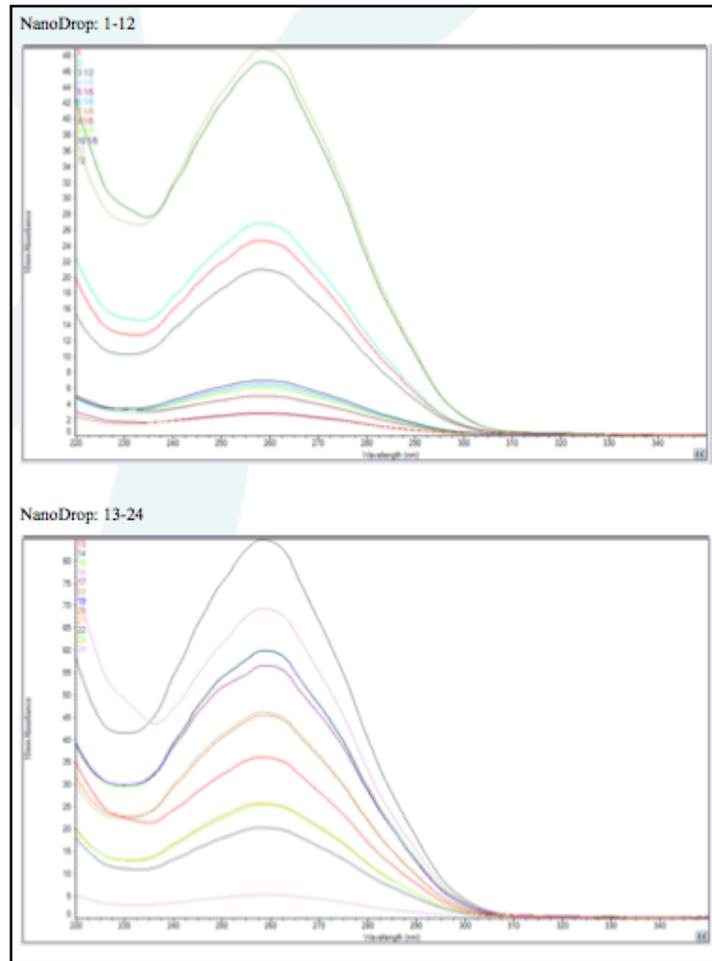


Fig. 15. Análisis de absorbancia

5.3.2. Resultados del preprocesado de las muestras de ARN para determinación de expresión mediante array.

Una vez establecido el umbral de detección Ct a nivel y aplicando el criterio de detectabilidad en el que se consideró una señal de expresión adecuada y de confianza aquella que reflejara un valor de Ct menor de 36 ciclos y con al menos un 75% de los replicados correctos, se obtuvo la siguiente matriz de correlación para el análisis diseñado. (Figura 16)

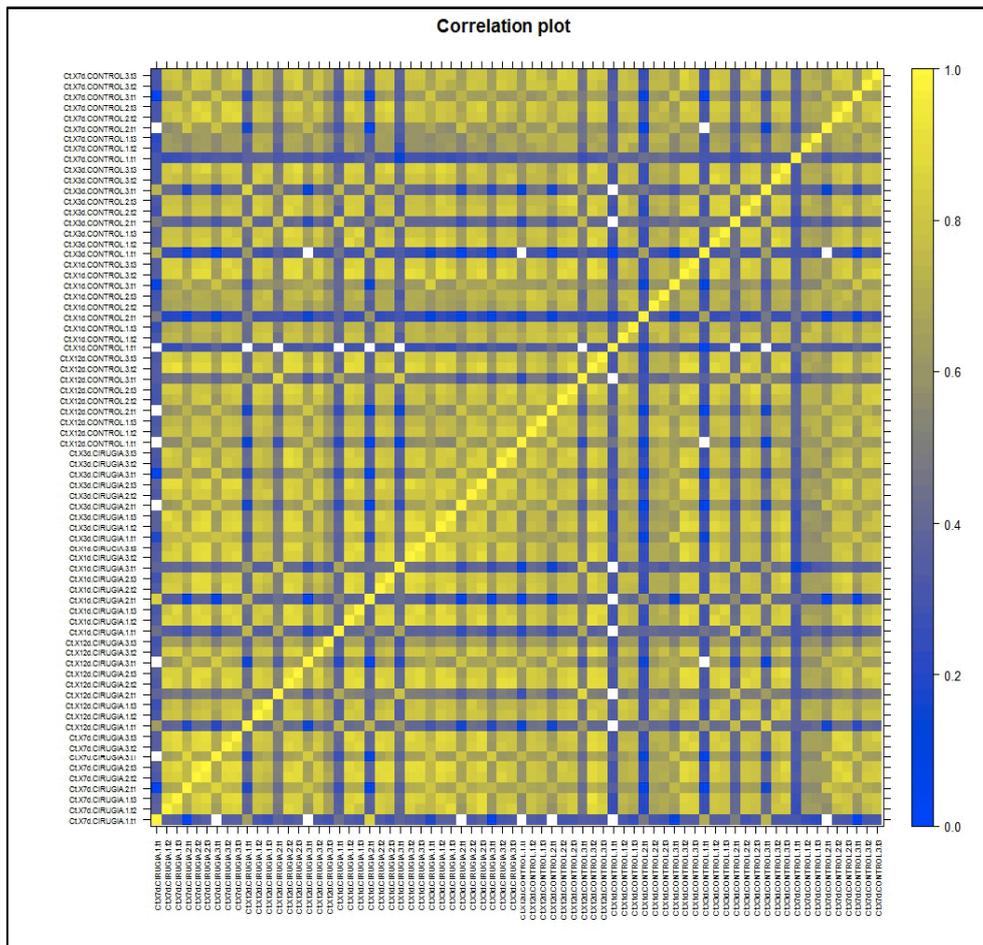


Fig. 16. Análisis de correlación por puntos

5.3.3 Resultados del *array* de expresión génica tras inducir movimiento dentario ortodóncico

En los resultados de análisis de expresión génica secuenciada a lo largo del período experimental se observan los cambios en la expresión de numerosos genes seleccionados (Figura 17). Tras realizar el análisis de barrido inicial se realizó un tamizaje una vez normalizados respecto a los grupos control en los mismos días experimentales. Posteriormente se seleccionaron todos aquellos genes de expresión en los que se observaron diferencias significativas ($p < .05$) entre el grupo control y experimental y además que mostraban un comportamiento homogéneo con menos de 36 ciclos en el 75% de los replicados (Figura 16).

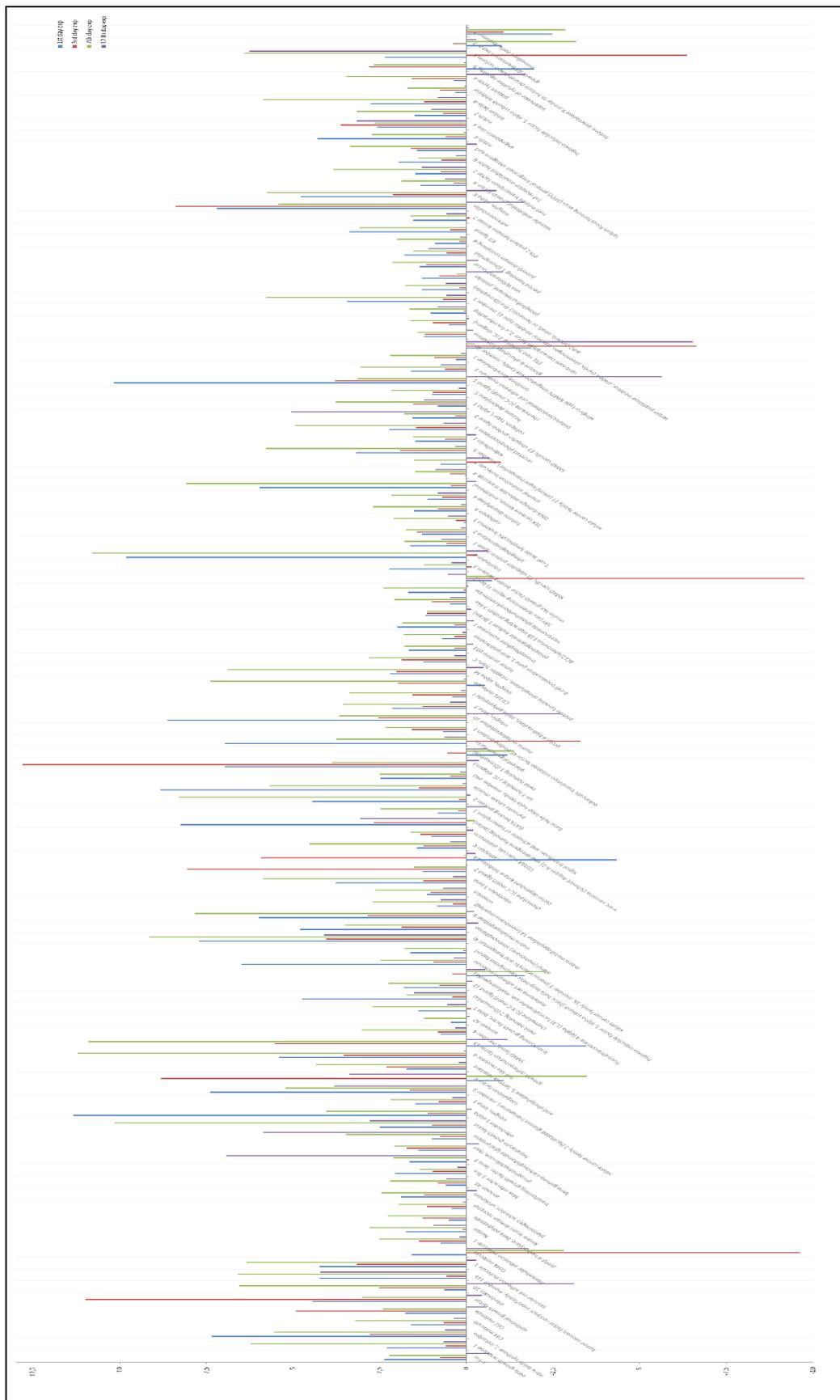


Fig. 17. Cambios de expresión génica con respecto a los controles en cada punto temporal

En la Figura 17 por tanto, podemos ver la criba de genes con diferencias significativas de expresión, tanto aumentada como disminuida, con respecto a los controles, y cuantas veces más se expresan e inhiben con respecto a los mismos en cada punto temporal, siguiendo un código de colores: azul para T1 (24h), rojo para T2 (3 días), verde para T3 (7 días) y morado para T4 (12 días).

5.3.3.1. Expresión génica a las 24 horas

Tras 24 h de la aplicación de fuerza, encontramos que los animales sometidos a corticotomía sufrían una expresión aumentada en más de 7,5 veces con respecto a los controles de los siguientes genes: *Interleukina 1 α (IL1 α)*, *Viral Oncogene Homolog*, *Pyruvate Kinase (muscular)*, *Metaloproteinasa de la matriz 10 (MMP10)*, *Interleukina 6 (IL6)* y *Chemokine ligand 3 (CC Motif)*.

Los siguientes genes también vieron aumentada su expresión, aunque en menor medida (entre 5 y 7,5 veces más que los controles): *Nitric Oxide Syntetase 2 (Nos2)*, *Toll-like receptor 4*, *Melanoma cell adhesion molecule*, *Solute carrier family 16 member 3*, *Matrix metalloproteinase 9 (MMP9)*, *Lin 7 Homolog A (C Elegans)*, *Placental Growth factor (PGF)*, *tyrosine kinase endothelial (TEK)* y *adrenomedullin*.

Finalmente, aquellos genes que se regularon negativamente, es decir disminuyeron su expresión de forma significativa, fueron: *Coagulation factor X*, *Growth Differentiation Factor 15 y 7 (GDF15, 7)*, *Fucosyltransferase 4 α* , *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A*, *Twist homolog 1*, *Cd1d1 molecule*, *Sex-determining region Y (SRY) box2*, *Wingless Type MMTV* y *Supressor of cytokine signaling 5*.

5.3.3.2. Expresión génica a los 3 días

A los 3 días, se observa un aumento de expresión génica en el grupo experimental de más de 7,5 veces con respecto a los controles en los siguientes genes: *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Coagulation Factor X*, *Chemokine ligand 2 (CC motif)*, *Lin 7 Homolog A (C Elegans)* y *adrenomedullin*.

Aumentaron su expresión moderadamente (de 5 a 7,5 veces más que los controles) los genes: *Growth Differentiation Factor 15 (GDF15)* y *Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 1A*. En cuanto a descenso en su expresión, encontramos que *Cd44 molecule* y *Sex-determining region Y (SRY) 2* descienden su expresión en más de 10 veces, y también se inhiben aunque en menor medida *Placental Growth Factor (PGF)*, *Stromal Interaction Molecule 3*, *Wingless Type MMTV*, *Histone deacetylase 9* y *Immediate Early Response 2*.

5.3.3.3. Expresión génica a los 7 días

Tras 7 días de aplicación de la fuerza, aquellos genes cuya expresión se encontró aumentada en más de 7,5 veces en el grupo experimental con respecto a controles fueron: *Hepatic Growth Factor (HGF)*, *Toll-like receptor 4*, *Growth Differentiation Factor 15 (GDF15)*, *Solute carrier family 16 member 4*, *Matrix Metalloproteinase 9 (MMP9)*, *GATA binding protein 1*, *Interleukin 6 (IL6)* y *tyrosine kinase endothelial (TEK)*.

Se expresaron entre 5 y 7,5 veces más que en los controles los genes: *Early growth response 2*, *Nos2*, *IL10*, *TNF11b*, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, *IL1 β* , *Pyruvate Kinase (muscular)*, *Integrin α M*, *adrenomedullin*, *Inhibin β A*, *Histone deacetylase 9* y *Serpin Peptidase Inhibitor 1*.

Por el contrario, *GDF7*, *Immediate Early response 2*, *Sex-determining region Y (SRY) 2*, *Fucosyltransferase 4a*, *Intercel Adhesion Molecule 1* y *Coagulation Factor X* se vieron regulados negativamente, siendo la expresión de este último gen la más inhibida.

5.3.3.4. Expresión génica a los 12 días

En el día 12 se observa un descenso general en la tasa de movimiento dentario clínico asociado igualmente a una expresión no tan aumentada de la mayoría de los genes analizados. No se observa expresión de ningún gen aumentada por encima de 7,5 veces con respecto a los controles, y únicamente tres se expresan entre 5 y 7,5 veces más: *Transforming Growth Factor β 3*, *Gla Protein* y *Histone deacetylase 9*.

Descienden su expresión los genes: *Early Growth Response 1*, *Cd2 molecule*, *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Vascular Cell Adhesion Molecule 1*, *Cd44 molecule*, *GDF 15*, *Fucosyltransferase 4a*, *SMAD1*, *Stromal Interaction Molecule 3*, *adrenomedullin*, *Integrin α X*, *Platelet Factor 4*. Todos ellos disminuyen su expresión por debajo de 2.5 veces excepto *IL10* y *Chemokine Ligand 3* que disminuyen en más de 2,5 y 7,5 veces respectivamente.

