



TRABAJO DE FIN DE GRADO

“Regulación del movimiento dentario ortodóncico mediante células madre”

Autora: Paula Aceytuno Poch

Director: Enrique Solano Reina

Grado en Odontología

Facultad de Odontología

Universidad de Sevilla

Curso Académico: 2017/2018



DR. ENRIQUE SOLANO REINA, catedrático de ortodoncia del Departamento de Estomatología, adscrito a la Facultad de Odontología de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA:

Que Dña. PAULA ACEYTUNO POCH, ha realizado bajo mi dirección el trabajo Fin de Grado titulado "REGULACIÓN DEL MOVIMIENTO DENTARIO MEDIANTE CÉLULAS MADRE".

Dr. Enrique Solano Reina

Sevilla, 10 de Mayo de 2018

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por ser mi sustento y por ayudarme a construir la persona que soy hoy en día.

*A mi tutor, el Dr. Enrique Solano, por su confianza, sus consejos y por las oportunidades que me ha brindado durante estos dos años, desvelándome el fascinante campo de las células madre y de la
Ortodoncia.*

A Fran, quien con su paciencia y comprensión me apoyó siempre en todo momento.

*A mis amigas y compañeras, por haber recorrido este camino conmigo enseñándome cada día a ser
más humana.*

ÍNDICE

1. RESUMEN/ ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2-7
2.1. Concepto	2
2.2. Clasificación	2-4
2.3. Fuentes de células madre	4
2.4. Aplicaciones clínicas	4-5
2.5. La promesa de las células madre en Ortodoncia	5-6
2.6. Movimiento dentario ortodóncico	6
2.7. Las células madre del ligamento periodontal	6-7
3. OBJETIVOS	7-8
3.1. Principales	
3.2. Secundarios	
4. MATERIAL Y MÉTODOS	8
5. RESULTADOS	8-11
6. DISCUSIÓN	12-24
6.1. Fuerza mecánica/fuerza ortodóncica	12-16
6.1.1. Fuerzas de tensión	12-13
6.1.2. Fuerzas de compresión	13-15
6.1.3. Efectos en la remodelación de la matriz extracelular del PDL y en la recuperación de la matriz durante recidiva ortodóncica.	16
6.2. Hipoxia	17-20
6.3. Reguladores paracrinicos: Sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	20-21
6.4. Micro-ARNs (miARNs)	21-24
7. CONCLUSIONES	24-25
8. BIBLIOGRAFÍA	26-30

ANEXO 1. GLOSARIO DE ACRÓNIMOS

ALP: Fosfatasa alcalina.

ARN: Ácido ribonucleico

ASCs: Células madre adultas/ células madre residentes / específicas de tejido.

BMP-2: Proteína morfogénica ósea 2.

CBs: Cementoblastos.

CBS: Cistationina β -sintasa.

CD29/44/90/105/146/166: Cúmulo de diferenciación 29/44/90/105/146/166.

Col-I: Colágeno tipo I.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

ECs: Células endoteliales.

ERK1/2: Extracellular Signal-regulated Kinase-1/2.

ESCs: Células madre embrionarias.

FSCs: Células madre del folículo.

hESCs: Células madre embrionarias humanas.

HIF-1 α : Factor inducible por hipoxia 1 α .

HSCs: Células madre hematopoyéticas.

H₂S: Sulfuro de hidrógeno.

ICM: Masa celular interna.

IL-1 β -6: Interleuquina 1 β /6.

iPSCs: Células madre pluripotentes inducidas.

JNK: Quinasa c-Jun N-terminal.

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos 1.

MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno.

MEK: Quinasa de la proteína quinasa activada por mitógeno. También conocida como MAPKK).

miARNs: microARNs.

miR-21/503: microARN 21/503.

MSCs: Células madre mesenquimales.

Msx2: Homeosecuencia (*homeobox*) del homólogo mutador S 2.

NK- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.

NSCs: Células madre neurales.

OBS: Osteoblastos.

OCN: Osteocalcina.

OCs: Osteoclastos.

OPG: Osteoprotegerina.

OTM: Movimiento dentario ortodónico.

Pdcd4: Proteína de muerte programada 4.

PDL: Ligamento periodontal.

PDLFs: Fibroblastos del ligamento periodontal.

PDLSCs: Células madre del ligamento periodontal.

PGE2: Prostaglandina E2.

PLGA: Poli (ácido láctico-co-glicólico).

p38 MAPK: Proteína quinasa activada por mitógeno p38.

RANK: Receptor activador de factor nuclear κ -B.

RANKL: Ligando del receptor activador de factor nuclear κ -B.

RT-PCR: Reacción de polimerasa en cadena en tiempo real.

Runx2: Factor de transcripción relacionado con Runt 2, también conocido como CBFA1 (subunidad alfa-1 del factor de unión al núcleo).

STRO-1: Estroma 1 (marcador de superficie de células mesenquimales).

Sp7: Factor de transcripción Osterix.

TGF- β : Factor de crecimiento transformante β .

VECs: Células endoteliales vasculares.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial-vascular.

ANEXO 2. TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Resultados de la búsqueda en Cochrane Plus.

Tabla 2: Resultados de la búsqueda en PubMed.

Tabla 3: Resultados de la búsqueda en Scopus.

Tabla 4: Artículos seleccionados: incluidos y analizados.

Figura 1: Jerarquía de los diferentes tipos de células madre de acuerdo con su potencialidad.

Figura 2: Diagrama de flujo del proceso de selección de artículos.

Figura 3: Rutas involucradas en la regulación de la osteoclastogénesis por células madre del ligamento periodontal (PDLSCs) bajo hipoxia y fuerzas ortodóncicas de compresión.

Figura 4: Secuencia de los mecanismos mediante los cuales las células madre del ligamento periodontal controlan el movimiento dentario ortodóncico (OTM).

1. RESUMEN/ABSTRACT

Español

Durante el movimiento dentario ortodóncico (OTM), la pieza dentaria se mueve a una nueva posición periodontal formada por la remodelación del hueso alveolar y del ligamento periodontal. Clave para este proceso y para el mantenimiento de la homeostasis en tejidos periodontales son un conjunto único de células madre multipotentes residentes en el ligamento periodontal, llamadas células madre del ligamento periodontal (PDLSCs). Las PDLSCs son capaces de responder a estímulos mecánicos (fuerzas ortodóncicas), ambientales (hipoxia) y biológicos (señales paracrinas) como los presentes durante el OTM, y orquestar dicho fenómeno tanto directa (diferenciación osteogénica y osteogénesis, regeneración del colágeno de la matriz extracelular del ligamento periodontal) como indirectamente (señalización paracrina con otros tipos celulares para producir angiogénesis, osteoclastogénesis o reclutamiento de células en circulación al ligamento periodontal). El conocimiento de los mecanismos mediante los cuales las PDLSCs gobiernan el OTM, así como los estímulos que producen esta respuesta y las distintas señales involucradas podría dar lugar en el futuro al desarrollo de nuevas terapias que modulen la actividad de las PDLSCs endógenas para controlar el OTM, sumando la Ortodoncia al creciente número de disciplinas que se benefician de las terapias con células madre, siendo para muchos la próxima revolución en Medicina.

English

During orthodontic tooth movement (OTM), the tooth relocates to a new periodontal position formed by alveolar bone and periodontal ligament remodeling. Instrumental to this process and to the maintenance of homeostasis in periodontal tissues are an unique group of multipotent stem cells residing in the periodontal ligament, called periodontal ligament stem cells (PDLSCs). PDLSCs can respond to mechanical (orthodontic force), environmental (hypoxia) and biological (paracrine signals) stimuli present during OTM, and orchestrate it both directly (osteogenic differentiation and osteogenesis, collagen regeneration in the extracellular matrix of the periodontal ligament) and indirectly (paracrine signaling with other cell types to promote angiogenesis, osteoclastogenesis or recruiting of circulating cells to the periodontal ligament). The understanding of the mechanisms through which PDLSCs govern OTM, as well as the stimuli which cause this response and the different signals and messengers involved could give rise to development of future therapies leveraging modulation of endogenous PDLSCs activity to control OTM, adding Orthodontics to the growing number of disciplines which benefit from the application of stem cell therapies, for many the next revolution in Medicine.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Concepto

Aunque la visión de la ingeniería de tejidos y de la medicina regenerativa se extiende hasta la antigüedad, el campo de la ingeniería de tejidos *per se* emerge como disciplina científica a finales del siglo XX, como consecuencia de los avances en el campo de las células madre¹, incluyendo una de las contribuciones más importantes en su historia: la derivación de las primeras líneas de células madre embrionarias humanas (hESCs), cuando Thomson *et al.* aislaron células de embriones humanos tempranos². En el siglo XXI, en 2001, se clonó por primera vez un embrión humano con el propósito de generar hESCs³. Tras esto, se fueron sucediendo diferentes acontecimientos, hasta que en 2006 las células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) son desarrolladas por el doctor Shinya Yamanaka, lo que supuso un hito clave que transforma el campo de la investigación con células madre⁴. La posibilidad de inducir pluripotencia en células adultas supuso la aparición de una alternativa a las células madre embrionarias (ESCs) (extraídas a partir de embriones), menos controvertida y con las mismas características, probando así que la diferenciación celular puede ser manipulada y revertida. Además, las iPSCs constituyen una fuente de células altamente personalizadas, que pueden producir cualquier tipo celular a partir de cualquier tipo de célula adulta del mismo individuo⁵. En 2010 se inicia el primer ensayo clínico con hESCs para tratar lesiones de la médula espinal por la empresa biotecnológica Geron Corporation en EEUU⁶, estudio que marcó el inicio de una larga lista de investigaciones y aplicaciones clínicas de las células madre que actualmente dan su fruto en los campos más trascendentes de la Medicina.

Las células madre se pueden definir funcionalmente de manera simple y amplia en base a tres propiedades fundamentales⁷:

- Autorrenovación: capacidad de dividirse y renovarse por largos periodos⁷.
- Estado indiferenciado: habilidad de mantenerse en un estado no diferenciado⁷.
- Potencial de generar un amplio rango de diversos tipos de células diferenciadas⁷.

De una manera explícita una célula madre es aquella dotada simultáneamente de la capacidad de generar células hijas indiferenciadas e idénticas a la original mediante división mitótica y producir progenie con una potencialidad más restringida⁷.

2.2. Clasificación

Todas las células madre se pueden clasificar, en base a su potencial de diferenciación (de mayor a menor potencialidad), en cinco grupos tal y como describen Ilic y Polak⁸ (*Fig. 1*):

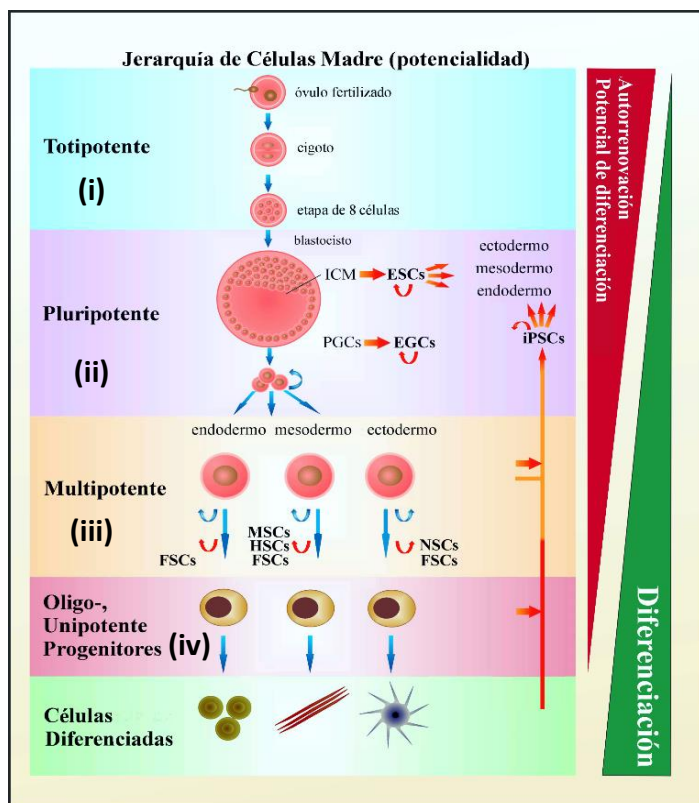


Figura 1: Jerarquía de los diferentes tipos de células madre de acuerdo con su potencialidad. De arriba abajo, los diferentes tipos de células troncales se ordenan en orden creciente de diferenciación y decreciente en capacidad de autorrenovación y potencial de diferenciación: (i) totipotentes (ej.: óvulo fertilizado); (ii) pluripotentes, incluyendo células madre embrionarias (ESCs), extraídas de la masa celular interna (ICM) de un embrión en etapa de blastocisto, y células madre pluripotentes inducidas (iPSCs); (iii) multipotentes, como células madre del folículo (FSCs), mesenquimales (MSCs), hematopoyéticas (HSCs) o neurales (NSCs); y (iv) progenitoras (oligo- y unipotentes), que darán lugar a células diferenciadas específicas de cada tejido. Estas células diferenciadas pueden ser reprogramadas para inducir el retorno a un estado de pluripotencia, y convertirlas así en iPSCs. Adaptado de Forostyak *et al.*(2016)¹⁵.

- Células madre *totipotentes u omnipotentes*, las cuales tienen el potencial de diferenciarse en tejidos tanto embrionarios como extraembrionarios, y generar un organismo completamente viable. Un ejemplo sería un óvulo fertilizado⁸.
- Células madre *pluripotentes*, con capacidad de autorrenovación y diferenciación en cualquiera de las tres líneas germinales (ectodermo, endodermo y mesodermo), a partir de las que se forman todos los tejidos y órganos. Ej.: ESCs e iPSCs⁸. Estas últimas provienen de células específicas de tejido y diferenciadas (por ejemplo, los fibroblastos), reprogramadas por el ser humano para recapitular el proceso de diferenciación y devolverlas a un estado de célula madre embrionarias⁹. El descubrimiento de la técnica de reprogramación celular por sobreexpresión de ciertos factores de transcripción (“factores de Yamanaka”) por el científico Shinya Yamanaka en 2006⁴ le hizo merecedor del Premio Nobel de Medicina en 2012¹⁰.
- Células madre *multipotentes*, que pueden renovarse y diferenciarse únicamente en familias específicas de células estrechamente relacionadas. Ej.: células madre mesenquimales (MSCs), quizás las más relevante para el propósito de esta revisión, que pueden dar lugar a tejidos conectivo, óseo, cartilaginoso, y del sistema circulatorio y linfático⁸.
- Células madre *oligopotentes*, que pueden renovarse y diferenciarse solo en tipos celulares muy cercanos. Ej.: células madre hematopoyéticas (HSCs), que dan lugar a los linajes mieloide y linfoide de células sanguíneas⁸.

- Células madre *unipotentes*, con la menor potencialidad. Este tipo de células madre puede autorrenovarse, pero solo es capaz de diferenciarse en un tipo de célula. Ej.: células madre adultas residentes específicas de tejido, como los osteoblastos (tejido óseo)⁸.

2.3. Fuentes de células madre

Ilic y Polak también resumen y describen los distintos orígenes de las células madre, que incluyen cuatro categorías o fuentes “naturales”, y las iPSCs, que conforman su propia categoría (de origen artificial)⁸. Dentro de estas fuentes naturales de células madre, se encuentran:

- *ESCs*: derivadas de embriones en estado de blastocisto⁸ (Fig. 1).
- *Células madre fetales*: obtenidas de embriones procedentes de embarazos interrumpidos⁸.
- *Células madre perinatales*: obtenidas del fluido amniótico, la placenta o el cordón umbilical⁸.
- *Células madre adultas* (ASCs), también conocidas como *células madre residentes* o *específicas de tejido*. Estas células juegan un papel crucial en la regeneración continua de tejidos del cuerpo humano, mediante proliferación y diferenciación en respuesta a un estímulo (lesión, estímulos mecánicos...). Aunque estas células son en su mayoría oligopotentes o unipotentes (Fig. 1), en algunos casos son muy fáciles de aislar, como ocurre en la sangre periférica, la médula ósea o el tejido adiposo⁸. En los últimos años, y más cercano al tema de esta revisión, los tejidos dentales de las piezas dentarias extraídas han sido propuestos como fuente alternativa de las ASCs, incluyendo la pulpa dentaria de dientes deciduos¹¹, el ligamento periodontal (PDL)¹², la papila apical radicular¹³ y el folículo dental¹⁴. El uso de estos tejidos como fuentes de células madre posibilita la obtención de células madre multipotentes hasta la edad de 20 años, para su uso potencial en terapia celular autóloga en medicina regenerativa¹⁵.

2.4. Aplicaciones clínicas

En palabras de Cade Hildreth, CEO de “Bioinformant”, empresa líder a nivel global en análisis de mercado en la industria de células madre:

“Como el hierro y el acero en la revolución industrial y como el microchip en la revolución tecnológica, las células madre serán la fuerza motora de la siguiente revolución”

En efecto, las células madre han supuesto una revolución del campo de la medicina regenerativa, teniendo el potencial de suponer un beneficio sustancial para pacientes con un amplio rango de enfermedades y posibilitar incluso la generación de órganos y tejidos en el laboratorio mediante la aplicación conjunta de biomateriales y técnicas de impresión 3D¹⁶. Tras el estudio pionero de Geron Corporation, un amplio abanico de células madre de diferente origen y potencialidad ha entrado en ensayos clínicos para múltiples aplicaciones, en muchos casos consiguiendo su traslación y derivando en productos que se encuentran actualmente en el mercado¹⁶. En este

ámbito, y dada su rápida progresión, en un futuro sin duda asistiremos a la irrupción de terapias basadas en células madre en el campo de la Ortodoncia que transformarán la práctica diaria¹⁷.