5.4. Resultados histológicos

Los registros histológicos obtenidos a partir del grupo experimental tratado con ortodoncia y corticotomía, así como en el grupo control sometido exclusivamente a movimiento dentario ortodóncico, muestran un aumento coherente de la reabsorción ósea en ambos grupos. (Figuras 18 y 19). En aquellos grupos sometidos a fuerzas ortodóncicas se observa una desestructuración marcada del entramado óseo (Figura 18). No obstante, a modo comparativo, la aplicación de corticotomía (Figura 19), observamos produce una marcado aumento de las lagunas reabsorptivas compatibles con actividad osteoclástica aumentada.

En cualquier caso, es notorio el marcado componente inflamatorio desencadenado en estos grupos sometidos a fuerzas ortodóncicas y corticotomía alveolar (Figuras 18 y 19)

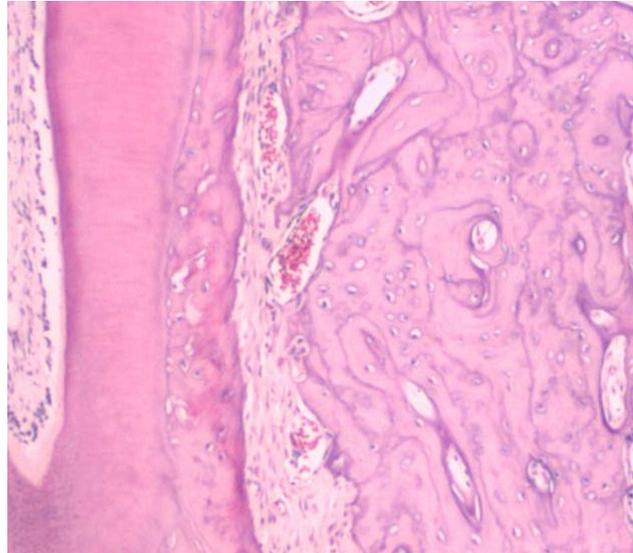


Fig. 18. Corte sagital de la cresta alveolar correspondiente al, grupo control, donde se observa imagen representativa de la moderada desestructuración del tejido óseo laminar debido al movimiento dentario ortodóncico inducido. Tinción H-E x160.

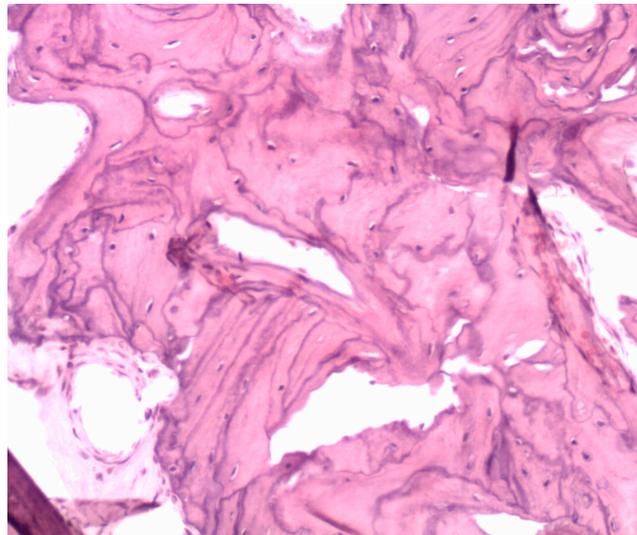


Fig.19. Corte sagital de la cresta alveolar correspondiente al, grupo sometido a corticotomía y movimiento dentario, donde se observa imagen representativa de la avanzada desestructuración del tejido óseo laminar debido al movimiento dentario ortodóncico inducido. Tinción H-E x160.

6. DISCUSIÓN.

En las últimas décadas, han surgido múltiples técnicas en la literatura con un objetivo común: acelerar el MDO y conseguir por tanto una reducción en el tiempo de tratamiento ortodóncico. Sin embargo, como vimos en la revisión bibliográfica, muy poco se puede afirmar en realidad sobre el MDO modificado biológicamente. La mayoría de los artículos no pueden compararse debido a las grandes diferencias en técnicas, modelo animal y la ausencia de consenso en el rango de fuerzas y de control sobre la aparatología. En los estudios realizados en humanos, existe también una carencia de estudios clínicos randomizados y no se usan medidas de ciego de forma generalizada. Esto junto con el reducido tamaño muestral de la mayoría de los estudios debe hacernos tomar los resultados de forma cauta.

De todos los métodos existentes, los quirúrgicos, particularmente la corticotomía, parecen estar en auge, y se considera probado que la agresión quirúrgica al hueso acelera el MDO. (216) (219) A pesar de las diferencias en procedimientos y magnitud de la fuerza y la mezcla de estudios en animales y humanos, según los estudios consultados durante la revisión bibliográfica, podríamos afirmar que la corticotomía aumenta el MDO entre un 30 y un 50%. (214) (217)

La técnica más usada consiste en una incisión en el tejido blando alrededor del área donde se quiere efectuar el movimiento dentario, efectuando un colgajo de espesor total y perforaciones o incisiones longitudinales en el hueso cortical bajo irrigación y posterior sutura de la herida. (198)(200) Existe sin embargo en los últimos años una tendencia a simplificar progresivamente la técnica quirúrgica. Muy recientemente, Alikhani et al (221) realizaron un ensayo clínico en humanos en el que se practicaban microperforaciones en el hueso bajo anestesia pero sin necesidad de colgajo previo, distal a los caninos a retraer, encontrando 2.3 veces más MDO que en controles.

A pesar de estos esfuerzos por simplificar la corticotomía, no debemos olvidar que cada procedimiento quirúrgico implica cierto número de efectos secundarios y riesgos

propios de cirugías similares. Los resultados son técnico-dependientes, y en el caso de cirugías mayores como la osteotomía, es necesario realizar previamente un estudio exhaustivo del beneficio real para el paciente. Incluso con el refinamiento de la técnica quirúrgica y el aumento de calidad de los experimentos realizados, aún existe una necesidad de realizar ensayos clínicos randomizados y la base biológica del MDO acelerado mediante corticotomía es aun controvertida.

Cómo acelera biológicamente la corticotomía el MDO es un punto clave. En los estudios consultados, el sustrato biológico subyacente se ha indicado como un aumento en marcadores inflamatorios como las citoquinas, secundario al daño óseo, que podría desencadenar un reclutamiento rápido de osteoblastos y osteoclastos. Debido a esto, se aceleraría el metabolismo óseo siendo la causa del aumento de MDO. (220) (240)

En una revisión reciente en 2013, Wilcko y Wilcko (279) confirmaron que la agresión quirúrgica de la corticotomía produce una respuesta inflamatoria local exagerada, aumentando la presencia de células para facilitar la cicatrización. Defendían que el MDO se acelera debido a que durante el tiempo que dura la respuesta inflamatoria, en primer lugar porque hay una desmineralización del hueso alrededor de los dientes y en segundo lugar por los cambios que se producen en el PDL, siendo posible ver este proceso de desmineralización/remineralización en Tomografía Computarizada de superficie (CT-scan). (280)

Sin embargo, sólo se ha encontrado prueba de esta desmineralización en estudios animales, más concretamente en ratas, (203) mientras que en perros no se encontró evidencia de tal proceso, (216) razón por la cual no podemos afirmar sobre seguro que se da en humanos. Mathews y Kokich, en su revisión de 2013 contradiciendo la de Wilcko acerca de la corticotomía, (281) se preguntaban si el CT-scan de superficie tiene suficiente resolución para detectar estas diferencias de mineralización en hueso.

En etapas tempranas del MDO se produce una hialinización del PDL debido a las fuerzas compresivas, y mientras esto ocurre, no puede iniciarse el movimiento dentario. (58) Histológicamente, se ha comprobado que esta hialinización se elimina en aproximadamente 4 semanas (214), pero la inflamación desencadenada por la corticotomía provoca una rápida aparición de macrófagos que hacen desaparecer la sustancia hialina en 1 semana. Debido a esto, se produce una temprana reabsorción ósea que resulta en MDO acelerado.

Por otra parte, los estudios demuestran que el MDO inducido por corticotomía sufre un pico de actividad alrededor de los 22-25 días después de la intervención, (220) consiguiéndose en ese periodo dos veces más movimiento ortodóncico que en los controles, pero a partir de ese punto se produce una desaceleración, volviendo la tasa de movimiento a valores normales. De acuerdo con Mathews y Kokich, (281) el RAP puede durar hasta 4 meses, por lo que sólo obtendremos MDO acelerado durante éste periodo. Además, no existe evidencia en la literatura de que el injerto óseo mejore la estabilidad de los resultados ortodóncicos, ya que no existen estudios a largo plazo que comparen los resultados de retención con y sin injerto óseo secundario a corticotomía.

Es difícil generalizar la cirugía en la práctica ortodóncica diaria, ya que hay un grupo importante de pacientes que pueden no ser candidatos a ella. La edad, o la existencia de patología de base previa, pueden ser factores excluyentes, ya que de hecho, en la mayoría de los artículos donde se usaba corticotomía, se establecían factores de inclusión y exclusión para los individuos participantes. (221,228) Grupos de edad de 18 a 30 años con buena calidad ósea eran preferibles, y los efectos a largo plazo sobre la distracción del PDL y los espacios interdientales son aún desconocidos. (227, 230)

Al mismo tiempo, debido a que los avances en ciencias biomoleculares han alcanzado nuestro campo, es posible encontrar en la bibliografía existencia de otras técnicas que podrían constituir una alternativa para la corticotomía. (234,254) En particular,

los artículos que proponen el uso de técnicas basadas en la terapia génica o en las células madre comienzan a ser cada vez más numerosos. (160, 253, 282)

Yu et al, (160) confirmaron que la transfección con osteoprotegerina (OPG) a líneas celulares pre-osteoblásticas inducía la maduración a osteoblastos, y Zhao et al (282) demostraron que la transfección génica de OPG mejoraba la reparación de la reabsorción radicular durante la fase de retención post-ortodóncica mediante un aumento en el número de osteoblastos, consiguiendo por tanto una mayor formación ósea alrededor de los dientes.

Kanzaki et al (253) comprobaron que la transfección de RANKL al tejido óseo circundante aumentaba el movimiento dental mediante activación de osteoclastos, y después de esto, Iglesias et al (254) compararon la eficiencia del aumento de MDO conseguido con transfección de RANKL y corticotomía, encontrando una mayor tasa de movimiento dental en el primer grupo.

Ahora, depende de la comunidad ortodóncica decidir si estas técnicas son o no adecuadas para su aplicación en nuestro campo, y si presentan ventajas sobre otras técnicas ya existentes como la corticotomía. Para conseguir hacer esto con propiedad, debemos aclarar primero nuestros conocimientos sobre las vías de señalización moleculares y el mapa de genes implicados en el proceso fisiológico de movimiento dentario.

Con este objetivo en mente, y con el fin de ser capaces de comparar nuestros resultados con los que se consiguen utilizando técnicas quirúrgicas, realizamos un análisis por microarray en muestras óseas de rata en las que se había inducido MDO normal y acelerado con corticotomía. Se realizó una selección de 224 genes con evidencia previa en la literatura de su implicación en el movimiento dentario, y finalmente, se incluyeron genes relacionados con las células madre mesenquimales, hematopoyéticas e hipoxia.

Las condiciones de hipoxia en los tejidos se han considerado en líneas generales, como un inhibidor de la diferenciación celular, dependiente del tipo de células. (283) Así, se ha comprobado que inhibe la miogénesis, (284) la adipogénesis (285) y la osteogénesis, (286) pero sin embargo, promueve la diferenciación de precursores mesencefálicos (287) y aumenta la especialización hemangioblástica. (288)

Se ha sugerido que esta aparente contradicción podría tener un origen embrionario, ya que antes de su conexión al aporte sanguíneo de la madre, los embriones sufren una fase de baja concentración de oxígeno. En posteriores etapas del desarrollo fetal el crecimiento de los órganos previo al desarrollo vascular desemboca en ambientes hipoxicos. (289,290) A lo largo de la evolución, varios órganos se han adaptado a estos bajos niveles de oxígeno y han integrado la hipoxia en sus programas genéticos como una señal regulatoria externa. Entre otros órganos, como el tubo neural (291) y la placenta (292) el esqueleto es uno de ellos.

Debido a esto, en las etapas iniciales de desarrollo embrionario de los mamíferos, las estructuras vasculares pasan por un proceso de remodelado que deja a las condensaciones mesenquimales sin vascularización, (293) y bajo esas condiciones, tales condensaciones son capaces de crecer y las células mesenquimales se transforman en condrocitos, estableciendo una estructura cartilaginosa que dará lugar al futuro esqueleto.

En etapas posteriores de la formación ósea, esta plantilla cartilaginosa avascular se erosiona y se reemplaza por hueso vascularizado en un proceso denominado osificación endocondral (294,295), y las células locales pierden sus características condrocíticas, disminuyendo la expresión de colágeno tipo II y expresando en cambio marcadores de Wnt9a y Bmp2, indicadores típicos del metabolismo óseo. (296)

Se ha determinado que el Sox 9 es un regulador crucial en la condensación mesenquimal, un proceso esencial para la formación de cartílago, y varias investigaciones como las realizadas por Akiyama et al en 2002 (297) demuestran que la supresión de Sox9

resulta en condrodisplasia severa. El Sox5 y el Sox 6 también regulan la diferenciación de los condrocitos, y mientras la inhibición de uno de ellos resulta en malformaciones esqueléticas moderadas, la ausencia de ambos implica anormalidades cartilaginosas muy severas. (298)

El complejo de transcripción “Factor 1 inducible por hipoxia” (hypoxia-inducible factor 1 (HIF1)) es un mediador en la respuesta adaptativa a los cambios en los niveles celulares de oxígeno. (299) Consiste en una subunidad alfa, oxígeno-sensitiva, que se estabiliza bajo situaciones de hipoxia y se une a la subunidad beta, potenciando la transcripción de genes relacionados con la angiogénesis y la supervivencia celular. (300)

Amarilio et al en 2007, (261) intentaron explicar el hecho de que se diera diferenciación condrocítica en las condensaciones mesenquimales bajo situaciones de hipoxia. Encontraron que el HIF1 actúa como regulador de la expresión de Sox9, clave para el mantenimiento de la condrogénesis. Argumentaron que este mecanismo podría estar detrás de el hecho de que la hipoxia inhiba la diferenciación ósea pero no la condrogénica.

La pérdida de hueso inducida por hipoxia se ha observado en diferentes estados patológicos como la isquemia (301) ó la metástasis ósea. (302) Las células madre mesenquimales derivadas de la médula ósea sí son capaces sin embargo de sobrevivir en situaciones de hipoxia. La médula ósea en si contiene entre un 1 y un 7% de oxígeno, y como mencionamos antes, las células madre mesenquimales sobreviven en estos bajísimos niveles de oxígeno. (303) El oxígeno es un sustrato para la producción de la energía en la célula y es un regulador rápido del metabolismo celular. Recientemente, se ha implicado también en el control de la proliferación celular y la morfogénesis de diversos tejidos, incluido el óseo. (304.)

Yang et al, en 2011 (262) concluyó que la hipoxia inhibe la osteogénesis de las células mesenquimales a través de la regulación negativa de la expresión del *RUNX2* por el

TWIST, una diana inhibidora del *HIF1 α* . *RUNX2* es un regulador principal de la esqueletogénesis, y un aumento en el Factor de Crecimiento de Fibroblastos 2 (Fibroblast Growth Factor 2 (*FGF2*)) induce al *RUNX2* a expresar *BMP2* en osteoblastos y condroblastos.

El *TWIST* actuaría como un represor de la transcripción, uniéndose al *RUNX2* tipo 1, suprimiendo también la expresión de *BMP2*, *RUNX2* tipo 2 y a los puntos de inhibición del *RUNX2* en las MSCs, debido a que la expresión de *RUNX2* desencadena varios genes inhibidores, clave para la diferenciación y maduración de los osteoblastos. Yang et al (262) sugirieron incluso que la ampliación conocimiento del comportamiento de las moléculas y vías de señalización implicadas en la regulación del *TWIST* podrían brindarnos nuevas estrategias de modificación de MSCs para su uso en el tratamiento futuro de fracturas y remodelación ósea.

El número de artículos que aclaran el papel de la expresión génica relacionada con las células madre hematopoyéticas y mesenquimales, aumenta rápidamente. Sin embargo, no se ha escrito mucho aún sobre la expresión génica estrictamente unida al MDO, siendo esta una de las razones por las que iniciamos nuestro experimento.

El análisis por Microarray se encuentra muy raramente en la literatura aplicado al campo de estudio del movimiento dentario, y en la mayoría de los casos está relacionado con el estudio de moléculas y marcadores específicos en el PDL, tales como las MMP's (305) o las proteínas de choque térmico (Heat-shock proteins (HSP's)) (306) Sólo pudimos encontrar dos artículos que intentaran obtener realmente una línea temporal genética, y se centraban en analizar el comportamiento del PDL bajo fuerzas compresivas, en lugar de las reacciones del hueso. Wescott et al en 2007, (307) con el fin de evaluar el potencial osteogénico del PDL, aplicó tensión sobre células del PDL cultivadas *in vitro* y analizó la expresión de 78 genes implicados en la diferenciación osteoblástica y el metabolismo óseo mediante RT-PCR. Li et al en 2013, (308) realizaron un verdadero microarray en un modelo

del PDL sometido a fuerzas compresivas, que consistía en células del PDL cultivadas en 3D. Después del array inicial, seleccionaron 15 genes que consideraron de mayor interés y los analizaron también mediante RT-PCR. A pesar de las diferencias con nuestro estudio, y debido a la ausencia de referencias bibliográficas, podríamos comparar nuestros resultados con los de Wescott y Li.

El análisis realizado en nuestro estudio ofrece una gran cantidad de información en cuanto a la secuencia genética implicada en el movimiento dentario ortodóncico biológicamente acelerado. En nuestros resultados destaca la expresión de Interleukinas, concretamente IL10, 6 y 1α y β . Estas últimas se han descrito implicadas como mediadores de la inflamación secundaria a daño óseo (73) y se han encontrado elevadas en los tejidos circundantes tras la aplicación de fuerza ortodóncica. (88) A las 24 h, IL6 aumentó su expresión por encima de 7,5 veces en el grupo de cirugía con respecto a los controles, así como la IL 1α . A los siete días, IL6 e IL 1β seguían con expresión aumentada, llamando la atención a su vez el gran aumento de la IL10 (entre 5 y 7,5 veces) para bajar dramáticamente hasta la casi inhibición a los 12 días.

Por otra parte, las Metaloproteinasas de la Matriz (MMPs) se han descrito sensibles al estrés mecánico (93) y relacionadas con la reabsorción ósea en procesos de erupción y de movimiento dentario inducido. (70) Concretamente las MMP9 son reguladoras de la respuesta angiogenica por parte de las células madre. (261,262) A las 24h, MMP10 aumentó su expresión en más de 7,5 veces respecto a los controles y MMP9 también aumentó entre 5 y 7,5 veces, siendo este aumento incluso mayor a los siete días.

Destaca así mismo el papel del adrenomedullin, un vasodilatador que se ha descrito como potenciador de la angiogenesis por parte de las células madre hematopoyéticas (309), y cuya expresión aparece muy aumentada en los grupos de 24 h, 3 días y 7 días y que sin embargo decae drásticamente a los 12 días hasta disminuir muy representativamente su expresión.

Otro caso representativo es el del *Growth Differentiation Factor 15* y 7. El primero aparece muy disminuido a las 24 h, mientras que aumenta en los días 3 y 7 para volver a disminuir a los 12 días. El segundo aparece disminuido a las 24 horas y 7 días.

Hay genes que ven disminuida su expresión en todos los puntos temporales, como es el caso de la *Fucosyltransferase 4α*, *Stromal Interaction Molecule 3*, *Histone deacetylase 9*, *Epidermal Growth Factor (EGF)*, *Immediate Early response 2*, *Sex-determining region Y (SRY) 2*, *Wingless Type MMTV*.

Por el contrario hay otros genes que ven su expresión aumentada en todos los grupos, como es el caso de *Pyruvate kinase*, *Nos2*, *Toll-like receptor 4*, *Solute carrier family 16 member 4*, *Lin 7 Homolog A (C Elegans)*, *Tyrosine kinase endothelial (TEK)*.

El Microarray nos permite analizar perfiles de expresión (a nivel de mRNA y microARN) y las variaciones estructurales (número de copias del ADN) a nivel del genoma completo. (310) Los microarrays de mRNA de alta densidad son capaces de analizar hasta 50.000 genes, pero requieren una muy baja degradación de las muestras de ARN, que necesitan tratarse primero con parafina, e incluso entonces, entre un 10 y un 15% de las muestras pueden perderse. (311) El hueso es uno de los tejidos orgánicos con mayor tendencia a la degradación del ARN, lo cual puede apreciarse en nuestras muestras. Debido a esto, elegimos finalmente realizar un Taqman® assay, que consiste en una qPCR exponencial replicada 5 veces, teniendo estadísticamente mayor seguridad en los resultados. (312) Hasta 224 genes pueden analizarse con el Taqman® assay, y tras una exhaustiva consulta bibliográfica, pudimos elegir aproximadamente una lista de genes con alta probabilidad de participar en el movimiento dentario.

Debido a las razones arriba expuestas, prestamos especial atención a mantener la integridad del ARN a la hora de tomar las muestras. En el hueso, la cantidad de expresión de ARN en el tejido ya es limitada, por la baja cantidad de células presentes, embebidas en

una matriz mineralizada, y además la degradación ocurre muy rápidamente. Las muestras se tomaron en el menor tiempo posible tras el sacrificio de los animales y los fragmentos de hueso se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . A pesar de todo, después de la extracción, la cantidad y calidad del ARN era limitada.

Cuando hablamos del perfil de expresión del ARN, con independencia del tipo de análisis al que las muestras de ARN están destinadas, hay un punto crucial: evitar la degradación previa a su aislamiento y procesado. Se ha escrito mucho en los últimos años acerca de este tema en particular. Para empezar, la manera en la que se toman y conservan las muestras parece tener una influencia directa sobre los resultados. De acuerdo con Li et al, (313) el tejido fijado mediante formalina y sumergido en parafina (formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)) muestra una degradación particularmente alta. Sin embargo, los perfiles totales de ARN en tejidos FFPE y congelados son comparables, de acuerdo con ciertos informes, (314, 315) razón por la cual se ha sugerido también que el microARN podría escapar la degradación desencadenada por la fijación con formalina.

La inmersión en parafina y formalina produce cambios químicos en el tejido que pueden desembocar en degradación y uniones cruzadas entre moléculas. Además, generalmente, las muestras tratadas de esta manera se conservan durante largos periodos de tiempo, afectando posiblemente a los resultados de futuros análisis. (316) Ibberson et al (317) estudiaron en su artículo de 2009 la degradación real del ARN en tejido congelado inmediatamente y recomendaron finalmente el uso de muestras de ARN con un RIN igual o superior a siete, para poder conseguir resultados fiables tras análisis con microarray u otras formas de analizar el perfil del ARN.

Sin embargo, estos resultados deben tomarse con cautela, ya que el experimento de Ibberson se realizó en muestras de tejido de hígado y duodeno humanos, y las de nuestro experimento son de tejido óseo mineralizado de rata. Además, el tejido procesado inmediatamente o cultivado previamente muestra diferente sensibilidad a la degradación de

ARN. Por ejemplo, las muestras de hígado del estudio de Ibberson mostraron menor degradación incluso tras 4 horas de su inclusión sólo en hielo, mientras que las duodenales se degradaron con mayor facilidad.

La amplificación del ARN es básica para cualquier estudio de expresión y actualmente hay un gran número de empresas (Nugen, Quiagen, Epicentre... etc) que han desarrollado kits de amplificación para muestras de ARN degradado. Roberts et al ⁽³¹⁸⁾ propusieron una estrategia de amplificación basada en el uso de un primer suplementado con DNA-asa adicional que mostró buenos resultados. También encontraron una correlación entre las muestras FFPE y congeladas con un R^2 entre 0.82 y 0.89.

Utilizando estos primers, la transcripción reversa inicial se preserva y se minimizan los sesgos de amplificación del mRNA 3' o 5'. Esto puede utilizarse en tamaños muestrales pequeños (<50 µg de ARN total) obteniendo resultados en aproximadamente 3 días, o en el caso de mayores tamaños muestrales (100-250 µg) se consiguen resultados en 1.5 días. ⁽³¹⁹⁾

En contra de las afirmaciones de Ibberson ⁽³¹⁷⁾, Roberts et al ⁽³¹⁸⁾ consiguió aislar muestras con RIN < 3, así como amplificarlas y etiquetarlas, siendo tanto muestras FFPE como congeladas, obteniendo un resultado similar y estable. Sin embargo hay ciertos aspectos que resultan críticos a la hora de conseguir ARN de alta calidad: la recuperación durante la extracción de pequeñas moléculas de ARN que pueden tender a perderse en los diferentes y numerosos pasos de purificación, y extraer tanta información como sea posible del ARN parcialmente degradado, necesitando el uso de los primers que comentamos antes, a lo largo del mensaje completo. ^(320, 321)

De acuerdo con Hatzis et al, ⁽³²²⁾ el método de conservación de las muestras también podría influenciar la disponibilidad posterior de ARN y su calidad. Sin embargo, los niveles de expresión génica no parecieron afectarse por el método de conservación, al menos en muestras de tejido afectado por cáncer de mama, objeto de estudio de este grupo de investigación.

El número de integridad del ARN ó “RNA integrity number” (RIN) se considera como un método fiable de determinar la integridad del ARN. Este algoritmo se desarrolló utilizando herramientas que identificaban aquellas regiones identificativas de la integridad del ARN en el electroferograma, que después se usan para expresar la integridad del mismo en una escala del 1 al 10. La relevancia de este factor de integridad en el análisis final de la expresión génica, especialmente cuando existe alta variabilidad del mismo en las muestras, fue estudiada por Viljoen et al, (323) que propusieron una estrategia de determinación de la calidad con el fin de reconocer arrays de calidad menor y heterogénea, pudiendo éstos incluirse en el análisis una vez tomadas ciertas medidas, tales como identificar la calidad del array y los efectos de agregación. Argumentaban que estas método de control de calidad podía ser especialmente útil para muestras clínicas con calidad baja y heterogénea de ARN, con $RIN \leq 2$.

En cualquier caso, al interpretar los resultados, es necesario tener en cuenta que la utilización de un modelo animal no puede derivar su total extrapolabilidad en el traslado de sus conclusiones a humanos. Las dosis, el metabolismo y las reacciones a los químicos varían mucho entre especies, por lo que establecer comparaciones absolutas es complejo. En nuestra revisión bibliográfica, muy pocos de los 74 artículos incluidos finalmente tuvieron lugar en humanos (16 de 74), y los que tuvieron lugar en modelo animal utilizaron diferentes especies, en su mayor parte ratas, (44 de 74 artículos, 29 Wistar y 15 Sprague-Dawley) seguido de perros (6 de 74, beagles y fox hounds, todos ellos utilizados para testar técnicas quirúrgicas) y en siete casos, conejos, cerdos de guinea, monos y ratones. A pesar de que, como hemos mencionado anteriormente, la reacción a los químicos varía mucho entre especies, y las comparaciones entre estudios son difíciles, los modelos animales, especialmente entre mamíferos, son capaces de reproducir fielmente procesos celulares complejos que ocurren también en humanos, y presentan ventajas obvias sobre los estudios *in vitro*, donde un número limitado de células se aísla de un ambiente mayor, lo cual puede influenciar los resultados. Además, las relaciones causa-efecto pueden establecerse de forma segura en modelo animal mediante activadores e inhibidores o, como se ha hecho más recientemente, a través de animales genéticamente modificados. (324)

Las ratas parecen ser el modelo animal más utilizado, y es también el escogido para nuestro experimento. Sin embargo, este tipo de roedores presenta un movimiento fisiológico de los molares en sentido distal, que podría interferir con las medidas y análisis histológicos realizados. Del mismo modo, la erupción continuada de los incisivos que podría influir en el control de la dirección de la fuerza pudiendo implicar la menor fiabilidad en el anclaje previsto. Para esclarecer esta cuestión antes del ensayo definitivo, se realizó un estudio piloto previo adicional para validar la elección de la aparatología y el procedimiento experimental a emplear, así como para la determinación de las reacciones adversas que pudiesen interferir. A pesar de la utilización del aparato propuesto por Ren y col.,⁽²⁶⁰⁾ diseñado específicamente para minimizar los posibles efectos adversos, es difícil controlar la magnitud y dirección de la fuerza ejercida con los muelles, que puede no ser constante o decaer durante el experimento.

Para evitar esto, tratamos de calcular previamente la cantidad ideal de fuerza que se debería usar en este tipo de roedores para evitar daño tisular, pero el rango de fuerza utilizado en los estudios consultados es muy grande, desde los 15 gramos en aquellos estudios que usan campos magnéticos a los 400 gramos de algunas técnicas quirúrgicas. Muchos de los estudios ni siquiera mencionaban la fuerza o lo hacían sólo al principio del experimento, sin cuantificar o notificar el posible decaimiento de la fuerza. Los molares en las ratas son 50 veces menores que en humanos, por lo que a la hora de comparar rangos de fuerza, se debería estimar el área de la superficie radicular. De acuerdo con Ren et al⁽⁶³⁾, 20 g de fuerza en ratas podría equivaler en humanos a 1kg de fuerza, sin embargo, la mayoría de los artículos usan fuerzas muy superiores a ésta. (ver Figura 18)

En nuestro experimento, se usó aproximadamente una fuerza de 25 g, en la media de lo utilizado en los estudios consultados,^(251, 267) donde los rangos de fuerza para ratas varían entre los 10⁽²³³⁾ y los 100 gramos⁽²¹³⁾.