2.5. La promesa de las células madre en Ortodoncia

A pesar de que los fundamentos de la Ortodoncia han permanecido casi inalterados a lo largo del siglo pasado¹⁸, históricamente, el campo ha progresado de manera significativa en muchos niveles y ha incorporado innovaciones tecnológicas para mejorar el diagnóstico y las técnicas terapéuticas, lo que actualmente abre muchas más opciones al ortodoncista medio que hace una década^{18,19}. En este contexto, los descubrimientos en terapia con células madre y medicina regenerativa se han abierto paso en Ortodoncia de manera sorprendentemente rápida, no sin causar debate entre el colectivo de ortodoncistas. Como parte de estos avances, se encuentra la manipulación de fuerzas biológicas para mejorar la estética usando terapia celular, que representan un horizonte más amplio de posibilidades que los métodos actuales (reduciendo, por ejemplo, el riesgo de recidiva)¹⁹.

Entre las ventajas potenciales derivadas de la aplicación de terapia celular y génica en el campo de la Ortodoncia estarían: **(i)** reducción del tiempo de tratamiento acelerando el movimiento dentario ortodóncico²⁰; **(ii)** posibilidad de regenerar y reparar tejidos periodontales; **(iii)** reducción de la resorción radicular apical externa, una secuela del tratamiento ortodóncico con cierta predisposición genética de acuerdo a polimorfismos en ciertos genes como el de la osteopontina²¹ o el de la interleuquina (IL)-1 β ²²; **(iv)** beneficios para los pacientes, como por ejemplo la mínima invasividad de estas técnicas, reducción del riesgo de fracaso al usar las células del propio paciente y la propia regeneración natural, y aceleración del proceso de regeneración¹⁷. Ejemplos de estrategias de ingeniería tisular dental y craneofacial mediante el uso de células madre relevantes en Ortodoncia incluyen: **(i)** reparación de defectos óseos craneofaciales, como los del hueso alveolar tras las extracciones durante el tratamiento ortodóncico; **(ii)** aceleración de la regeneración ósea y mejora de la consolidación del nuevo tejido óseo en los procedimientos de distracción osteogénica; **(iii)** regeneración y reparación de defectos de la ATM; o **(iv)** restauración de estructuras dentarias y piezas dentales completas^{17,19}.

Sin embargo, cuando nuevas ideas e hipótesis aparecen, no es posible predecir fácilmente cómo se incorporarán a la práctica ortodóncica diaria, lo que supone un problema para el desarrollo clínico de estas nuevas aproximaciones¹⁹. Algunas de estas estrategias han sido trasladadas con éxito a la clínica (ejemplo son los biomateriales usados en la regeneración tisular guiada para favorecer la regeneración de hueso alveolar tras una cirugía periodontal), aunque la mayoría se encuentra todavía en fase de desarrollo. Es por ello vital aumentar el conocimiento de los mecanismos genéticos y moleculares que están detrás del crecimiento y desarrollo dentario y del aumento del movimiento dentario ortodóncico (OTM), de manera que puedan desarrollarse nuevas

terapias de manera interdisciplinaria (en combinación con investigaciones en patogénesis, comportamiento de las células madre y procesos del desarrollo) para satisfacer las necesidades clínicas en estas áreas concretas¹⁸.

2.6. Movimiento dentario ortodóncico (OTM)

Durante el transcurso de la vida, el tejido óseo sufre una remodelación constante para adaptarse a necesidades funcionales del ambiente fisiológico y mecánico²³. A nivel celular, los responsables de la formación y resorción de hueso son los osteoblastos (OBs) y los osteoclastos (OCs), respectivamente. La homeostasis ósea se mantiene de esta manera por un balance entre formación y destrucción de hueso llevado a cabo por estas células especializadas²⁴.

En el ámbito de la Ortodoncia, el OTM está considerado como un proceso inflamatorio periodontal, caracterizado por una remodelación del ligamento periodontal (PDL) y del hueso alveolar (llevada a cabo por OBs y OCs), durante el cual la pieza dentaria se mueve a una nueva posición periodontal formada por resorción ósea en el lado de compresión y formación de hueso en el lado de tensión²⁵. Este fenómeno es consecuencia (patológica y fisiológica) de la respuesta a la aplicación de fuerzas mecánicas terapéuticas (como ocurre durante el tratamiento ortodóncico), las cuales causan remodelación ósea y el subsecuente movimiento del diente^{24,26}.

El OTM es facilitado, además de por la actividad osteoblástica y osteoclástica que se da lugar en el hueso alveolar, por la remodelación sufrida por el PDL²⁷. El colágeno tipo I (Col-I) (proteína formada por 3 cadenas) es el componente estructural principal de la matriz extracelular del PDL, y absorbe la carga mecánica durante actividades fisiológicas²⁸. Cuando se aplica una fuerza ortodóncica, el Col-I del PDL se degrada en el lado de compresión, y su expresión por las células del PDL se inhibe^{29,30}.

2.7. Células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)

El PDL es un tejido conectivo especializado que facilita la unión del diente al hueso alveolar y se caracteriza por una alta capacidad de remodelación³¹ y un potencial regenerativo inherente en comparación con otros tejidos conectivos^{32,33}, dado que el PDL tiene un papel fundamental en el mantenimiento del periodonto y la promoción de la regeneración periodontal, además de en la respuesta al estrés mecánico³⁴. Las fuerzas aplicadas a los dientes se transmiten a través del PDL al hueso alveolar, dando lugar a la mencionada deposición de hueso en el lado de tensión y destrucción del tejido óseo en el lado de compresión³⁵. Este ligamento está compuesto de una abundante red de vasos sanguíneos y una población heterogénea de células (PDLCS), entre las que se encuentran los fibroblastos (PDLFs), OBs, cementoblastos (CBs), OCs y una pequeña población de células madre multipotentes, llamadas células madre del ligamento periodontal (PDLSCs)³⁴.

Las PDLSCs, aisladas por primera vez del PDL en 2004¹², constituyen una población celular única con las características de una célula madre multipotente, pudiendo autorrenovarse y diferenciarse en diferentes tipos celulares³⁵. Estas células progenitoras son las que se diferencian en la mayoría de los componentes celulares del PDL y generan esta compleja estructura^{12,36}, teniendo capacidad de diferenciarse en varios tipos celulares (y en concreto en células osteogénicas, aunque también en cementoblastos, adipocitos y células formadoras de colágeno bajo condiciones de cultivo definidas) *in vitro* y generar la estructura del PDL *in vivo* al ser transplantadas en ratones inmunodeprimidos¹². Diferentes estudios han señalado que las PDLSCs expresan diversos marcadores de superficie de MSCs, como STRO-1, CD29, CD44, CD90, CD105, CD146 y CD166, además de una serie de marcadores cementoblásticos y osteoblásticos^{12,37,38}.

Las MSCs, así como las PDLSCs, tienen efectos tanto autocrinos como paracrinos en la remodelación ósea y la regeneración del ligamento periodontal^{39,40}. Son estos efectos paracrinos los que controlan las interacciones entre las PDLSCs y otros tipos celulares, como los precursores de los OCs⁴¹. Además, en la literatura se pueden encontrar numerosos estudios demostrando que las MSCs pueden ser estimuladas por fuerzas mecánicas y diferenciarse en OBs, potenciando la formación de hueso. Dado que, a nivel clínico, las piezas dentales anquilosadas y los implantes dentales no presentan PDL, no pueden ser desplazados por tratamiento ortodóncico⁴², por lo que las PDLs deben jugar papeles críticos en la remodelación periodontal y ósea durante el OTM, siendo las PDLSCs clave en el mantenimiento de la homeostasis y de la regeneración del tejido periodontal³⁵. Estudios como el de Nayak *et al*⁴³, en 2008 demuestran que en tejido periodontales dañados y bajo OTM extensivo, el trasplante de PDLSCs puede usarse para regenerar la lesión a nivel tisular y celular (las células trasplantadas se diferencian en células osteogénicas y no osteogénicas), lo que evidencia la necesidad de comprender los mecanismos que gobiernan tanto la estimulación de las PDLSCs por el OTM como la respuesta a la misma, como parte crucial del camino hacia la utilización de PDLSCs como terapia en Ortodoncia.

3. OBJETIVOS

En la presente revisión bibliográfica se han establecido los siguientes objetivos basándose en la mejor evidencia científica actual y la práctica basada en investigación:

3.1. Objetivos Principales

- i. Analizar el rol de células madre en la remodelación del hueso alveolar y del ligamento periodontal durante el movimiento dentario ortodóncico.

3.2. Objetivos Secundarios

- i. Definir los distintos tipos de células madre y sus aplicaciones en Ortodoncia.
- ii. Describir la influencia de estímulos externos (fuerzas mecánicas e hipoxia) en la regulación del movimiento dentario por células madre.
- iii. Detallar el papel de reguladores paracrinos en la regulación del movimiento periodontal por células madre.

4. MATERIAL Y METODOS

Para llevar a cabo la revisión bibliográfica de la literatura centrada en la relación que une a la terapia celular con células madre con el movimiento dentario ortodóncico, se realizaron búsquedas de artículos a través de las bases de datos PubMed, Scopus y Cochrane Plus, además de una extensa búsqueda manual de todos aquellos artículos no indexados en revistas científicas internacionales. Los términos adecuados de búsqueda para relacionar ambos campos son “*stem cells*”, “*cellular therapy*” y “*tooth movement*”. La búsqueda se limitó en base a unos criterios específicos de inclusión y exclusión que a continuación se muestran.