Study	Study Design	Sample (n)	Specie	Age, Sex	Force (g)	Time (days)	Success Rate	Clinical Applicability
MAGNETS								
Tengku, 2000	CS	32	WR	9w, 32M	30	14	NSRD	NO
LLLT								
Duan, 2012	CS	40	WR	6w, 40M	10	14	30% faster OTM with LLLT	YES
Altan, 2012	CS	38	WR	10w, 38M	20	8	NSRD	YES
Marquezan, 2010	CS	32	WR	12w, 36M	40	7	NSRD	YES
Gama, 2010	CS	30	WR	3m, 30M	40	19	NSRD	NO
Yamaguchi, 2010	CS	50	WR	6w, 50M	10	7	LLLT increased OTM in a 32%	YES
Abi-Ramia, 2010	CS	45	WR	NM, 45M	40	7	No increase or decrease in OTM	NO
Kim, 2010.	ES	30	SDR	15w, NM	19.6	21	No increase or decrease in OTM	NO
Yoshida, 2009	CS	60	WR	6w, 60M	10	21	LLLT increases OTM in a 46%	YES
Kawasaki, 2000	CS	48	WR	6w, 48M	10	12	1,3 times more OTM with LLLT	YES
SURGICAL METHODS								
Iglesias-Linares 2012	CS	56	WR	7w, NM	10	32	CO increased OTM in a 21.63%, BMP-2 in 1.24%. NSRD in G4.	YES
Baloul, 2011	CS	114	SDR	NM	25	42	67% increased OTM	YES
Teixeira, 2010	CS	48	SDR	120d, 48M	50	28	50% increased OTM	YES
Wang, 2009	CS	36	SDR	Adult, 36M	100	60	No increase or decrease in OTM	NO
Lee, 2008	CS	30	SDR	NM	100	21	NSRD	NO
GENE THERAPY								
Zhao, 2012	CS	18	WR	6w, 18M	40	49	60,6% less relapse with OPG gene transfer	YES
Iglesias-Linares, 2011	CS	72	WR	7w, NM	10	32	41,8% more OTM using RANKL compared to CO	YES
Kanzaki, 2006	CS	25	WR	6w, 25M	NM	21	31,9% increase of OTM	YES
Kanzaki, 2004	CT	20	WR	6w, 20M	17	20	92,8% less OTM	YES
CHEMICAL METHODS								
Toro, 2013	CS	30	SDR	NM, 30M	13	28	Both BE and alendronate significantly inhibited OTM	NO
Li, 2013	CS	60	WR	8w, 60M	40	12	38% more OTM with PTH	YES
Kalpatur, 2013	CS	20	SDR	12w, 20F	50	56	65% less OTM on G1/G2, 86% less OTM on G3/G4.	NO
Yabumoto, 2013	CS	80	WR	8w, 80M	NM	3	NSRD after 3 days between groups	NO
Sirisontoon, 2012	CS	15	WR	10w, 15F	25	70	G1 doubled the rate of OTM while there was NSRD between the other two G	NO
Hao, 2011	CS	72	SDR	6w, 72M	50	14	NSRD in the 0.04mg/ml group but 40% decrease OTM in the rest of the groups	NO
Chen, 2011	RCT	18	SDR	4w, 8M	10	12	Double OTM rates in G1	YES
Davila, 2011	CS	73	SDR	2d, 73M	50	28	NSRD	NO
Meh, 2011	CS	48	SDR	13w, 48M	25	42	decreased OTM	NO
Salazar, 2011	CS	48	WR	8w, 48F	40	90	ovariectomy increased 15,9% OTM	NO
Sodagar, 2011	CS	32	SDR	32M	60	13	nicotine doubled the rate of OTM and is dose-dependent	YES
Gonzales, 2011	CS	50	WR	50M	50	84	74% OTM decreased	YES
Akhoundi, 2010	CS	40	WR	NM, 40M	60	14	Morphine reduced OTM in a 52%	NO
Choi, 2010	CS	54	WR	8w, 27M/ 27F	60	17	OTM was decreased in a 32,57%	YES
Han, 2010	CS	32	WR	7-8w, 32M	50	49	45% less OTM relapse	YES
Hauber Gameiro, 2008	CS	32	WR	NM, 32M	50	14	Celecoxib decreases 30% OTM using short-term dosage and 46% long term.	NO
De Carlos, 2007	CS	28	WR	3m, 28M	50	5	Rofecoxib inhibits OTM	YES
Sprogar, 2007	CS	30	WR	11-12w, 30M	25	40	Daily TBC3214, treatment significantly decreases OTM.	NO
Arias, 2006	CS	36	WR	NM, 36M	30	10	NSAID's diminish OTM in a 38-41%	YES
De Carlos, 2006	CS	42	WR	NM, 42M	50- 100	10	Rofecoxib/diclofenac inhibit OTM	YES
Gurton, 2004	CS	150	SDR	NM 150M	20	5	Pg analogs increase OTM in a 31-28% Pg antagonists decrease OTM in 20-26%	YES
Seifi, 2003	CS	28	WR	8w, 28M	60	21	PGE injections doubled OTM rate.	YES
Nilforoushan, 2002	CS	40	SDR	NM, 40M	60	14	Cholestasis increase OTM in 50%.	NO
Soma, 2000	CS	56	WR	NM, 56M	30	12	PTH in MC gel increase OTM in 50%	YES
Karsten, 1997	CS	20	SDR	3-5m 20F	15	42	Not conclusive.	NO
Hellsing, 1991	CS	16	SDR	3-5m, 16F	15	21	52% less OTM using NaF, 39% more OTM on pregnant	NO

Figura 18. Resumen de los estudios incluidos en la revisión sistemática realizados en ratas.

A pesar de éstos datos, podríamos considerar que pequeñas diferencias de magnitud y dirección de la fuerza no afectan de forma directa al propósito de nuestro estudio, ya que, aunque se midió la cantidad de movimiento dentario y se comparó entre métodos, nuestro objetivo principal era estudiar el mapa de expresión genética entre el MOD normal y acelerado mediante corticotomía. Sin embargo, se realizó un test inicial para validar el tipo de aparatología ortodóncica utilizada, así como los procedimientos experimentales y los efectos secundarios que pudieran surgir.

Como método de aplicación de la fuerza ortodóncica elegimos un muelle cerrado de Sentalloy (CCS, closed coil spring), siendo éste es el aparato más usado en la literatura, siendo también muy comúnmente usados los fabricados en Níquel-Titanio. En cuanto a la aparatología ortodóncica, existe también una gran variedad de aparatos utilizados para propósitos similares, desde distractores óseos a resortes o elásticos, pasando por dispositivos diseñados para cada caso específico y hechos a mano o expansores palatinos. Con los CCS, la dirección y magnitud de la fuerza no siempre puede controlarse, pudiendo no ser constante o decaer durante el experimento. Los elásticos a su vez, muestran un decaimiento de la fuerza de 45 a 0 N en los primeros 0.2 mm de decompresión, ⁽²⁶⁰⁾ y la dirección de la fuerza también puede variar.

El hueso alveolar es más denso en ratas que en humanos, sin osteonas ni espacios medulares, y los cambios tisulares relacionados con el tratamiento ortodóncico ocurren más rápido que en humanos. El tamaño dental es también menor. Para evitar errores en la medición de la tasa de movimiento dentario, los datos se registraron dos veces por dos operadores (M.C. y D.B) diferentes utilizando un calibre electrónico y lentes de aumento adaptadas, y fueron después revisados por un tercer operador (A.I.).

En cuanto al tiempo de observación, nuestra fase experimental con los animales duró un total de 12 días, teniendo lugar los sacrificios a las 24 h, 3, 7 y 12 días. Elegimos este tiempo de experimentación porque al darse las reacciones químicas y la renovación

ósea en espacios de tiempo considerablemente más cortos que en humanos, queríamos evitar que esto influenciara los resultados en la expresión génica más allá de 12 días. Se ha demostrado que tras 7 días, se ha encontrado clara evidencia de pérdida ósea en ratas a las que se les han colocado ligaduras para conseguir MDO. (325)

En la literatura incluida en nuestra revisión sistemática, hay muchas diferencias en cuanto a los periodos observacionales, y de nuevo, es difícil tener una orientación. El tiempo de estudio más corto fueron 5 días (177, 184) y 90 el más largo. (191) La media del tiempo de experimentación en ratas (incluyendo Wistar y Sprague-Dawley) fue de 26.2 días, (182, 197, 217) pero las técnicas usadas eran muy variadas. Entre los estudios de terapia génica, la media fue de 30.75 días y entre los estudios de técnicas quirúrgicas (sólo incluyendo estudios de corticotomía con circunstancias similares al nuestro) la media fue de 36.6 días.

7. CONCLUSIONES FINALES.

Teniendo en cuenta los antecedentes bibliográficos previos, así como la revisión exhaustiva y específica de los métodos biológicos de aceleración del MDO existentes hasta la actualidad, y tras analizar los resultados experimentales obtenidos, podemos extraer las siguientes conclusiones:

1. Se ha descrito en la literatura una gran variedad de métodos “biológicos” de aceleración del movimiento dentario ortodóncico, pero debido a la ausencia de consenso en cuanto a las pautas experimentales (modelo animal, aparatología para la aplicación de la fuerza, rango de fuerza aceptable para cada especie), resulta muy difícil, casi imposible, establecer comparaciones absolutas entre estudios o extraer conclusiones seguras y acertadas.
2. La mayoría de los estudios no aclaran suficientemente las bases moleculares subyacentes a la aceleración observada del movimiento ortodóncico con cada método concreto, y hay una ausencia generalizada de ensayos clínicos randomizados en humanos, con adecuada estadística y medidas de ciego, que ofrezcan una idea clara sobre la aplicabilidad real de las técnicas a la práctica clínica.
3. Las técnicas quirúrgicas y más concretamente la corticotomía, parecen ser las más populares y efectivas en cuanto al aumento neto de la tasa de movimiento ortodóncico. Sin embargo, la mayor parte de los estudios de este tipo se han realizado en animales o humanos con muy bajo tamaño muestral, el tipo de técnica utilizado no está estandarizado y los resultados podrían ser técnico-dependientes. Además es necesario valorar la relación riesgo/beneficio para cada paciente, con el fin de no subestimar los efectos secundarios inherentes a cualquier intervención quirúrgica.

4. El fin de nuestro experimento en ratas Wistar era el de comprobar el efecto aceleratorio real de la corticotomía sobre el MDO y descubrir la secuencia genética implicada en tal proceso, ya que actualmente es posible establecerla a partir de la actividad proteica en los tejidos y el ARN m, gracias a técnicas *in vitro* de biología molecular como el microarray.
5. La medición del movimiento dentario en ambos grupos, (controles sólo con fuerza ortodóncica y grupo experimental con fuerza ortodóncica y corticotomía) demuestra que efectivamente esta intervención quirúrgica aumenta la tasa neta de movimiento dentario ortodóncico con respecto a los controles de forma muy significativa. (46,2% más de MDO en el grupo de cirugía)
6. Del array de expresión génica se puede concluir que en el grupo de corticotomía se observa una expresión aumentada de genes correspondientes a mediadores inflamatorios como las Interleukinas (1, 6 y 10), activadores de la reabsorción ósea como las MMPs 9 y 10, además de potenciadores de la angiogénesis por parte de las células madre hematopoyéticas. Por otra parte se ve disminuida la síntesis de aquellas moléculas encargadas de promover la osteogénesis por parte de células madre mesenquimales. En el cuarto y último punto temporal, doce días después de la intervención, se observa una disminución clara de la expresión de genes relacionados con la cicatrización ósea y la inflamación.
7. Podríamos afirmar por tanto que se confirma la hipótesis de la existencia de una conexión real entre la activación de células madre mesenquimales responsables del aumento de la osteoclastogénesis tras la inflamación causada por la agresión quirúrgica a los tejidos, por lo que sería posible en un futuro próximo utilizar células madre como una técnica segura y muy específica diseñada con el fin de acelerar el MDO individualmente, evitando la agresividad, riesgos y efectos secundarios de cirugías como la corticotomía con fines ortodóncicos

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Philip C. History of orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:126.
2. McAuley JE. The natural history of the human teeth. A bi-centennial note. *Br Dent J.* 1971;131:369-370.
3. Hoffman-Axthelm W. The history of tooth replacement. *Quintessence Int.* 1970;1:81-87.
4. Asbell MB. John Nutting Farrar 1839-1913. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1998;114:602.
5. Mullender MG, Huiskes R. Proposal for the regulatory mechanism of Wolff's law. *J Orthop Res.* 1995;13: 503–512.
6. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 2006;28:221–240.
7. Luan X, Ito Y, Holliday S, Walker C, Daniel J, Galang TM, et al. Extracellular matrix-mediated tissue remodeling following axial movement of teeth. *J Histochem Cytochem.* 2007;55:127-140.
8. Weinmann JP. Bone formation and bone resorption. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1955; 8:1074-1078.
9. Sicher H, Weinmann JP. Bone growth and physiologic tooth movement. *Am J Orthod Oral Surg* 1944;30:109-132.
10. Fukada E, Yasuda I. On the piezoelectric effect of bone. *J. Phys. Soc. Jpn.* 1957;12:1158-1162.
11. Reitan K. Initial tissue behavior during apical tooth resorption. *Angle Orthod.* 1974;44:68-82.
12. Davidovitch Z. Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med* 1991;2:411-450.
13. Storey E. The nature of tooth movement. *Am J Orthod.* 1973;63:292-314.
14. Hamill OP, Martinac B. Molecular basis of mechanotransduction in living cells. *Physiol Rev.* 2001;81:685-674.
15. Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod.* 2008;30:299-306.

16. Masella RS, Meister M. Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:458-468.
17. Holliday S, Schneider B, Galang MT, Fukui T, Yamane A, Luan X et al. Bones, Teeth and Genes: A genomic homage to Harry Sicher's "Axial movement of teeth". *World J Orthod.* 2005; 6: 61–70.
18. Theilig C, Bernd A, Leyhausen G, Kaufmann R, Geurtsen W. Effects of mechanical force on primary human fibroblasts derived from the gingiva and the periodontal ligament. *J Dent Res.* 2001;80:1777– 1780.
19. Li J, Zhao Z, Wang J, Chen G, Yang J, Luo S. The role of extracellular matrix, integrins, and cytoskeleton in mechanotransduction of centrifugal loading. *Mol Cell Biochem.* 2008;309:41-48.
20. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2009;88:597-608.
21. Anastasi G, Cordasco G, Matarese G, Rizzo G, Nucera R, Mazza M, et al. An immunohistochemical, histological, and electron-microscopic study of the human periodontal ligament during orthodontic treatment. *Int J Mol Med.* 2008;21:545-554.
22. Proffit WR. *Biologic basis of orthodontic therapy.* En: *Contemporary orthodontics.* 3rd ed. St Louis: Mosby; 2000, p. 266-287.
23. Baumrind S. A reconsideration of the property of the "pressure tension" hypothesis. *Am J Orthod.* 1969;55:12-22.
24. Leighton BC, Howard RD. Orthodontics, the last hundred years. *Br Dent J.* 1981;151:14-19
25. Kardos TB, Simpson LO. A new periodontal membrane biology based on thixotropic concepts. *Am J Orthod.* 1980;77:508-515.
26. Yee JA, Kimmel DB, Jee WS. Periodontal ligament cell kinetics following orthodontic tooth movement. *Cell Tissue Kinet.* 1976;9:293-302.
27. Reitan K, Kvam E. Comparative behavior of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 1971;41:1-14

28. Grimm FM. Bone bending, a feature of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 1972; 62: 384-393.
29. Melsen B. Biological reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 1999;69:151-158.
30. Bassett CA, Becker RO. Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science.* 1962;137:1063-1064.
31. Zengo AN, Bassett CA, Pawluk RJ, Prountzos G. In vivo bioelectric potentials in the dentoalveolar complex. *Am J Orthod* 1974; 66:130-139.
32. Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. Electric currents, bone remodeling and orthodontic tooth movement I, the effect of electric currents on periodontal cyclic nucleotides. *Am J Orthod* 1980; 77:14-32.
33. Borgens RB. Endogenous ionic currents traverse intact and damaged bone. *Science* 1984;225:478-482.
34. Pollack SR, Salzstein R, Pienkowski D. The electric double layer in bone and its influence on stress-generated potentials. *Calcif Tissue Int* 1984;36:77-81.
35. Davidovitch Z, Finkelson MD, Steigman S, Shanfeld JL, Montgomery PC, Korostoff E. Electric currents, bone remodeling and orthodontic tooth movement II, increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotide levels by combined force and electric current. *Am J Orthod* 1980; 77: 33-47
36. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006; 129:469e1-469e26.
37. Burstone CJ. The mechanics of the segmented arch technique. *Angle Orthod.* 1966;36:99-120.
38. Von Böhl M, Maltha JC, Von Den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM. Focal hyalinization during experimental tooth movement in beagle dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2004; 125: 615-623.
39. Vas Leeuwen EJ, Maltha JC, Kuijpers-Jagtsman AM. Tooth movement with light continuous and discontinuous forces in beagle dogs. *Eur J Oral Sci.* 1999;107:468-474.

40. Kale S, Kocadereli I, Atilla P, Asan E. Comparison of the effects of 1,25 dihydroxycholecalciferol and prostaglandin E2 on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2004;125:607-614.
41. Kawakami M, Takano-Yamamoto TT. Local injection of 1,25- dihydroxyvitamin D3 enhanced bone formation for tooth stabilization after experimental tooth movement in rats. *J Bone Miner Metab.* 2004;22:541-546.
42. Soma S, Iwamoto M, Higuchi Y, Kurisu K. Effects of continuous infusion of PTH on experimental tooth movement in rats. *J Bone Miner Res.* 1999;14:546-554.
43. Soma S, Matsumoto S, Higuchi Y, Takano-Yamamoto T, Yamashita K, Kurisu K, Iwamoto M. Local and Chronic Application of PTH Accelerates Tooth Movement in Rats. *J Dent Res.* 2000;79:1717-1724.
44. Xu X, Zhao Q, Yang S, Fu G, Chen Y. A new approach to accelerate orthodontic tooth movement in women: Orthodontic force application after ovulation. *Med Hypotheses.* 2010;75:405–407.
45. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2008;87:414-434.
46. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Dual regulation of osteoclast differentiation by periodontal ligament cells through RANKL stimulation and OPG inhibition. *J Dent Res.* 2001;80:887-891.
47. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002;17:210–220
48. Noxon SJ, King GJ, Gu G, Huang G. Osteoclast clearance from periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2001;120:466-476.
49. Forwood MR. Inducible cyclo-oxygenase (COX-2) mediates the induction of bone formation by mechanical loading in vivo. *J Bone Miner Res.* 1996;11:1688–1693.

50. Brady TA, Piesco NP, Buckley MJ, Langkamp HH, Bowen LL, Agarwal S. Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor-beta1. *J Dent Res.* 1998;77:1779–1790.
51. Mitsui N, Suzuki N, Maeno M, Yanagisawa M, Koyama Y, Otsuka K, et al. Optimal compressive force induces bone formation via increasing bone morphogenetic proteins production and decreasing their antagonists production by Saos-2 cells. *Life Sci* 2006; 78: 2697–2706
52. Gao Q, Zhang S, Jian X, Zeng Q, Ren L. Expression of epidermal growth factor and epidermal growth factor receptor in rat periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2002;37:294–296
53. Thilander B. Biological basis for orthodontic relapse. *Semin Orthod.* 2000;6:195-205.
54. Gianelly AA. Force-induced changes in the vascularity of the periodontal ligament. *Am J Orthod* 1969;55:5-11.
55. Quinn RS, Yoshikawa DK. A reassessment of force magnitude in orthodontics. *Am J Orthod* 1985;88:252-260.
56. Hixon EH, Aasen TO, Clark RA, Klosterman R, Miller SS, Odom WM. On force and tooth movement. *Am J Orthod* 1970;57:476-478.
57. Begg PR, Kesling PC. The differential force in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod* 1977;71:1-39.
58. Von Böhl M, Maltha J, Von den Hoff H, Kuijpers-Jagtman AM. Changes in the periodontal ligament after experimental tooth movement using high and low continuous forces in beagle dogs. *Angle Orthod.* 2004;74:16-25.
59. Davidovitch Z, Shanfeld JL. Cyclic AMP levels in alveolar bone of orthodontically treated cats. *Arch Oral Biol.* 1975;20:567-574.
60. D'Attilio M, Di Maio F, D'Arcangela C, Filippi MR, Felaco M, Lohinai Z, et al. Gingival endothelial and inducible nitric oxide synthase levels during orthodontic treatment: a cross sectional study. *Angle Orthod* 2004;74:851-858.
61. Storey E. Growth of remodelling of bone and bones. Role of genetics and function.. *Dent Clin North Am.* 1975;19:443-455.

62. Storey E. The nature of tooth movement, *Am. J. Orthod.* 1973;63:292-314.
63. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. Optimum force magnitude to orthodontic tooth movement: a systematic review. *Angle Orthod* 2003;73:86-92.
64. Khosla S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system, *Endocrinology* . 2001;142:5050–5.
65. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families, *Endocr. Rev.* 1999;20:345–57
66. Neves JS, Salmon CR, Omar NF, Narvaes EAO, Gomes JR, Novaes PD. Immunolocalization of CSF-1, RANKL and OPG in the enamel-related periodontium of the rat incisor and their implications for alveolar bone remodeling, *Arch. Oral. Biol.* 2009;54:651–57.
67. Yongchaitrakul T, Lertsirirangson K, Pavasant P, Human periodontal ligament cells secrete macrophage colony-stimulating factor in response to tumor necrosis factor-alpha in vitro, *J. Periodontol.* 2006;77:955–62.
68. Rhim EM, Ahn SJ, Kim JY, Chang YR, Kim KH, Lee HW, et al. Cryopreservation induces macrophage colony stimulating factor from human periodontal ligament cells in vitro. *Cryobiology.* 20013;67:156-62.
69. Graves DT, Alsulaimani F, Ding Y, Marks SC Jr. Developmentally Regulated Monocyte Recruitment and Bone Resorption Are Modulated by Functional Deletion of the Monocytic Chemoattractant Protein-1 Gene. *Bone.* 2002;31:282–87.
70. Huang XF, Zhao YB, Zhang FM, Han PY. Comparative study of gene expression during tooth eruption and orthodontic tooth movement in mice. *Oral Dis.* 2009;15:573-79
71. Wang CY, Stashenko P. The role of interleukin-1 alpha in the pathogenesis of periapical bone destruction in a rat model system. *Oral Microbiol Immunol* 1993; 8:50–6.
72. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Reinhardt RA, Petro TM. Human interleukin-1 beta and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Arch Oral Biol* 2001;46:185-9.

73. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interleukin-1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:226-40.
74. Svenson M, Nedergaard S, Heegaard PM, Whisenand TD, Arend WP, Bendtzen K. Differential binding of human interleukin-1 (IL-1) receptor antagonist to natural and recombinant soluble and cellular IL-1 type I receptors. *Eur J Immunol* 1995;25:2842-50.
75. Delima AJ, Karatzas S, Amar S, Graves DT. Inflammation and tissue loss caused by periodontal pathogens is reduced by interleukin-1 antagonists. *J Infect Dis* 2002;186:511-6.
76. Iglesias-Linares A, Yañez-Vico RM, Ballesta S, Ortiz-Ariza E, Mendoza-Mendoza A, Perea E, et al. Interleukin 1 gene cluster SNPs (rs1800587, rs1143634) influences post-orthodontic root resorption in endodontic and their contralateral vital control teeth differently. *Int Endod J* 2012;45:1018-26.
77. Newman WG. Possible etiologic factors in external root resorption. *Am J Orthod* 1975;67:522-39.
78. Harris EF, Kineret SE, Tolley EA. A heritable component for external apical root resorption in patients treated orthodontically. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1997;111:301-9.
79. Al-Qawasmi RA, Hartsfield JK Jr, Everett ET, Flury L, Foroud TM, Macri JV, et al. Genetic predisposition to external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2003; 123:242-52.
80. Bastos Lages EM, Drummond AF, Pretti H, Costa FO, Lages EJ, Gontijo AI et al. Association of functional gene polymorphism IL-1beta in patients with external apical root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2009;136:542-6.
81. Iwasaki LR, Gibson CS, Crouch LD, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. Speed of tooth movement is related to stress and IL-1 gene polymorphisms. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;130:698.e1-e9

82. Hurme M, Santtila S. IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) plasma levels are co-ordinately regulated by both IL-1Ra and IL-1beta genes. *Eur J Immunol* 1998;28:2598-602.
83. Danis VA, Millington M, Hyland VJ, Grennan D. Cytokine production by normal human monocytes: inter-subject variation and relationship to an IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) gene polymorphism. *Clin Exp Immunol* 1995;99:303-10.
84. Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996;87:2095-147.
85. Lossdorfer S, Gotz W, Jager A. Localization of IL-1alpha, IL-1 RI, TNF, TNF-RI and TNF-RII during physiological drift of rat molar teeth – an immunohistochemical and in situ hybridization study. *Cytokine* 2002; 20: 7–16.
86. Bletsa A, Berggreen E, Brudvik P. Interleukin-1alpha and tumor necrosis factor-alpha expression during the early phases of orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:423-9.
87. Iwasaki LR, Crouch LD, Tutor A, Gibson S, Hukmani N, Marx DB et al. Tooth movement and cytokines in gingival crevicular fluid and whole blood in growing and adult subjects. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2005;128:483–91.
88. Luppanapornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *Eur J Orthod.* 2010;32:596-601
89. Chen D, Zhao M, Mundy GR. Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors.* 2004;22:233-41
90. Díaz-Sánchez RM, Yañez-Vico RM, Fernández-Olavarría A, Mosquera-Pérez R, Iglesias-Linares A, Torres-Lagares D. Current approaches of bone morphogenetic proteins in dentistry. *J Oral Implantol.* 2013;31.
91. Wang EA, Rosen V, D'Alessandro JS, Bauduy M, Cordes P, Harada T, Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:2220-4.
92. King GN, Cochran DL. Factors that modulate the effects of bone morphogenetic protein-induced periodontal regeneration: a critical review. *J Periodontol.* 2002;73:925-36.

93. Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, Fausser JL, Haikel Y, Tenenbaum H. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research* 2000;79:1712–16.
94. Lisboa RA, Lisboa FA, de Castro Santos G, Andrade MV, Cunha-Melo JR. Matrix metalloproteinase 2 activity decreases in human periodontal ligament fibroblast cultures submitted to simulated orthodontic force. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2009;45:614–21.
95. Zheng L, Huang Y, Song W, Gong X, Liu M, Jia X, et al. Fluid shear stress regulates metalloproteinase-1 and 2 in human periodontal ligament cells: involvement of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and P38 signaling pathways. *J Biomech.* 2012;45:2368-75.
96. Strand C, Enell J, Hedenfalk I, Ferno M. RNA quality in frozen breast cancer samples and the influence on gene expression analysis—a comparison of three evaluation methods using micro- capillary electrophoresis traces. *BMC Mol Biol.* 2007;8:38.
97. Gimble JM, Zvonic S, Floyd ZE, Kassem M, Nuttall ME: Playing with bone and fat. *J Cell Biochem* 2006, 98:251-266.
98. Ireland D. Analysis of gene expression in bone by quantitative RT-PCR. *Methods Mol Med* 2003, 80:433-40.
99. Barbaric D, Dalla-Pozza L, Byrne JA. A reliable method for total RNA extraction from frozen human bone marrow samples taken at diagnosis of acute leukaemia. *J Clin Pathol* 2002, 55:865-67.
100. Opitz L, Salinas-Riester G, Grade M, Jung K, Jo P, Emons G, et al. Impact of RNA degradation on gene expression profiling. *BMC Med Genomics* 2010, 3:36.
101. Carter L.E, Kilroy G, Gimble JM, Floyd ZE. An improved method for isolation of RNA from bone. *BMC Biotechnology* 2012, 12:5.
102. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol* 2006, 7:3.

- 103.Kiewe P, Gueller S, Komor M, Stroux A, Thiel E, Hofmann WK. Prediction of qualitative outcome of oligonucleotide microarray hybridization by measurement of RNA integrity using the 2100 Bioanalyzer capillary electrophoresis system. *Ann Hematol.* 2009;88:1177–83.
- 104.Jones L, Goldstein DR, Hughes G, Strand AD, Collin F, Dunnett SB, et al. Assessment of the relationship between pre-chip and post-chip quality measures for Affymetrix GeneChip expression data. *BMC Bioinformatics.* 2006;7:211.
- 105.Harrington CA, Winther M, Garred MM. Use of bioanalyzer electropherograms for quality control and target evaluation in microarray expression profiling studies of ocular tissues. *J ocul biol dis inform.* 2009;2:243–9
- 106.Fan H, Hegde PS. The transcriptome in blood: challenges and solutions for robust expression profiling. *Curr Mol Med.* 2005;5:3–10.
- 107.Bonewald LF. Osteocytes as dynamic multifunctional cells. *Ann NY Acad Sci* 2007;1116:281-290.
- 108.Wang Y, McNamara LM, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for the role of integrins in flow induced mechanotransduction in osteocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:15941-15946.
- 109.Gluhak-Heinrich J, Pavlin D, Yang W, MacDougall M, Harris SE. MEPE expression in osteocytes during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol.* 2007;52:684-690.
- 110.Canalis E, Economides AN, Gaggero E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists, and the skeleton. *Endocr Rev.* 2003;24:218-235.
- 111.Narducci P, Nicolin V. Differentiation of activated monocytes into osteoclast-like cells on a hydroxyapatite substrate: an in vitro study. *Ann Anat.* 2009;191:349-355.
- 112.Yamashiro T, Fukunaga T, Kobashi N, Kamioka H, Nakanishi T, Takigawa M, et al. Mechanical stimulation induces CTGF expression in rat osteocytes. *J Dent Res.* 2001;80:461-465.
- 113.Sakai Y, Balam TA, Kuroda S, Tamamura N, Fukunaga T, Takigawa M, et al. CTGF and apoptosis in mouse osteocytes induced by tooth movement. *J Dent Res.* 2009;88:345-350.

114. Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006;169: 987-998.
115. Horowitz MC, Xi Y, Wilson K, Kacena MA. Control of osteoclastogenesis and bone resorption by members of the TNF family of receptors and ligands. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001;12:9-18.
116. Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci.* 1983;12:1-152.
117. Mogi M, Ootogoto J, Ota N, Togari A. Differential expression of RANKL and osteoprotegerin in gingival crevicular fluid of patients with periodontitis. *J Dent Res* 2004;83:166–169.
118. Yamaguchi M: RANK / RANKL / OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res* 2009;12:113–119
119. Fujita S, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthod Craniofac Res* 2008;11:143–55.
120. Holliday LS, Vakani A, Archer L, Dolce C. Effects of matrix metalloproteinase inhibitors on bone resorption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003;82:687-691.
121. Karsdal MA, Henriksen K, Sorensen MG, Gram J, Schaller S, Dziegiel MH et al. Acidification of the osteoclastic resorption compartment provides insight into the coupling of bone formation to bone resorption. *Am J Pathol* 2005;166:467–476.
122. Holliday LS, Ostrov DA, Wronski TJ, Dolce C: Osteoclast polarization and orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:105–112
123. Yamamoto M, Fisher JE, Gentile M, Seedor JG, Leu CT, Rodan SB et al. The integrin ligand echistatin prevents bone loss in ovariectomized mice and rats. *Endocrinology.* 1998;139:1411–1419.
124. Walsh MC, Kim N, Kadono Y, Rho J, Lee SY, Lorenzo J, et al. Osteoimmunology: interplay between the immune system and bone metabolism. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:33–63.