Los criterios de inclusión para esta revisión fueron los siguientes: debían ser artículos en inglés que cubriesen suficiente información tanto en humanos como en animales en los últimos 5 años acerca de la terapia celular con células madre y su impacto actual y futuro, estableciéndose como una futura potencial técnica de aplicación dentro de la Ortodoncia.

Los criterios de exclusión fueron aquellos que estudiaran artículos publicados hace más de 5 años, escritos en lengua no inglesa, de texto incompleto, artículos referidos a casos o patologías específicas del individuo y los referidos a temas que no fuesen del interés de este estudio. Además, se excluyeron aquellos artículos que estuviesen duplicados, preseleccionados anteriormente o que cuyos *abstract* no estuviesen disponibles.

A partir de los distintos criterios de inclusión y exclusión empleados para la limitación de resultados afines al tema correspondiente tratado en esta revisión bibliográfica, ha sido posible la selección y recopilación de los artículos considerados de mayor significación y utilidad.

5. RESULTADOS

A continuación, se presentan los resultados encontrados para la realización de esta revisión, además de un diagrama de flujo en el que se muestra el proceso de selección llevado a cabo:

- Cochrane Plus: búsqueda realizada el 2 de enero de 2018 a las 19:12h. Tabla 3.
- PubMed: búsqueda realizada el 2 de enero de 2018 a las 12:03h. Tabla 1.
- Scopus: con la búsqueda realizada el 2 de enero de 2018 a las 20:02h. Tabla 2.

Tabla 1. Resultados de la búsqueda en Cochrane Plus

	ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA
RESULTADOS	("stem cells" OR "cellular therapy") AND "tooth movement"
Búsqueda inicial	0
FINAL	0

Tabla 2. Resultados de la búsqueda en PubMed

	ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA
RESULTADOS	("stem cells" OR "cellular therapy") AND "tooth movement"
Búsqueda inicial	35
Últimos 5 años	22
Texto completo	21
Inglés	21
Humanos ó animales	18
Título y Resumen	10
FINAL	10

Tabla 3. Resultados de la búsqueda en Scopus

	ESTRATEGIA DE BÚSQUEDA
RESULTADOS	("stem cells" OR "cellular therapy") AND "tooth movement"
Búsqueda inicial	1032
Últimos 5 años	492
Area Dentistry	169
Inglés	169
Palabras Claves: Human, Animal	100
Título y Resumen	10
FINAL	10

Tabla 4. Artículos seleccionados: incluidos y analizados.

TITULO	AUTOR	REVISTA	AÑO	CONCLUSIONES
Force-Induced H2S by PDLSCs Modifies Osteoclastic Activity during Tooth Movement.	Liu F et al.	Journal of dental research	2017	Las PDLSCs producen H ₂ S en respuesta a fuerzas mecánicas. El H ₂ S promueve la remodelación del hueso durante el OTM.
MicroRNA-503-5p inhibits stretch-induced osteogenic differentiation and bone formation.	Liu L et al.	Cell biology international	2017	miR-503-5p inhibe la remodelación del hueso alveolar durante el OTM.

PDL Progenitor-Mediated PDL Recovery Contributes to Orthodontic Relapse.	<i>Feng L et al.</i>	Journal of dental research	2016	La recidiva temprana puede verse favorecida por PDLSCs productoras de Col-I y por un aumento de TGF- β . Este mecanismo puede regularse por la ruta TGF- β /Smad.
microRNA-21 Contributes to Orthodontic Tooth Movement.	<i>Chen N et al.</i>	Journal of dental research	2016	miR-21 promueve la remodelación del hueso durante el OTM.
Mechanical stress regulates osteogenic differentiation and RANKL/OPG ratio in periodontal ligament stem cells by the Wnt/ β -catenin pathway.	<i>Zhang L et al.</i>	Biochimica et biophysica acta	2016	Cuando el ratio RANKL/OPG está aumentado, se favorece la osteoclastogénesis y con ello la resorción ósea. Cuando el ratio RANKL/OPG está disminuido, se favorece la osteoblastogénesis y con ello la osteogénesis. La ruta Wnt/ β -catenina mantiene la homeostasis ósea durante OTM al regular el balance entre actividad osteoblástica y osteoclastica.
Compression and hypoxia play independent roles while having combinative effects in the osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells	<i>Li, M.L. et al.</i>	Angle Orthodontist	2016	La hipoxia promueve la resorción ósea del hueso alveolar en el lado de compresión del PDL durante el OTM. En este lado, la compresión y la hipoxia tienen roles independientes, pero efectos combinativos en el inicio de la osteoclastogénesis.
High-magnitude mechanical strain inhibits the differentiation of bone-forming rat calvarial progenitor cells	<i>Fushiki R, et al.</i>	Connective tissue research	2015	Fuerzas ortodóncicas de tensión de magnitud demasiado alta inhiben la diferenciación osteoblástica de PDLSCs en el lado de tensión y la formación de nuevo hueso durante OTM.
Orthodontic Force Induces Systemic Inflammatory Monocyte Responses	<i>Zeng, M. et al.</i>	Journal of dental research	2015	Ante fuerzas ortodóncicas en el lado de presión, las PDLSCs se activan y se secreta MCP-1, que recluta monocitos inflamatorios sistémicos al PDL, y se altera el ratio RANKL/OPG que promueve la diferenciación de estos monocitos reclutados en OCs, favoreciendo la resorción ósea durante OTM.
Cyclic tension promotes osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells.	<i>Shen T et al.</i>	International journal of clinical and experimental pathology	2014	Las fuerzas mecánicas de tensión potencian la diferenciación de PDLSCs en OBs en el lado de tensión durante OTM, y la formación de nuevo tejido óseo.
Effects of vascular endothelial cells on osteogenic differentiation of noncontact co-cultured periodontal ligament stem cells under hypoxia.	<i>Wu Y et al.</i>	Journal of periodontal research	2013	La hipoxia favorece la formación de hueso alveolar en el lado de tensión acoplada a una neoangiogénesis, gracias a una intercomunicación entre PDLSCs, OBs y VECs. orquestada gracias a factores paracrinos. La comunicación entre PDLSCs y VECs incrementa el potencial de diferenciación osteogénica de PDLSCs y la actividad osteogénica durante OTM, mediante un mecanismo regulado por las rutas MEK/ERK y p38 MAPK.