- 125.King GJ, Holtrop ME. Actin-like filaments in bone cells of cultured mouse calvaria as demonstrated by binding to heavy meromyosin. *J Cell Biol.* 1975;66:445–451.
- 126.Lakkakorpi PT, Väänänen HK. Cytoskeletal changes in osteoclasts during the resorption cycle. *Microsc Res Tech.* 1996;33:171–181.
- 127.Blair HC, Teitelbaum SL, Ghiselli R, Gluck S. Osteoclastic bone resorption by a polarized vacuolar proton pump. *Science.* 1989;245:855–857.
- 128.Breton S, Smith PJ, Lui B, Brown D. Acidification of the male reproductive tract by a proton pumping (H⁺)-ATPase. *Nat Med.* 1996;2:470–472.
- 129.Wagner CA, Finberg KE, Breton S, Marshansky V, Brown D, Geibel JP. Renal vacuolar H⁺-ATPase. *Physiol Rev.* 2004;84:1263-1314.
- 130.Lee BS, Gluck SL, Holliday LS. Interaction between vacuolar H⁽⁺⁾- ATPase and microfilaments during osteoclast activation. *J Biol Chem.* 1999;274:29164–29171.
- 131.Ericksen E, Moselkide L, Melsen F. Trabecular bone remodeling and balance in primary hyperparathyroidism. *Bone.* 1986;7:213- 221.
- 132.Hill PA. Bone remodeling. *Br J Orthod.* 1998;25:101-117.
- 133.Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. *Curr Opin Cell Biol.* 2004;16:700-707.
- 134.Keung AJ, Healy KE, Kumar S, Schaffer DV. Biophysics and dynamics of natural and engineered stem cell microenvironments. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* 2010;2:49-64.
- 135.Pazianos G, Uqoezwa M, Reya T. The elements of stem cell self-renewal: a genetic perspective. *Biotechniques.* 2003;35:1240-1247.
- 136.Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: stem cells and their niche. *Cell.* 2004;116:769-778.
- 137.Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong WG, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature.* 2003;425:836-841.
- 138.Graziano A, d'Aquino R, Laino G, Papaccio G. Dental pulp stem cells, a promising tool for bone regeneration. *Stem Cell Rev.* 2008;4:21-26.

139. Huang GT, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 2009;88:792-806.
140. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, et al. SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003;100:5807–5812.
141. Sonoyama W, Liu Y, Fang D, Yamaza T, Seo BM, Zhang C, et al. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in swine. *PLoS One.* 2006;1e79:1-8.
142. Huang GT, Sonoyama W, Liu Y, Liu H, Wang S, Shi S. The hidden treasure in apical papilla: the potential role in pulp/dentin regeneration and bioroot engineering. *J Endod.* 2008;34:645–651.
143. Shi S, Robey PG, Gronthos S. Comparison of human dental pulp and bone marrow stromal stem cells by cDNA microarray analysis. *Bone* 2001;29:532–539.
144. Gronthos S, Brahimi J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, et al. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res.* 2002;81:531-535.
145. Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S. Postnatal Human dental pulp stem cells (DPSC's) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;97:13625-13630.
146. Sloan AJ, Waddington RJ. Dental pulp stem cells: what, where, how?. *Int J Paediatr Dent.* 2009;19:61-70.
147. Ding G, Wang W, Liu Y, An Y, Zhang C, Shi S et al. Effect of cryopreservation on biological and immunological properties of stem cells from apical papilla. *J Cell Physiol.* 2010;223:415-422.
148. Takeda T, Tezuka Y, Horiuchi M, Hosono K, Iida K, Hatakeyama D, et al. Characterization of dental pulp stem cells of human tooth germs. *J Dent Res.* 2008;87:676-681.
149. Volponi AA, Pang Y and Sharpe PT. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends Cell Biol.* 2010;20:715-722.

150. Mori G, Centonze M, Brunetti G, Ballini A, Oranger A, Mori C, et al. Osteogenic properties of human dental pulp stem cells. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2010;24:167-175.
151. Huang, GT, Yamaza T, Shea LD, Djouad F, Kuhn NZ, Tuan RS, et al. Stem/Progenitor cell-mediated de novo regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an in vivo model. *Tissue Eng Part A*. 2010;16:605–615.
152. Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006;444:756-760.
153. Shin SY, Albert JS, Mortman RE. One step pulp revascularization treatment of an immature permanent tooth with chronic apical abscess: a case report. *Int Endod J*. 2009;42:1118-1126.
154. Zahrowski. JJ, Turley PK, Force magnitude effects upon osteoprogenitor cells during premaxillary expansion in rats. *Angle Orthod*. 1992;62,197-202.
155. Basdra EK, Komposch G. Osteoblast-like properties of human periodontal ligament cells: an in vitro analysis. *Eur J Orthod*. 1997;19:615-621.
156. Zentner A, Wieschollek JH, Heaney TG. Effects of mechanical stimulation on cell cycle duration in rat gingival fibroblast progenitor cells. *Eur J Oral Sci*. 2001;109:267-272.
157. Nayak BN, Wiltshire WA, Ganss B, Tenenbaum H, McCulloch CA, Lekic C. Healing of periodontal tissues following transplantation of cells in a rat orthodontic tooth movement model. *Angle Orthod*. 2008;78:826-831.
158. McCulloch CA, Bordin S. Role of fibroblast subpopulations in periodontal physiology and pathology. *J Periodontal Res*. 1991;26:144–154.
159. Rutherford RB, Ryan ME, Kennedy JE, Tucker MM, Charette MF. Platelet-derived growth factor and dexamethasone combined with a collagen matrix induce regeneration of the periodontium in monkeys. *J Clin Periodont*. 1993;20:537-544.
160. Yu H; de Vos P; Ren Y. Overexpression of osteoprotegerin promotes preosteoblast differentiation to mature osteoblasts. *Angle Orthod*. 2011;81:100-106.

161. Barnouti ZP, Owtad P, Shen G, Petocz P, Darendeliler MA. The biological mechanisms of PCNA and BMP in TMJ adaptive remodeling. *Angle Orthod.* 2011;81:91-99.
162. Rogers M, Gordon S, Benford H, Coxon F, Luckman S, Monkkonen J et al. Cellular and molecular mechanisms of action of bisphosphonates. *Cancer.* 2000;88:2961–2978.
163. Roelofs A, Thompson K, Gordon S, Rogers MJ. Molecular mechanisms of action of bisphosphonates: current status. *Clin Cancer Res.* 2006;20:6222–6230.
164. Sarin J, DeRossi S, Akintoye SO. Updates on bisphosphonates and potential pathobiology of bisphosphonate-induced jaw osteonecrosis. *Oral Dis* 2008;14:277–85.
165. Choi J, Baek SH, Lee JI, Chang YI. Effects of clodronate on early alveolar bone remodeling and root resorption related to orthodontic forces: A histomorphometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138:548.e1-8.
166. Adachi H, Igarashi K, Mitani H, Shinoda H. Effects of Topical Administration of a Bisphosphonate (Risedronate) on Orthodontic Tooth Movements in Rats. *J Dent Res.* 1994;73:1478-1484.
167. Igarashi K, Adachi H, Mitani H, Shinoda H. Inhibitory Effect of the Topical Administration of a Bisphosphonate (Risedronate) on Root Resorption Incident to Orthodontic Tooth Movement in Rats. *J Dent Res.* 1996;75:1644-1649.
168. Liu L, Igarashi K, Haruyama N, Saeki S, Shinoda H, Mitani H. Effects of local administration of clodronate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod.* 2004;26:469-473.
169. Sato Y, Sakai H, Kobayashi Y, Shibasaki Y, Sasaki T. Bisphosphonate administration alters subcellular localization of vacuolar-type H-ATPase and cathepsin K in osteoclasts during experimental movement of rat molars. *Anat Rec.* 2000;260:72–80.
170. Kaipatur NR, Wu Y, Adeeb S, Stevenson TR, Major PW, Doschak MR. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: a pilot study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;144:557-67
171. Toro EJ, Zuo J, Guitierrez A, La Rosa RL, Gawron AJ, Bradaschia-Correa V, et al. Bis-enoxacin Inhibits Bone Resorption and Orthodontic Tooth Movement *J Dent Res.* 2013;92:925-31

- 172.Migliorati C. Bisphosphonates and oral cavity avascular bone necrosis. *J Clin Oncol.* 2003;21:4253-54.
- 173.Sandy JR, Harris M. Prostaglandins and tooth movement. *Eur J Orthod.* 1984;6:175-82.
- 174.Arias OR, Marquez-Orozco MC. Aspirin, acetaminophen, and ibuprofen: their effects on orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:364-70.
- 175.Arantes GM, Arantes VM, Ashmawi HA, Posso IP. Tenoxicam controls pain without altering orthodontic movement of maxillary canines. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:14-19.
- 176.de Carlos F, Cobo J, Díaz-Esnal B, Arguelles J, Vijande M, Costales M. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129:402-06.
- 177.de Carlos F, Cobo J, Perillan C, Garcia MA, Arguelles J, Vijande M, et al. Orthodontic tooth movement after different coxib therapies. *Eur J Orthod.* 2007;29:596-99.
- 178.Hauber Gameiro G, Nouer DF, Pereira Neto JS, Siqueira VC, Andrade ED, Duarte Novaes P, et al. Effects of short- and long-term celecoxib on orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2008;78:860-65.
- 179.Karsten J, Hellsing E. Effect of phenytoin on periodontal tissues exposed to orthodontic force--an experimental study in rats. *Br J Orthod.* 1997;24:209-15.
- 180.Gonzales C, Hotokezaka H, Karadeniz EI, Miyazaki T, Kobayashi E, Darendeliler MA, et al. Effects of fluoride intake on orthodontic tooth movement and orthodontically induced root resorption. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:196-205
- 181.Hellsing E, Hammarström L. The effects of pregnancy and fluoride on orthodontic tooth movements in rats. *Eur J Orthod.* 1991;13:223-30
- 182.Meh A, Sprogar S, Vaupotic T, Cör A, Drevenšek G, Marc J, et al. Effect of cetirizine, a histamine (H(1)) receptor antagonist, on bone modeling during orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:323-9

183. Seifi M, Eslami B, Saffar AS. The effect of prostaglandin E2 and calcium gluconate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *Eur J Orthod.* 2003;25:199-204.
184. Gurton AU, Akin E, Sagdic D, Olmez H. Effects of PGI2 and TxA2 analogs and inhibitors in orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2004;74:526-532.
185. Chung CJ, Baik H, Soma K. Bone formation and tooth movement are synergistically enhanced by administration of EP4 agonist. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;132:427.e13-20.
186. Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med.* 1995;333:356-363.
187. Chiao JW, Moonga BS, Yang YM, Kancherla R, Mittelman A, Wu-Wong JR, et al. Endothelin-1 from prostate cancer cells is enhanced by bone contact which blocks osteoclastic bone resorption. *Br J Cancer.* 2000;83:360-365.
188. Stern PH, Tatrai A, Semler DE, Lee SK, Lakatos P, Strieleman PJ, et al. Endothelin receptors, second messengers, and actions in bone. *J Nutr.* 1995;125:2028S-2032S.
189. Sprogar S, Volk J, Drevensek M, Drevensek G. The effects of TBC3214, a selective endothelin ETA receptor antagonist, on orthodontic tooth movement in rats. *Eur J Orthod.* 2007;29:605-608.
190. Li F, Li G, Hu H, Liu R, Chen J, Zou S. Effect of parathyroid hormone on experimental tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;144:523-32
191. Salazar M, Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Albino CC, Nakamura Cuman RK. Effect of teriparatide on induced tooth displacement in ovariectomized rats: a histomorphometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:337-44.
192. Nilforoushan D, Shirazi M, Dehpour AR. The role of opioid systems on orthodontic tooth movement in cholestatic rats. *Angle Orthod.* 2002;72:476-480.
193. Han G, Chen Y, Hou J, Liu C, Chen C, Zhuang J, et al. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2010;138:550.e1-7.

- 194.Hodgson SF, Dickson ER, Wahner HW, Johnson KA, Mann KG, Riggs BL. Bone loss and reduced osteoblast function in primary cirrhosis. *Ann Inter Med.* 1985;103:855–860.
- 195.Akhoundi MS, Dehpour AR, Rashidpour M, Alaeddini M, Kharazifard MJ, Noroozi H. The effect of morphine on orthodontic tooth movement in rats.*Aust Orthod J.* 2010;26:113-8.
- 196.Brooks PJ, Heckler AF, Wei K, Gong SG.M-CSF accelerates orthodontic tooth movement by targeting preosteoclasts in mice.*Angle Orthod.* 2011;81:277-83.
- 197.Davila JE, Miller JR, Hodges JS, Beyer JP, Larson BE. Effect of neonatal capsaicin treatment on orthodontic tooth movement in male Sprague-Dawley rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:345-52.)
- 198.Wilcko WM, Wilcko MT, Bouquot JE, Ferguson DJ. Rapid orthodontics with alveolar reshaping: two case reports of decrowding. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2001;21:9-19.
- 199.Frost HM. The regional acceleratory phenomenon: a review. *Henry Ford Hosp Med J.* 1983;31:3-9.
- 200.Murphy KG, Wilcko MT, Wilcko WM, Ferguson DJ Periodontal accelerated osteogenic orthodontics: a description of the surgical technique. *J Oral Maxillofac Surg.* 2009;67:2160-2166.
201. Shin MS, Norrdin RW. Regional accelerated of remodeling during healing of bonedefect in beagles of various ages. *Bone* 1985;6:377-379.
- 202.Bolander ME. Regulation of fracture repair by growth factors. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1992;200:165-70.
- 203.Sebaoun JD, Kantarci A, Turner JW, Carvalho RS, Van Dyke TE, Ferguson DJ. Modeling of trabecular bone and lamina dura following selective alveolar decortication in rats. *J Periodontol.* 2008;79:1679-1688.
- 204.Goyal S. The history of orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:696-697.

- 205.Köle H. Surgical operations on the alveolar ridge to correct occlusal abnormalities. *Oral Surg Oral Med Ora Pathol.* 1959;12: 515-529.
- 206.Bell WH, Levy BM. Regularization and bone healing after posterior maxillary osteotomy. *J Oral Surgery.* 1971;29:313-320.
- 207.Düker J. Experimental animal research into segmental alveolar movement after corticotomy. *J Maxillofac Surg.* 1975;3:81-84.
- 208.Mossaz CF, Byloff FK, Richter M. Unilateral and bilateral corticotomies for correction of maxillary transverse discrepancies. *Eur J Orthod.* 1992;14:110-116.
- 209.Kerdvongbundit V. Corticotomy-facilitated orthodontics. *J Dent Assoc Thai.* 1990;30: 284-291.
- 210.Liou EJ, Huang CS. Rapid canine retraction through distraction of the periodontal ligament. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 1998;114:372-382.
- 211.Wilcko MT, Wilcko WM, Murphy KG, Carroll WJ, Ferguson DJ, Miley DD, et al. Full-thickness flap/subepithelial connective tissue grafting with intramarrow penetrations: three case reports of lingual root coverage. *Int J Periodontics Restorative Dent.* 2005; 25:561-569.
- 212.Lee W, Karapetyan G, Moats R, Yamashita DD, Moon HB, Ferguson DJ, et al. Corticotomy-/Osteotomy-assisted Tooth Movement microCTs Differ. *J Dent Res.* 2008;87: 861-867.
- 213.Wang L, Lee W, Lei DL, Liu YP, Yamashita DD, Yen SL. Tissue responses in corticotomy- and osteotomy-assisted tooth movements in rats: histology and immunostaining. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136:770.e1-11.
- 214.Iino S, Sakoda S, Ito G, Nishimori T, Ikeda T, Miyawaki S. Acceleration of orthodontic tooth movement by alveolar corticotomy in the dog. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2007;131:448.e1-8.
- 215.Mostafa YA, Mohamed Salah Fayed M, Mehanni S, ElBokle NN, Heider AM. Comparison of corticotomy-facilitated vs standard tooth-movement techniques in dogs with miniscrews as anchor units. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136:570-7.

- 216.Sanjideh PA, Rossouw PE, Campbell PM, Opperman LA, Buschang PH. Tooth movements in foxhounds after one or two alveolar corticotomies. *Eur J Orthod.* 2010;32:106-13.
- 217.Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres I, Liu Y, Thant LM, et al. Cytokine expression and accelerated tooth movement. *J Dent Res.* 2010;89: 1135-41.
- 218.Baloul SS, Gerstenfeld LC, Morgan EF, Carvalho RS, Van Dyke TE, Kantarci A. Mechanism of action and morphologic changes in the alveolar bone in response to selective alveolar decortication-facilitated tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:S83-101
- 219.Fischer TJ. Orthodontic treatment acceleration with corticotomy-assisted exposure of palatally impacted canines. *Angle Orthod.* 2007;77:417-20
- 220.Aboul-Ela SM, El-Beialy AR, El-Sayed KM, Selim EM, El-Mangoury NH, Mostafa YA. Miniscrew implant-supported maxillary canine retraction with and without corticotomy-facilitated orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:252-9.
- 221.Alikhani M, Raptis M, Zoldan B, Sangsuwon C, Lee YB, Alyami B, et al. Effect of micro-osteoperforations on the rate of tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;144:639-48.
- 222.Kim YS, Kim SJ, Yoon HJ, Lee PJ, Moon W, Park YG. Effect of piezopuncture on tooth movement and bone remodeling in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;144:23-31.
- 223.Krook L, Whalen JP, Lesser GV, Berens DL. Experimental studies on osteoporosis. *Methods Achiev Exp Pathol.* 1975;7:72-108.
- 224.Codivilla A. On the means of lengthening, in the lower limbs, the muscles and tissues which are shortened through deformity. *Clin Orthop Relat Res.* 1994;301:4-9.
- 225.Ilizarov GA. The principles of the Ilizarov method, 1988. *Bull Hosp Jt Dis* 1999;56:49-53.

- 226.Liou EJ, Figueroa AA, Polley JW. Rapid orthodontic tooth movement into newly distracted bone after mandibular distraction osteogenesis in a canine model. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2000;117:391-398.
- 227.Işeri H, Kişnişci R, Bzizi N, Tüz H. Rapid canine retraction and orthodontic treatment with dentoalveolar distraction osteogenesis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2005;127:533-541.
- 228.Kumar PS, Saxena R, Patil S, Keluskar KM, Nagaraj K, Kotrashetti SM. Clinical investigation of periodontal ligament distraction osteogenesis for rapid orthodontic canine retraction. *Aust Orthod J.* 2009;25:147-152.
- 229.Kharkar VR, Kotrashetti SM. Transport dentoalveolar distraction osteogenesis-assisted rapid orthodontic canine retraction. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;109:687-693.
- 230.Häsler R, Schmid G, Ingervall B, Gebauer U. A clinical comparison of the rate of maxillary canine retraction into healed and recent extraction sites--a pilot study. *Eur J Orthod.* 1997;19:711-719.
- 231.Costantino PD, Shybut G, Friedman CD, Pelzer HJ, Masini M, Shindo ML, et al. Segmental mandibular regeneration by distraction osteogenesis. An experimental study. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1990;116: 535-545.
- 232.Yoshida T, Yamaguchi M, Utsunomiya T, Kato M, Arai Y, Kaneda T, et al. Low-energy laser irradiation accelerates the velocity of tooth movement via stimulation of the alveolar bone remodeling. *Orthod Craniofac Res* 2009;12:289–98
- 233.Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H et al. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v) beta(3) integrin in rats. *Eur J Orthod* 2010;32:131–9
- 234.Silva Sousa MV, Scanavini MA, Sannomiya EK, Velasco LG, Angelieri F. Influence of Low-Level Laser on the Speed of Orthodontic Movement. *Photomed Laser Surg.* 2011; 29: 191–6

- 235.Kawasaki K, Shimizu N. Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers Surg Med.* 2000;26:282–291.
- 236.Turhani D, Scheriau M, Kapral D, Benesch T, Jonke E, Bantleon HP. Pain relief by single low-level laser irradiation in orthodontic patients undergoing fixed appliance therapy. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:371-377.
- 237.Kim YD, Kim SS, Kim SJ, Kwon DW, Jeon ES, Son WS. Low-level laser irradiation facilitates fibronectin and collagen type I turnover during tooth movement in rats. *Lasers Med Sci.* 2010;25:25-31.
- 238.Abi-Ramia LB, Stuani AS, Stuani AS, Stuani MB, Mendes Ade M. Effects of low-level laser therapy and orthodontic tooth movement on dental pulps in rats. *Angle Orthod.* 2010;80:116-122.
- 239.Limpanichkul W, Godfrey K, Srisuk N, Rattanayatikul C. Effects of low-level laser therapy on the rate of orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofacial Res.* 2006;9:38–43.
- 240.Kim SJ, Moon SU, Kang SG, Park YG. Effects of low-level laser therapy after Corticision on tooth movement and paradental remodeling. *Lasers Surg Med.* 2009;41:524-533.
- 241.Fujiyama K, Deguchi T, Murakami T, Fujii A, Kushima K, Takano-Yamamoto T. Clinical effect of CO(2) laser in reducing pain in orthodontics. *Angle Orthod.* 2008;78:299-303.
- 242.Gama S, Habib FAL, Carvalho-Monteiro JS, PAraguassu GM, Martins-Araujo T, Cangussu MCT et al. Tooth Movement After Infrared Laser Phototherapy: Clinical Study in Rodents *Photomed Laser Surg* 2010;28:S79–S83
- 243.Youssef M, Ashkar S, Hamade E, Gutknecht N, Lampert F, Mir M. The effect of low-level laser therapy during orthodontic movement: a preliminary study. *Lasers Med Sci.* 2008;23:27–33
- 244.Marquezan M, Bolognese AM, Araujo MT. Effects of Two Low-Intensity Laser Therapy Protocols on Experimental Tooth Movement. *Photomed Laser Surg* 2010;28:757–62

245. Duan J, Na Y, Liu Y, Zhang Y. Effects of the pulse frequency of low-level laser therapy on the tooth movement speed of rat molars. *Photomed Laser Surg.* 2012;30:663-7.
246. Genc G, Kocadereli I, Tasar F, Kilinc K, El S, Sarkarati B. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci.* 2013;28:41-7.
247. Linder-Aronson S, Lindskog S. A morphometric study of bone surface and skin reactions after stimulation with static magnetic fields in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1991;99:44-48.
248. Darendeliler MA, Sinclair PM, Kusy RP. The effects of samarium-cobalt magnets and pulsed electromagnetic fields on tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995;107:578-588.
249. Linder-Aronson A, Forsberg CM, Rygh P, Lindskog S. Tissue response to space closure in monkeys: a comparison of orthodontic magnets and superelastic coil springs. *Eur J Orthod.* 1996;18:581-588.
250. Roberts WE, Goodwin Ec, Heiner SR. Cellular response to orthodontic force. *Den Clin North Am* 1981;25:3-16.
251. Tengku BS, Joseph K, Harbrow D, Taverne AAR, Symons AL. Effect of a static magnetic field on orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod.* 2000; 22:475-87
252. Kanzaki H, Chiba M, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, Mitani H. Local OPG gene transfer to the periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2004; 83: 920–925.
253. Kanzaki K, Chiba M, Arai K, Takahashi I, Haruyama N, Nishimura M, et al. Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Ther.* 2006;13:678–685.
254. Iglesias-Linares A, Moreno-Fernández AM, Yañez-Vico R, Solano-Reina E. Aplicación clínica de la terapia génica al movimiento dentario ortodóncico. Comparativa frente a la corticotomía alveolar. *Ortod. Esp.* 2010;50:363-372.

255. Lee DY, Cho TJ, Lee HR, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, et al. Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. *Bone*. 2010;46:673-679.
256. Liu W, Wu RD, Dong YL, Gao YM. Neuroepithelial stem cells differentiate into neuronal phenotypes and improve intestinal motility recovery after transplantation in the aganglionic colon of the rat. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19:1001-9
257. Liberati AI, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*. 2009;339:b2700.
258. National Health Service (NHS) Center for Reviews and Dis-semination. Report Number 4 (2nd ed.). *Undertaking Systematic Reviews of Research on Effectiveness*. University of York: York Publishing Services Ltd; March 2001.
259. Chen SS, Greenlee GM, Kim JE, Smith CL, Huang GJ. Systematic review of self-ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:726.e1-18.
260. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement- a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod*. 2004;26:483-490.
261. Amarilio R, Viukov SV, Sharir A, Eshkar-Oren I, Johnson RS, Zelzer E. HIF1 α regulation of Sox9 is necessary to maintain differentiation of hypoxic prechondrogenic cells during early skeletogenesis. *Development*. 2007;134:3917-2
262. Yang DC, Yang MH, Tsai CC, Huang TF, Chen YH, et al. Hypoxia Inhibits Osteogenesis in Human Mesenchymal Stem Cells through Direct Regulation of RUNX2 by TWIST. *Plos One*. 2001;6: e23965
263. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol*. 2002;18;3:RESEARCH0034
264. Smyth GK. Linear models and empirical Bayes for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol*. 2004;3:3.

265. Livak KJ, Schmittgen TD Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25:402-8.
266. Bang H, Davidian M. Experimental statistics for biological sciences. *Methods Mol Biol*. 2010;620:3-104.
267. Altan BA, Sokucu O, Ozkut MM, Inan S. Metrical and histological investigation of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci* 2012;27:131-40.
268. Doshi-Meta G, Bhad-Patil WA. Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012;141:289-97.
269. Chen RY, Fu MM, Chih YK, Gau CH, Chiang CY, Nieh S et al. Effect of cyclosporine-A on orthodontic tooth movement in rats. *Orthod Craniofac Res* 2011;14:234-42.
270. Karadeniz EI, Gonzales C, Elekdag-Turk S, Isci D, Sahin-Sagalm AM, Alkis H, et al. The effect of fluoride on orthodontic tooth movement in humans. A two- and three-dimensional evaluation. *Aust Orthod J* 2011;27:94-101.
271. McGorray SP, Dolce C, Kramer S, Stewart D, Wheeler TT. A randomized, placebo-controlled clinical trial on the effects of recombinant human relaxin on tooth movement and short-term stability. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2012;141:196-203.
272. Iglesias-Linares A, Yañez-Vico RM, Moreno-Fernandez AM, Mendoza-Mendoza A, Solano-Reina E. Corticotomy-assisted orthodontic enhancement by bone morphogenetic protein-2 administration. *J Oral Maxillofac Surg* 2012;70:e124-32.
273. Sirosoontoon I, Hotokezaka H, Hashimoto M, Gonzales C, Luppapanornlap S, Darendeliler MA, et al. Orthodontic tooth movement and root resorption in ovariectomized rats treated by systemic administration of zoledronic acid. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2012 May;141:563-73.
274. Hao X, Hua Y. Influence of dose, dose interval and administration route of recombinant human soluble tumour necrosis factor receptor type I on orthodontic tooth movement in rats. *Arch Oral Biol* 2011;56:1528-40.

275. Yoshimatsu M, Kitaura H, Fujimura Y, Kohara H, Morita Y, Eguchi T, et al. Inhibitory effects of IL-12 on experimental tooth movement and root resorption in mice. *Arch Oral Biol* 2012;57:36-43.
276. Sodagar A, Donyavi Z, Arab S, Kharrazifard MJ. Effect of nicotine on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2011;139:e261-5.
277. Yabumoto T, Miyazawa K, Tabuchi M, Shoji S, Tanaka M, Kadota M, et al. Stabilization of tooth movement by administration of reveromycin A to osteoprotegerin-deficient knockout mice. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144:368-80.
278. Kondo M, Kondo H, Miyazawa K, Goto S, Togari A. Experimental tooth movement-induced osteoclast activation is regulated by sympathetic signaling. *Bone*. 2013;52:39-47
279. Wilcko W, Wilcko MT. Accelerating tooth movement: the case for corticotomy-induced orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144:4-12
280. Wilcko MT, Wilcko WM, Bissada NF. An evidence-based analysis of periodontally accelerated orthodontic and osteogenic techniques: a synthesis of scientific perspectives. *Semin Orthod* 2008;14:305-16.)
281. Mathews DP, Kokich VG Accelerating tooth movement: the case against corticotomy-induced orthodontics. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144:5-13.
282. Zhao N, Liu Y, Kanzaki H, Liang W, Ni J, Lin J. Effects of local osteoprotegerin gene transfection on orthodontic root resorption during retention: an in vivo micro-CT analysis. *Orthod Craniofac Res*. 2012;15:10-20
283. Ezashi T, Das P, Roberts RM. Low O₂ tensions and the prevention of differentiation of hES cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:4783-88
284. Gustafsson MV, Zheng X, Pereira T, Gradin K, Jin S., Lundkvist J et al. Hypoxia requires notch signaling to maintain the undifferentiated cell state. *Dev Cell* 2005;9:617-28.

285. Yun Z, Maecker HL, Johnson RS, Giaccia AJ. Inhibition of PPAR gamma 2 gene expression by the HIF-1-regulated gene DEC1/Stra13: a mechanism for regulation of adipogenesis by hypoxia. *Dev Cell* 2002;2:331-41.
286. Salim A, Nacamuli RP, Morgan EF, Giaccia AJ, Longaker MT. Transient changes in oxygen tension inhibit osteogenic differentiation and Runx2 expression in osteoblasts. *J Biol Chem* 2004;279:40007-16
287. Studer L, Csete M, Lee SH, Kabbani N, Walikonis J, Wold B et al. Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen. *J Neurosci* 2000;20:7377- 83
288. Ramirez-Bergeron DL, Runge A, Dahl KD, Fehling HJ, Keller G, Simon MC. Hypoxia affects mesoderm and enhances hemangioblast specification during early development. *Development*.2004;131:4623-34.
289. Maltepe E, Schmidt JV, Baunoch D, Bradfield CA, Simon MC. Abnormal angiogenesis and responses to glucose and oxygen deprivation in mice lacking the protein ARNT. *Nature*.1997;386:403-07.
290. Rodesch F, Simon P, Donner C, Jauniaux E. Oxygen measurements in endometrial and trophoblastic tissues during early pregnancy. *Obstet Gynecol*.1992;80:283-85.)
291. Hogan KA, Ambler CA, Chapman DL, Bautch VL. The neural tube patterns vessels developmentally using the VEGF signaling pathway. *Development*. 2004;131:1503-13.
292. Ambati BK, Nozaki M, Singh N, Takeda A, Jani PD, Suthar T, et al. Corneal avascularity is due to soluble VEGF receptor-1. *Nature*. 2006;443:993-97.)
293. Hallmann R, Feinberg RN, Latker CH, Sasse J, Risau W. Regression of blood vessels precedes cartilage differentiation during chick limb development. *Differentiation*. 1987;34:98-105
294. Olsen BR, Reginato AM, Wang W. Bone development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2000;16:191-220.
295. Kronenberg HM. Developmental regulation of the growth plate. *Nature*. 2003;423:332-36.