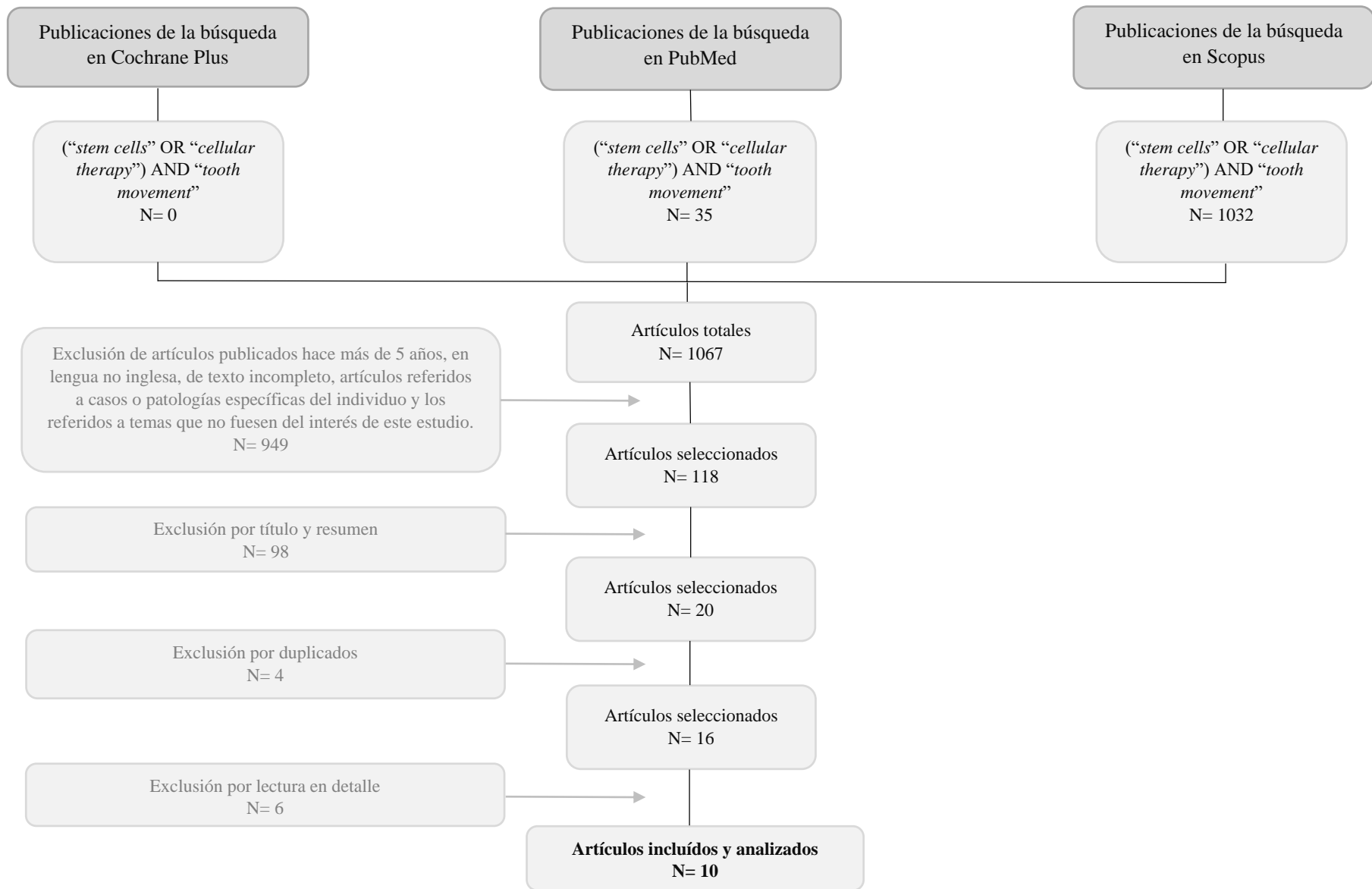


Figura 2. Diagrama de flujo del proceso de selección de artículos

6. DISCUSIÓN

Al someter un diente a una fuerza ortodóncica durante el tratamiento, ocurren numerosos cambios a nivel del hueso alveolar y del periodonto. En este contexto, dichos cambios producen diversos tipos de estrés que afectan a las células de los tejidos periodontales, siendo la fuerza mecánica y la hipoxia los estímulos más estudiados y descritos como reguladores de la remodelación ósea en el OTM²⁶. En esta sección se discutirá el efecto de estímulos de diversa naturaleza presentes durante el OTM en la remodelación del hueso alveolar y del PDL mediados por las PDLSCs, así como se analizarán las rutas de señalización celular, genes, marcadores y mensajeros implicados en la regulación del OTM por las células del PDL y, en concreto, de las PDLSCs.

6.1. Fuerza mecánica/fuerza ortodóncica.

6.1.1. Fuerzas de tensión: diferenciación de PDLSCs en OBs.

La fuerza mecánica es un conocido estímulo de remodelación del hueso alveolar, cuyos efectos dependen del dispositivo, magnitud, duración y frecuencia de la fuerza^{42,44-46}.

En un estudio llevado a cabo por *Shen et al.* en 2014, se postuló que las PDLSCs expuestas a fuerzas mecánicas de tensión como las que ocurren durante el OTM podrían producir la diferenciación de estas células en OBs, dando lugar a la deposición posterior de hueso. Para demostrarlo, estos investigadores aplicaron fuerzas de tensión cíclica (12% de deformación, frecuencia de 0.1Hz) a PDLSCs en estado quiescente aisladas de voluntarios y cultivadas bajo condiciones de inducción de osteogénesis (cultivo con factores que promueven la osteogénesis), midiendo los niveles de expresión de los marcadores osteogénicos Runx2, fosfatasa alcalina (ALP) y osteocalcina (OCN), así como los niveles del marcador de multipotencia CD146 (presente en células multipotentes), en diversos puntos temporales (hasta 24h)³⁵.

Runx2 es considerado el regulador transcripcional maestro en diferenciación osteogénica de las MSCs y de las PDLSCs, y se presenta en unos niveles elevados en etapas tempranas de la diferenciación osteoblástica y de la formación de hueso^{47,48}. Hay evidencia que sugiere que la activación de Runx2 en las MSCs da lugar a la expresión de diversos marcadores específicos de OBs, como Col-Ia, ALP del hueso, osteocalcina (OCN) y factor de transcripción *zinc finger* (Osterix)^{49,50}. Diversos estudios demuestran que en ratones sin Runx2 no hay ni tejido óseo ni OBs^{47,51}. Además, la ALP ósea es una de las isoenzimas de ALP expresadas de manera ubicua en diferentes tejidos (como en células formadoras de hueso), la cual cuando se presenta elevada constituye un biomarcador temprano de diferenciación osteoblástica que juega un papel importante en la formación de nuevo tejido óseo al promover la mineralización ósea^{52,53}. La OCN está presente durante las etapas tardías de diferenciación osteoblástica⁵⁴. En este estudio, los investigadores

descubrieron que los niveles de ARN mensajero (medido por reacción de polimerasa en cadena en tiempo real, o bien por RT-PCR) y proteína (medido por análisis *Western Blot*) de Runx2, ALP y OCN eran regulados positivamente por la fuerza de tensión de 12% en las PDLSCs (tras comparar con PDLSCs sin estimular mecánicamente) mientras que los niveles del marcador de multipotencialidad CD146 disminuían con la aplicación de dicha fuerza, lo que demuestra que el estímulo de fuerzas mecánicas de tensión potencia la diferenciación de PDLSCs en OBs, y confirma el papel de las PDLSCs como fuente de OBs durante la remodelación del hueso alveolar³⁵.

Sin embargo, existe un límite de la magnitud de fuerza mecánica a partir del cual la diferenciación osteogénica es inhibida, tal y como demostraron *Fushiki et al.* en 2015 en un estudio que hacía uso de células progenitoras del cráneo de rata formadoras de nódulos de hueso mineralizado tridimensionales como modelo *in vitro*. En este estudio se quiso determinar el efecto de las fuerzas mecánicas de tensión alta (18%) al aplicarlas a estas células en la formación de hueso y en la diferenciación osteogénica. Para ello, se midieron el número y el tamaño de los nódulos de hueso con y sin aplicación de estas fuerzas, y se cuantificó la expresión de factores relacionados con la osteogénesis. Los investigadores japoneses encontraron que, ante fuerzas de tensión de alta magnitud, las células progenitoras producían un menor número de nódulos, de menor tamaño y concentración de calcio, comparado con el grupo control (sin fuerzas de alta tensión). Además, demostraron que el estímulo mecánico regulaba negativamente la expresión de BMP-2, Runx2 y Msx2²⁴. Las proteínas morfogénicas del hueso (BMPs) son glicoproteínas secretadas que se pueden purificar de la matriz ósea, y que son miembros de la superfamilia TGF. Estas proteínas son potentes factores de diferenciación osteoblástica, y juegan un papel fundamental en la formación ósea^{55,56}. BMP-2 es un promotor de la remodelación ósea alveolar ante estímulos mecánicos, capaz de regular positivamente a Runx2 mediante señalización por la ruta Smad1/Smad5^{57,58}. Msx2 tiene un papel más complejo en la osteogénesis, regulando tanto positiva^{59,60} como negativamente⁶¹ la proliferación y diferenciación de OBs⁶², por un mecanismo independiente a Runx2⁶⁰⁻⁶³. Los resultados del estudio demuestran que la aplicación de fuerzas de tensión de alta magnitud durante 48h en células progenitoras óseas de rata inhibe la diferenciación osteogénica y la formación de hueso²⁴.

6.1.2. Fuerzas de compresión: activación de las PDLSCs, reclutamiento regional de monocitos inflamatorios sistémicos al PDL y diferenciación en OCs.

El rol de las fuerzas mecánicas de compresión en la promoción de la osteoclastogénesis en el PDL ha sido mostrado en diferentes publicaciones^{64,65}; brevemente, bajo fuerzas de compresión, las PDLSCs regulan positivamente la formación de OCs. Un factor a tener en cuenta es que el balance

entre la actividad de OBs y OCs (formación de nuevo hueso en el lado de tensión coordinada con destrucción de hueso en el lado de compresión) es clave para el OTM. En este sentido, hay que señalar la importancia del balance entre la expresión del ligando del receptor activador de factor nuclear κ -B (RANKL) y de la osteoprotegerina (OPG), conocido como ratio RANKL/OPG^{64,66}. El sistema RANKL/OPG/RANK se considera un elemento central en la maduración de OCs. Los OBs y las MSCs/PDLSCs son capaces de secretar OPG, que se une a RANKL (disminuye el ratio RANKL/OPG) y previene por tanto la activación de RANK, inhibiendo así la osteoclastogénesis³⁴. Una de las rutas que controlan la secreción de RANKL y OPG es la ruta canónica Wnt/ β -catenina, que juega un papel importante tanto en la osteoclastogénesis como en la mecanotransducción de señales mecánicas extracelulares a señales biológicas intracelulares en el contexto de la regulación de la diferenciación osteogénica en las MSCs, manteniendo así la homeostasis del hueso al regular el balance entre la actividad osteoblástica y osteoclástica^{67,68}.

En 2016, *Zhang et al.* realizaron una serie de experimentos en un modelo de rata durante el OTM (para seguir la acción de las PDLSCs en el PDL) y en PDLSCs humanas procedentes de voluntarios, que fueron sometidas a fuerzas de compresión (100kPa por 1h o 12h), para después medir los efectos del estímulo mecánico en el potencial osteogénico y en el ratio RANKL/OPG, a nivel genético, celular y proteico. En el modelo de rata, los investigadores confirmaron que las PDLSCs responden a la aplicación de estímulos de fuerza ortodóncica. *In vitro*, la diferenciación osteogénica de las PDLSCs (medida por la expresión de Sp7 y Runx2, así como por la actividad de ALP) incrementa significativamente tras 1h después de la aplicación de la fuerza, aunque la tendencia se debilita a las 12h. En cambio, esta fuerza produce la reducción del ratio RANKL/OPG tras 1h de aplicación, y un significativo incremento tras 12h. Estos datos evidencian que las fuerzas de compresión hidráulicas inicialmente promueven la diferenciación de PDLSCs en OBs y reprimen la osteoclastogénesis, aunque este efecto no dura en el tiempo y finalmente la aplicación de esta fuerza resulta en un aumento del ratio RANKL/OPG (que *in vivo* promovería la formación de OCs en el lado de compresión). *In vivo* se observó que la expresión de β -catenina activa (vista mediante inmunohistoquímica) aparecía incrementada del día 1 al día 3, y luego las señales positivas disminuían a los 7 días. *In vitro*, los niveles de β -catenina activa se incrementaban tras 1 h de exposición a fuerzas de compresión para disminuir hasta estar por debajo del control pasadas 12 horas.

Estos datos indican que la ruta Wnt/ β -catenina en el PDL y en las PDLSCs sigue una activación dinámica tras la estimulación mecánica. Por lo tanto, los autores concluyeron que el mecanismo de mantenimiento del balance entre OBs y OCs durante el OTM se lleva a cabo mediante la ruta

Wnt/ β -catenina, además de confirmar la participación de las PDLSCs tanto en la osteoblastogénesis como en la osteoclastogénesis³⁴.

Los OCs, que como ya se ha mencionado son clave para el OTM, son regulados potencialmente por el sistema inmune durante dicho proceso⁶⁹. Se considera que los precursores de estas células son los monocitos, células mieloides originadas en la médula ósea y residentes en la sangre periférica y el bazo⁷⁰. Estas células son críticas en respuestas inflamatorias a varios estímulos, y son reclutadas a los tejidos inflamados asépticos desde la sangre y el bazo (como los que se ven durante isquemia cerebral, aterosclerosis, infarto de miocardio...). Se sabe que los tejidos bajo OTM son también tejidos inflamados asépticos, pero el reclutamiento de estas células al PDL está aún por comprobar.⁷¹ Algunos estudios han reportado además la regulación positiva de la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1), que participa como quimiocina en el reclutamiento de monocitos a tejidos periodontales durante el OTM^{72,73}. En 2015, un estudio de *Zeng et al.* examinó los cambios de los monocitos inflamatorios sistémicos tras un estímulo de fuerza ortodóncica *in vivo* (modelo de ratón), para explorar si el OTM inducía reacciones inmunes sistémicas como las que se producen en otros tejidos de características similares. Como resultado, se encontró que los monocitos inflamatorios del bazo y de la sangre periférica eran reclutados localmente al lado de compresión del PDL durante el OTM, y se diferenciaban a OCs. Además, se demostró *in vivo* que la expresión de MCP-1 en el lado de compresión del tejido periodontal de rata es regulada positivamente durante la aplicación de fuerzas ortodóncicas durante 7 días, con lo que se podría hipotetizar que MCP-1 pudiese mediar en el reclutamiento de estos monocitos al PDL. Para dilucidar el mecanismo de regulación positiva de MCP-1 en este contexto, se aplicaron fuerzas estáticas compresivas a cultivos primarios de PDLSCs humanas, y se comprobó que tras 1 y 2 horas se regulaba positivamente la expresión de MCP-1 a nivel transcriptómico. Este resultado indica que las fuerzas compresivas podrían inducir la regulación positiva de MCP-1 en las PDLSCs *in vivo*, y que esta cantidad aumentada de MCP-1 en tejidos periodontales contribuye al reclutamiento de monocitos inflamatorios en la etapa inicial del OTM. El estudio advierte también de que, aunque MCP-1 es una importante quimiocina, no es la única involucrada en el reclutamiento de pre-OCs en los tratamientos ortodóncicos. Además, estos resultados suponen que hay que considerar el riesgo de la aplicación frecuente de fuerza ortodóncica y subsecuente estimulación del sistema inmune (activado o suprimido) en pacientes que tengan enfermedades sistémicas⁷¹.

6.1.3. Efectos en la remodelación de la matriz extracelular del PDL (colágeno tipo I) y en la recuperación de la matriz durante la recidiva ortodóncica.

Cuando una fuerza ortodóncica se interrumpe, puede dar lugar a que el PDL por su alta capacidad de regeneración, recupere su estructura original, produciendo una recidiva de los dientes recolocados⁷⁴. En este proceso interviene el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), que tiene funciones en el mantenimiento de la homeostasis y de la reparación de los tejidos, y media en la síntesis de la matriz extracelular del PDL. Durante la regeneración de una lesión, el TGF- β activa a los fibroblastos, regula la deposición de matriz extracelular por los mismos y puede inducir la producción de Col-I tras aplicar una carga mecánica³¹.

Para investigar las respuestas de las PDLSCs y del colágeno del PDL durante y tras una fuerza mecánica, además del rol de las PDLSCs en la recuperación de dicho colágeno durante el proceso de recidiva, *Feng et al.* (2016) llevaron a cabo un estudio en modelos de ratas de OTM. Como se ha indicado anteriormente en esta revisión, el Col-I del lado de compresión del PDL se degrada de forma significativa durante la aplicación de una fuerza ortodóncica, mostrando un patrón desorganizado, mientras que aumenta el número de PDLSCs con la expresión de Col-I suprimida. Sin embargo, tras la retirada del estímulo mecánico se vio que el colágeno degradado se recuperó durante la etapa temprana de recidiva (5-14 días). Paralelamente, los investigadores encontraron que durante esta etapa temprana de recidiva las PDLSCs recuperan la expresión de Col-I y se acumulan en las zonas de degradación. Es de especial relevancia conocer que durante este proceso de recidiva la etapa temprana está mediada por esta recuperación de colágeno, mientras que la etapa tardía está mediada por OCs en el antiguo lado de tensión³¹. En otros experimentos del estudio, se demostró que las fuerzas de compresión *in vitro* son capaces de alterar la morfología de las PDLSCs (que se vuelven más alargadas y con una distribución más densa de filamentos de actina) y reprimir la expresión de colágeno, lo que se revierte al retirar el estímulo mecánico. Por último, también se investigó la expresión de TGF- β durante la aplicación de fuerza ortodóncica de compresión y durante la recidiva *in vitro*, encontrando que la expresión de distintas isoformas de esta proteína se regulaba negativamente durante la aplicación de fuerza y positivamente durante la recidiva (además de que su inhibición producía supresión de la recidiva y la recuperación del colágeno). En resumen, en este artículo los investigadores pudieron concluir que las PDLSCs poseen una estabilidad intrínseca que les permite contribuir a la recidiva temprana para regenerar el PDL una vez que se detiene la aplicación de fuerzas ortodóncicas, todo lo cual podría estar regulado por la ruta TGF- β /Smad³¹.

6.2. Hipoxia

La hipoxia, característica distintiva de muchas patologías humanas, es otro reconocido regulador de la remodelación ósea desde hace mucho tiempo⁷⁵. Un ambiente hipóxico afecta a la supervivencia celular e inicia la angiogénesis por un mecanismo complejo que consta de múltiples pasos⁷⁶. Concretamente durante la remodelación ósea, un factor fundamental es que la osteogénesis debe ir acompañada por una formación de nuevos vasos sanguíneos que aseguren la suficiente irrigación del nuevo tejido. En la coordinación de estos procesos, las células endoteliales (ECs) situadas en la interfaz entre la sangre y el tejido, participan activamente⁷⁷. Las MSCs se encuentran normalmente en su nicho fisiológico rodeadas de microvasculatura, que contiene grandes cantidades de ECs vasculares (VECs)^{78,79}; durante la remodelación ósea, existe una comunicación entre VECs y progenitores óseos y OBs en el nicho vascular⁸⁰, durante la cual las MSCs pueden generar señales angiogénicas para reclutar nuevos vasos sanguíneos al hueso mientras que señales recíprocas que emanan del endotelio vascular en formación promueven la especificación de las células madre⁸¹. En este proceso de acoplamiento de formación de vasos sanguíneos y hueso, orquestado por células madre y VECs, la hipoxia es la principal fuerza motriz⁸².

Cuando se aplica una fuerza ortodóncica, el sistema vascular del PDL se bloquea gradualmente, lo que resulta en perturbaciones circulatorias que dan lugar a isquemia e hipoxia local en el lado de compresión⁸³. Este microambiente bajo en oxígeno produce la activación del factor inducible por hipoxia 1 α (HIF-1 α ; un factor de transcripción maestro en situaciones de hipoxia), y regula la resorción ósea a través de la regulación positiva de la diferenciación y actividad de OCs^{75,84}. Más recientemente, se relacionó a HIF-1 α con la regulación positiva de la expresión de RANKL en PDLSCs⁸⁵, y se demostró que su inhibición ralentizaba el OTM⁸⁶.