296. Seemann P, Schwappacher R, Kjaer KW, Krakow D, Lehmann K, Dawson K, et al. Activating and deactivating mutations in the receptor interaction site of GDF5 cause symphalangism or brachydactyly type A2. *J. Clin Invest.* 2005;115:2373-81.
297. Akiyama H, Chaboissier MC, Martin JF, Schedl A, de Crombrughe B. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6. *Genes Dev.* 2002;16:2813-28.
298. Smits P, Li P, Mandel J, Zhang Z, Deng JM, Behringer RR, et al. The transcription factors L-Sox5 and Sox6 are essential for cartilage formation. *Dev Cell.* 2001;1:277-80
299. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1, master regulator of O₂ homeostasis. *Curr Opin Genet Dev.* 1998;8:588-94.
300. Schofield CJ, Ratcliffe PJ. Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2004;5:343-54
301. Vogt MT, Cauley JA, Kuller LH, Nevitt MC. Bone mineral density and blood flow to the lower extremities: the study of osteoporotic fractures. *J Bone Miner Res.* 1997;12:283-89.
302. Hiraga T, Kizaka-Kondoh S, Hirota K, Hiraoka M, Yoneda T. Hypoxia and hypoxia-inducible factor-1 expression enhance osteolytic bone metastases of breast cancer. *Cancer Res.* 2007;67: 4157-63.
303. Hung SC, Pochampally RR, Hsu SC, Sanchez C, Chen SC, Spees J, et al. Short-term exposure of multipotent stromal cells to low oxygen increases their expression of CX3CR1 and CXCR4 and their engraftment in vivo. *Plos One.* 2007;2: e416.
304. Webster WS, Abela D. The effect of hypoxia in development. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2007;81: 215-28
305. Chang HH, Wu CB, Chen YJ, Weng CY, Wong WP, Chen YJ, et al. MMP-3 response to compressive forces in vitro and in vivo. *J Dent Res.* 2008;87:692-6.
306. Arai C, Nomura Y, Ishikawa M, Noda K, Choi JW, Yashiro Y, et al. HSPA1A is upregulated in periodontal ligament at early stage of tooth movement in rats. *Histochem Cell Biol.* 2010;134:337-43.

307. Wescott DC, Pinkerton MN, Gaffey BJ, Beggs KT, Milne TJ, Meikle MC. Osteogenic gene expression by human periodontal ligament cells under cyclic tension. *J Dent Res*. 2007;86:1212-6.
308. Li Y, Li M, Tan L, Huang S, Zhao L, Tang T, et al. Analysis of time-course gene expression profiles of a periodontal ligament tissue model under compression. *Arch Oral Biol*. 2013;58:511-22.
309. Sakimoto S1, Kidoya H, Kamei M, Naito H, Yamakawa D, Sakaguchi H, et al. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. *PLoS One*. 2013;8:e58096.
310. Rage F, Boulisfane N, Rihan K, Neel H, Gostan T, Bertrand E, et al. Genome-wide identification of mRNAs associated with the protein SMN whose depletion decreases their axonal localization. *RNA*. 2013;19:1755-66.
311. Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol*. 2006;24:1151-61.
312. Pomeroy R, Duncan G, Sunar-Reeder B, Ortenberg E, Ketchum M, Wasiluk H, et al. A low-cost, high-throughput, automated single nucleotide polymorphism assay for forensic human DNA applications. *Anal Biochem*. 2009;395:61-7
313. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC Biotechnol* 2007.29;7:36
314. Glud M, Klausen M, Gniadecki R, Rossing M, Hastrup N, Nielsen FC, Drzewiecki KT. MicroRNA expression in melanocytic nevi: the usefulness of formalin-fixed, paraffin-embedded material for miRNA microarray profiling. *J Invest Dermatol* 2009, 129:1219-24
315. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, et al. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *Rna* 2007, 13:1668-74

316. Masuda N, Ohnishi T, Kawamoto S, Monden M, Okubo K. Analysis of chemical modification of RNA from formalin-fixed samples and optimization of molecular biology applications for such samples, *Nucleic Acids Res.* 1999;27:4436–43.
317. Ibberson D, Benes V, Muckenthaler MU, Castoldi M. RNA degradation compromises the reliability of microRNA expression profiling. *BMC Biotechnol.* 2009;9:102.
318. Roberts L, Bowers J, Sensinger K, Lisowski A, Getts R, Anderson MG. Identification of methods for use of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples in RNA expression profiling. *Genomics.* 2009;94:341-8.
319. Goff LA, Bowers J, Schwalm J, Howerton K, Getts RC, Hart RP. Evaluation of sense-strand mRNA amplification by comparative quantitative PCR, *BMC Genomics.* 2004;5:76.)
320. Linton KM, Hey Y, Saunders E, Jeziorska M, Denton J, Wilson CL, et al. Acquisition of biologically relevant gene expression data by Affymetrix microarray analysis of archival formalin-fixed paraffin-embedded tumours, *Br. J. Cancer* 2008;98:1403–14.
321. Oberli A, Popovici V, Delorenzi M, Baltzer A, Antonov J, Matthey S, et al. Expression profiling with RNA from formalin-fixed, paraffin-embedded material, *BMC Med. Genomics* 2008;1:9.
322. Hatzis C, Sun H, Yao H, Hubbard RE, Meric-Bernstam F, Babiera GV et al. Effects of tissue handling on RNA integrity and microarray measurements from resected breast cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2011;103:1871-83.
323. Viljoen KS, Blackburn JM. Quality assessment and data handling methods for Affymetrix Gene 1.0 ST arrays with variable RNA integrity. *BMC Genomics.* 2013;14:14.
324. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis *Front Oral Biol.* 2012;15:117–32.
325. Xie R, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Inflammatory responses in two commonly used rat models for experimental tooth movement: comparison with ligature-induced periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2011; 56:159–67

9. ANEXOS

9.1. Comité Ético de Experimentación Animal



A quien pueda interesar:

El Comité Ético de Experimentación de la Universidad de Sevilla, habiendo examinado el Proyecto “REGULACIÓN GÉNÉTICA DE LA ACELERACIÓN BIOLÓGICA DEL MOVIMIENTO DENTARIO ORTODÓNICO” presentado por D. Alejandro Iglesias Linares / D. Enrique Solano Reina emite el siguiente informe,

El proyecto cumple los requisitos exigidos para experimentación en sujetos humanos y en animales, y se ajusta a las normativas vigentes en España y en la Unión Europea.

Sevilla, a 05 de septiembre de 2013.

EL PRESIDENTE DEL COMITE,

Fdo.: Prof. Dr. Francisco Javier Vitorica Ferrandez.

Por autorización Fernando Rodríguez Fernández

9.2. Lista completa de genes para Taqman® Array.

Assay ID	Symbol	Gene Name(s)	Sp	AL	3'	Most
Rn00562020	_Hnf1a	HNF1 homeobox A;rCG21241 Celera Annotation	Rat	58	No	
Rn00564115	_Fgf10	fibroblast growth factor 10;rCG44485 Celera Annotation	Rat	148	Yes	
Rn00564986	_Kdr	rCG56984 Celera Annotation;kinase insert domain receptor	Rat	75	No	
Rn00432095	_Bmp6	bone morphogenetic protein 6;rCG44084 Celera Annotation	Rat	122	No	
Rn00567818	_Bmp2	bone morphogenetic protein 2;rCG26259 Celera Annotation	Rat	126	Yes	
Rn01505115	_Ptk2	rCG59947 Celera Annotation;PTK2 protein tyrosine kinase 2	Rat	81	No	
Rn01481891	_Tbx5	rCG21929 Celera Annotation;T-box 5	Rat	66	Yes	
Rn01452786	_Smurf2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2;rCG32651 Celera	Rat	60	No	
Rn01412801	_Smurf1	rCG42768 Celera Annotation;SMAD specific E3 ubiquitin prot	Rat	79	No	
Rn01512298	_Runx2	runt-related transcription factor 2;rCG43725 Celera Annotati	Rat	86	No	
Rn00572010	_Tgfb1	transforming growth factor, beta 1;rCG53954 Celera Annotat	Rat	65	No	
Rn01775230	_Gdf7	rCG61691 Celera Annotation;growth differentiation factor 7	Rat	113	Yes	
Rn01774648	_Ins2	rCG48472 Celera Annotation;insulin 2	Rat	148	Yes	
Rn01639253	_Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A;r	Rat	79	No	
Rn01532129	_Pou5f1	rCG41815 Celera Annotation;POU class 5 homeobox 1	Rat	59	No	
Rn00570083	_Gdf15	growth differentiation factor 15;rCG38685 Celera Annotati	Rat	80	Yes	
Rn00432087	_Bmp4	bone morphogenetic protein 4;rCG61245 Celera Annotation	Rat	61	Yes	
Rn01442797	_Gdf6	rCG30387 Celera Annotation;growth differentiation factor 6	Rat	109	Yes	
Rn01470643	_Wnt3a	wingless-type MMTV integration site family, member 3A;rCG	Rat	76	Yes	
Rn01751069	_Sox9	SRY-box containing gene 9;rCG33659 Celera Annotation	Rat	60	Yes	
Rn01286286	_Sox2	SRY (sex determining region Y)-box 2;rCG41622 Celera Annot	Rat	93	Yes	
Rn01747593	_Hat1	histone acetyltransferase 1;rCG27376 Celera Annotation	Rat	110	No	
Rn00570593	_Smad4	SMAD family member 4;rCG46674 Celera Annotation	Rat	101	No	
Rn01511082	_Itgax	integrin, alpha X;rCG40584 Celera Annotation	Rat	64	No	
Rn01409457	_Tert	telomerase reverse transcriptase;rCG42133 Celera Annotati	Rat	61	No	
Rn00488400	_Sox6	rCG39741 Celera Annotation;SRY (sex determining region Y)-	Rat	102	Yes	
Rn00570809	_Fgf2	fibroblast growth factor 2;rCG41541 Celera Annotation	Rat	63	No	
Rn01492418	_Sox5	rCG29852 Celera Annotation;SRY-box containing gene 5	Rat	65	No	
Rn00563924	_Cd44	rCG26920 Celera Annotation;Cd44 molecule	Rat	81	No	
Rn00576900	_Mcam	rCG58053 Celera Annotation;melanoma cell adhesion molecu	Rat	84	No	
Rn00561634	_Ngfr	nerve growth factor receptor;rCG34900 Celera Annotation	Rat	60	No	
Rn00665212	_Nt5e	rCG25342 Celera Annotation;5' nucleotidase, ecto	Rat	62	No	
Rn00596271	_Fzd9	rCG21444 Celera Annotation;frizzled family receptor 9	Rat	97	Yes	
Rn00573633	_Fut4	rCG31771 Celera Annotation;fucosyltransferase 4 (alpha (1,3	Rat	88	Yes	
Rn00709573	_Pdgfrb	platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide;rC	Rat	53	No	
Rn00578763	_Anpep	alanyl (membrane) aminopeptidase;rCG24850 Celera Annot	Rat	130	No	
Rn01438763	_Eng	rCG45763 Celera Annotation;endoglin	Rat	81	No	
Rn00565571	_Anxa5	annexin A5;rCG41316 Celera Annotation	Rat	115	No	
Rn00563902	_Casp3	caspase 3;rCG59027 Celera Annotation	Rat	93	No	
Rn00563627	_Vcam1	vascular cell adhesion molecule 1;rCG28459 Celera Annotati	Rat	90	No	
Rn00562048	_Thy1	rCG58326 Celera Annotation;Thy-1 cell surface antigen	Rat	74	No	
Rn00572720	_Prom1	rCG35777 Celera Annotation;prominin 1	Rat	57	No	
Rn00582112	_Alcam	rCG52539 Celera Annotation;activated leukocyte cell adhesi	Rat	78	Yes	
Rn01456850	_Csf2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage);rCG33	Rat	136	No	
Rn01512708	_Itga6	rCG26750 Celera Annotation;integrin, alpha 6	Rat	53	No	
Rn00566561	_Erbb2	rCG33478 Celera Annotation;v-erb-b2 erythroblastic leukemi	Rat	74	No	
Rn01461447	_Csf3	rCG33571 Celera Annotation;colony stimulating factor 3 (gra	Rat	63	No	
Rn00566386	_Bglap	rCG62555 Celera Annotation;bone gamma-carboxyglutamat	Rat	104	Yes	
Rn00564227	_Icam1	rCG31814 Celera Annotation;intercellular adhesion molecule	Rat	61	Yes	
Rn00710461	_Nudt6	rCG41574 Celera Annotation;nudix (nucleoside diphosphate	Rat	142	No	

Rn01402898_1Sh2d4a	SH2 domain containing 4A;rCG54685 Celera Annotation	Rat	97	No
Rn00821446_1Bnip3	rCG47375 Celera Annotation;BCL2/adenovirus E1B interactin	Rat	60	No
Rn01519308_1Hdac1	histone deacetylase 1;rCG31110 Celera Annotation	Rat	72	No
Rn00821653_1Bnip3l	BCL2/adenovirus E1B interacting protein 3-like;rCG52176 Cel	Rat	63	Yes
Rn03993554_1Ier3	immediate early response 3;rCG41772 Celera Annotation	Rat	87	No
Rn01476978_1Usf2	rCG54424 Celera Annotation;upstream transcription factor 2	Rat	72	No
Rn00567331_1Slc2a3	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), mem	Rat	99	Yes
Rn00583975_1Pkm2	rCG57843 Celera Annotation;pyruvate kinase, muscle	Rat	76	Yes
Rn00584155_1Bhlhe40	basic helix-loop-helix family, member e40;rCG56541 Celera	Rat	107	Yes
Rn00821420_1Pgam1	phosphoglycerate mutase 1 (brain);rCG57464 Celera Annota	Rat	131	No
Rn00566132_1Pfk1	rCG60594 Celera Annotation;phosphofructokinase, liver	Rat	89	No
Rn01474701_1Tfrc	rCG52708 Celera Annotation;transferrin receptor	Rat	101	No
Rn01417099_1Slc2a1	rCG50369 Celera Annotation;solute carrier family 2 (facilitate	Rat	73	No
Rn01413048_1Pgm2	rCG56901 Celera Annotation;phosphoglucomutase 2	Rat	58	No
Rn01487769_1Pfkp	phosphofructokinase, platelet;rCG55922 Celera Annotation	Rat	76	No
Rn01769545_1LOC6870C	rCG62241 Celera Annotation;histone deacetylase 9;similar to	Rat	82	No
Rn00821155_1Tpi1	rCG29914 Celera Annotation;triosephosphate isomerase 1	Rat	55	No
Rn00821325_1Vdac1	rCG32855 Celera Annotation;voltage-dependent anion chan	Rat	112	Yes

9.3. Informe de calidad del ARN