El tejido periodontal hipóxico regula positivamente la expresión de varias citoquinas y factores de crecimiento, entre los que se encuentran el factor de crecimiento vascular-endotelial (VEGF), la IL-1 β , IL-6 y la prostaglandina E₂ (PGE₂). De entre estos, VEGF es la diana directa de HIF-1 α , y estimula la remodelación ósea del hueso alveolar afectando a OBs y precursores de OCs. Su expresión puede verse inducida por la PGE₂⁸⁷. Como se ha citado anteriormente, la hipoxia está implicada en el proceso de acoplamiento de la angiogénesis y de la osteogénesis durante la reparación del hueso⁸⁸. Tras la estimulación de HIF-1 α , los OBs y las ECs secretan una gran cantidad de PGE₂ y de VEGF que actúan directamente en los OBs para inducir osteogénesis y en las ECs para inducir angiogénesis, e indirectamente promoviendo la osteogénesis aumentando el suministro de células madre multipotentes, factores de crecimiento osteogénicos y nutrientes al sitio de remodelación ósea⁸⁹.

Con el objetivo de estudiar los efectos de VECs en la diferenciación osteogénica, la mineralización y la función paracrina en un sistema de cocultivo de no contacto con PDLSCs *in vitro* bajo hipoxia (2% O₂) para simular las relaciones espaciales de ambos tipos de células en el nicho vascular durante la regeneración periodontal, *Wu et al.* llevaron a cabo una serie de experimentos en 2013. Además, dicho estudio también proponía revelar el papel de las rutas de quinasas MEK/ERK y p38 MAPK en el proceso. Los autores observaron que en condiciones de cocultivo (sin contacto), comparado con PDLSCs cultivadas por separado, había un mayor incremento de la diferenciación osteogénica de PDLSCs. Este hecho se manifiesta en una elevada actividad de ALP y altos niveles de Runx2 y Sp7 a nivel transcripcional y traduccional, así como una mayor acumulación de PGE₂ y VEGF secretados en el medio de cocultivo y mayor formación de nódulos mineralizados. Además, en estas condiciones de cocultivo bajo hipoxia, tanto ERK1/2 como p38 MAPK son reguladas positivamente, aunque ERK1/2 se fosforila de manera rápida pero temporal, mientras que p38 MAPK es activada de manera más lenta pero duradera.

Para confirmar aún más estos resultados, la inhibición de estas rutas da lugar a la supresión de factores de transcripción estimulados por hipoxia y de reguladores de la osteogénesis (ALP, Runx2, Sp7, HIF-1 α , PGE₂ y VEGF. En conclusión, la exposición de PDLSCs a hipoxia en un cocultivo con VECs activa de manera significativa las cascadas de señalización MEK/ERK y p38 MAPK, que estimulan la expresión de factores de transcripción capaces de regular positivamente genes de regulación de la osteogénesis y la formación de nódulos mineralizados. En este modelo, la secreción de PGE₂ y VEGF facilita la comunicación entre PDLSCs y VECs (que promueve la diferenciación del primer tipo celular a osteoblastos⁸²). La familia MAPK incluye a p38 MAPK, JNK y ERK⁹⁰, siendo la señalización por MAPK esencial para el proceso de diferenciación osteoblástica, y especificación de MSCs^{91,92}. De entre estas tres rutas, ERK está involucrada en la diferenciación osteogénica de las MSCs inducida por la matriz extracelular (a través de la fosforilación de Runx2), mientras que p38 MAPK responde a estímulos ambientales, como el estrés oxidativo^{92,93}. En este estudio, ambas rutas mostraron distintos patrones espacio-temporales de activación, lo que responde a las diferencias de las rutas en cuanto naturaleza del estímulo y tipo celular⁸².

La evidencia en la literatura ha sugerido hasta hace poco que tanto la fuerza mecánica como la hipoxia existen de manera simultánea en el lado de compresión y juegan papeles importantes durante remodelación ósea en el OTM. Sin embargo, no había prueba de efectos combinatorios de ambos en la formación de OCs hasta la publicación de un artículo al respecto por *Li et al.* (2016). En dicho estudio, se empleó tanto un modelo tridimensional de andamiaje de PLGA (ácido poli(láctico-co-glicólico)) sembrado con PDLSCs humanas simulando la estructura del PDL,

como un sistema de cocultivo de OBs con precursores de OCs (ambos de origen de rata) cuyo medio era el de las PDLSCs humanas del modelo anterior, para estudiar los efectos aislados y combinados de compresión e hipoxia (2% O₂) en la osteoclastogénesis inducida por PDLs. Como resultado, estos investigadores reportaron que cualquiera de los dos fenómenos por separado regula positivamente y de manera significativa la expresión génica de citoquinas pro-osteoclastogénicas como COX-2, IL-1 β o VEGF en el modelo tridimensional *in vitro*, efecto que se vio incrementado con la combinación de ambos²⁶. El estudio demuestra que el incremento de la expresión de estos factores proinflamatorios se debe a la elevación de los niveles de especies reactivas de oxígeno (radicales libres) por hipoxia o compresión, que promueve la migración del factor de necrosis kappa B (NK- κ B) al núcleo. De hecho, los mecanismos de osteoclastogénesis regulada por hipoxia y compresión tienen a NK- κ B como punto de solapamiento. Además, se observó que la hipoxia incrementaba la expresión de RANKL (comparado con la compresión), en una manera directamente proporcional al tiempo transcurrido, y reduce la OPG únicamente a corto plazo²⁶. Interesantemente, los factores proinflamatorios mencionados anteriormente (COX-2, IL-1 β o VEGF) también son, de acuerdo a la literatura, reguladores positivos de RANKL en PDLs, OBs y células estromales, y promueven el reclutamiento de monocitos para posteriormente diferenciarse a OCs⁹⁴⁻⁹⁸. En contraste a lo ocurrido bajo hipoxia, se encontró que la compresión reducía la expresión de OPG inicialmente para luego producir un incremento significativo de la misma a largo plazo. Solamente en el caso de la hipoxia se observó un efecto sobre HIF-1 α . Además, los resultados del estudio sugerían que la aportación de la hipoxia a la osteoclastogénesis en el OTM es menos inmediata pero más duradera que la de las fuerzas de compresión. Adicionalmente, este estudio subraya que las condiciones de hipoxia, a la vez que mejoran el ratio RANKL/OPG, también aceleran la remodelación del hueso alveolar mediante la promoción de diferenciación osteogénica de PDLs. En el sistema de cocultivo en el anterior estudio, los OBs y los precursores de los OCs (de rata) se cultivaron en condiciones normóxicas (sin hipoxia, normal), como las que se encuentran en el lado de tensión del PDL durante el OTM (lado en el que no se obstruyen los vasos). Al añadir el medio de PDLSCs humanas del experimento anterior a este cocultivo, se consiguió la producción de osteoclastos maduros, reforzando aún más los resultados del estudio. En resumen, se demostró que tanto la compresión como la hipoxia tienen roles independientes y efectos combinativos en la osteoclastogénesis inducida por las PDLs en el lado de compresión del PDL durante el OTM (Fig. 2)²⁶.

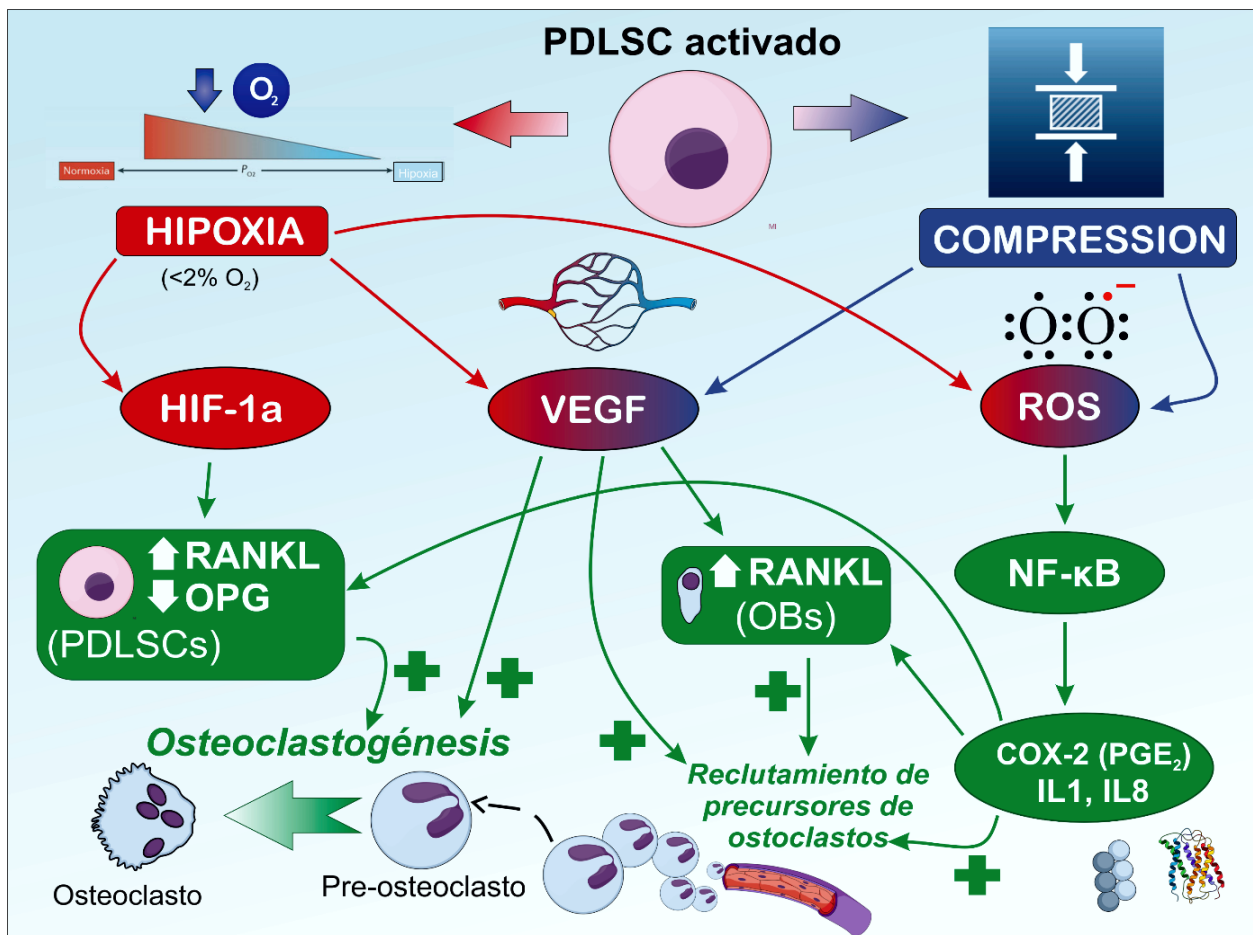


Figura 3: Rutas involucradas en la regulación de la osteoclastogénesis por células madre del ligamento periodontal (PDLSCs) bajo hipoxia y fuerzas ortodónicas de compresión. Ambos estímulos se encuentran presentes en el lado de compresión del ligamento periodontal (PDL) durante el movimiento dentario ortodónico, y juegan roles independientes con efectos combinativos en la osteoclastogénesis inducida por PDLSCs. Adaptado de Li *et al.* (2016)²⁶. (COX-2: ciclooxigenasa 2; HIF-1a: factor inducible por hipoxia 1 alfa; IL: interleuquina; OB: osteoblasto; OPG: osteoprotegerina; PGE₂: prostaglandina E2; RANKL: ligando del receptor activador para el NF-κB; ROS: especies reactivas de oxígeno; NF-κB: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular).

6.3. Sulfuro de hidrógeno (H₂S): regulador paracrino de la actividad osteoclástica.

Como se ha mencionado anteriormente en esta revisión, tanto las MSCs como las PDLSCs poseen la capacidad de ejercer efectos autocrinos y paracrinos en células del microambiente del PDL mediante secreción de ciertos factores. Hasta ahora, en este trabajo se han mencionado las BMPs (en concreto BMP-2), VEGF, PGE₂ u OPG; el objetivo de esta sección es el de cubrir diferentes efectos de otros factores secretados por las PDLSCs y las PDLs en la remodelación ósea del hueso alveolar durante el OTM, los cuales no se han descrito hasta ahora.

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es una molécula inorgánica, incolora y en forma gaseosa, que actúa de gasotransmisor regulando diversas rutas en las células de los mamíferos^{99,100}. En estudios recientes se ha demostrado que las MSCs también pueden producir H₂S de manera endógena, regulando la autorrenovación y diferenciación de las MSCs para mantener la homeostasis del hueso^{101,102}. Además, también se ha reportado que las PDLSCs expresan 2 enzimas generadoras

de H₂S: cistationina β-sintasa (CBS) y cistationina γ-liasa, teniendo capacidad de producir H₂S para regular su proliferación y diferenciación¹⁰³.

En un estudio de *Liu et al.* publicado en 2017, se demuestra la producción de H₂S por las PDLSCs inducida por fuerzas mecánicas, regulando la remodelación ósea y el OTM, usando tanto modelos *in vivo* (ratones) como un cocultivo de células mononucleares de la sangre periférica y de PDLSCs *in vitro* (células de ratón). En el artículo se describe cómo la fuerza ortodóncica induce la producción de H₂S a través de las PDLSCs *in vivo* durante el OTM, que se encontró asociada a una actividad osteoclástica en torno al hueso alveolar. Un análisis más profundo reveló que esta producción incrementada de H₂S es causada por regulación positiva de la CBS en respuesta a una fuerza compresiva estática (de manera proporcional a la magnitud y tiempo del estímulo mecánico), por lo tanto, interviene ayudando a traducir una señal mecánica a una biológica (mecanotransducción). Los autores también observaron, en el modelo *in vivo*, que la producción de H₂S afectaría al OTM promoviendo la acumulación de macrófagos/monocitos y la diferenciación osteoclástica; el primer efecto se consigue porque la producción de H₂S regula positivamente la expresión y secreción de MCP-1 por las PDLSCs (dando lugar, como se discutió anteriormente en esta revisión, al reclutamiento de monocitos al PDL, que se diferenciarán a osteoclastos si las condiciones son favorables), mientras que la diferenciación a osteoclastos en este caso sería inducida por el aumento del sistema RANKL/OPG causada por la producción de H₂S en respuesta a la fuerza de compresión. Finalmente, basándose en los datos del artículo donde el incremento de H₂S endógeno reguló también positivamente la osteogénesis mientras que la disminución del gas la reprimió, los autores del estudio apuntan a la posibilidad de que el H₂S también influya a las células osteogénicas en el OTM, lo que respalda el papel de este gas como promotor de la remodelación del hueso alveolar durante el mismo¹⁰⁴.

6.4. Micro-ARNs (miARNs): activación/inhibición de OTM a nivel postranscripcional

Los miARNs son una clase de ARN pequeño no codificante que contiene una media de 22-25 nucleótidos y que existe en organismos eucariotas, y que pueden inducir degradación o represión traslacional de diferentes ARN mensajeros, regulando la expresión génica a nivel postranscripcional¹⁰⁵. En este contexto, se han identificado múltiples miARNs que participan en la diferenciación osteogénica^{106,107}. Sorprendentemente, se predice que los miARNs regulan la expresión de más de un tercio de ARN mensajeros en humanos¹⁰⁸. Los miARNs pueden ser mecanosensibles, respondiendo a estímulos mecánicos en las PDLs y en concreto en las PDLSCs^{109,110}. En estudios previos a esta revisión, se ha demostrado mediante experimentos con *microarrays* que existen al menos 53 miARNs expresados diferencialmente cuando las PDLSCs

son sometidos a fuerzas mecánicas¹⁰⁹, de entre los cuales se incluirán dos ejemplos en esta sección. El conocimiento de los mecanismos de regulación del OTM y de las PDLSCs por miARNs podría suponer la aparición, en un futuro, de métodos basados en miARNs para manipular el OTM o prevenir la pérdida de hueso inducida por periodontitis¹¹¹.

El primero de estos ejemplos es miR-21. En un estudio de 2016, *Chen et al.* estudiaron la hipótesis de que este miARN es un regulador del OTM y de la remodelación del hueso alveolar en condiciones normales e inflamatorias. En un cultivo de PDLSCs humanas los autores observaron que miR-21 inducido por fuerza ortodóncica en el tejido periodontal regulaba la osteogénesis de PDLSCs, mientras que en un modelo *in vivo* de OTM (ratón), los autores observaron que miR-21 es capaz de responder a fuerzas ortodóncicas y así mediar en el OTM mediante la regulación de la osteoblastogénesis (incremento de expresión de Runx2 y ALP) y la remodelación de hueso alveolar. En cuanto al lado de compresión, en el artículo se describe como la deficiencia de miR-21 en el modelo murino bloquea la resorción de hueso alveolar y el proceso de osteoclastogénesis (efecto constitutivo en condiciones fisiológicas, pero más pronunciado durante el OTM)¹¹¹. El mecanismo de regulación de la remodelación del hueso alveolar por miR-21 se dilucidó mediante el examen de 7 dianas potenciales de miR-21, de entre las cuales se seleccionó *Pdcd4*¹¹² (ARNm del gen *Pdcd4*), dado que su expresión se regula negativamente en el tejido periodontal siguiendo el OTM, lo que se confirmó a nivel transcripcional y traduccional. La regulación negativa de *Pdcd4* por miR-21 durante el OTM resulta finalmente en un incremento de expresión de la proteína C-fos. Por último, en PDLSCs aisladas de tejido periodontal de pacientes con periodontitis (microambiente inflamatorio) los investigadores observaron que miR-21 también media el OTM y la destrucción de hueso alveolar. Por lo tanto, miR-21 actúa tanto en el lado de tensión del PDL (donde promueve la osteoblastogénesis y la osteogénesis a largo plazo aún cuando se retira la fuerza ortodóncica, lo que podría indicar modificación epigenética de las PDLSCs) como en el lado de compresión, donde incrementa la osteoclastogénesis y la resorción del hueso alveolar de manera independiente al ratio RANKL/OPG¹¹¹.

El segundo ejemplo de los anteriormente mencionados es miR-503-5p, examinado en el estudio de *Liu et al.* (2017). En este trabajo se usó un *microarray* de miARN para buscar candidatos mecanosensibles en el contexto de diferenciación de PDLSCs, identificando hasta 9 miARNs expresados de manera diferencial en células bajo estímulos mecánicos y células no estimuladas, de entre los cuales se seleccionó a miR-503-5p por ser el afectado de manera más significativa.

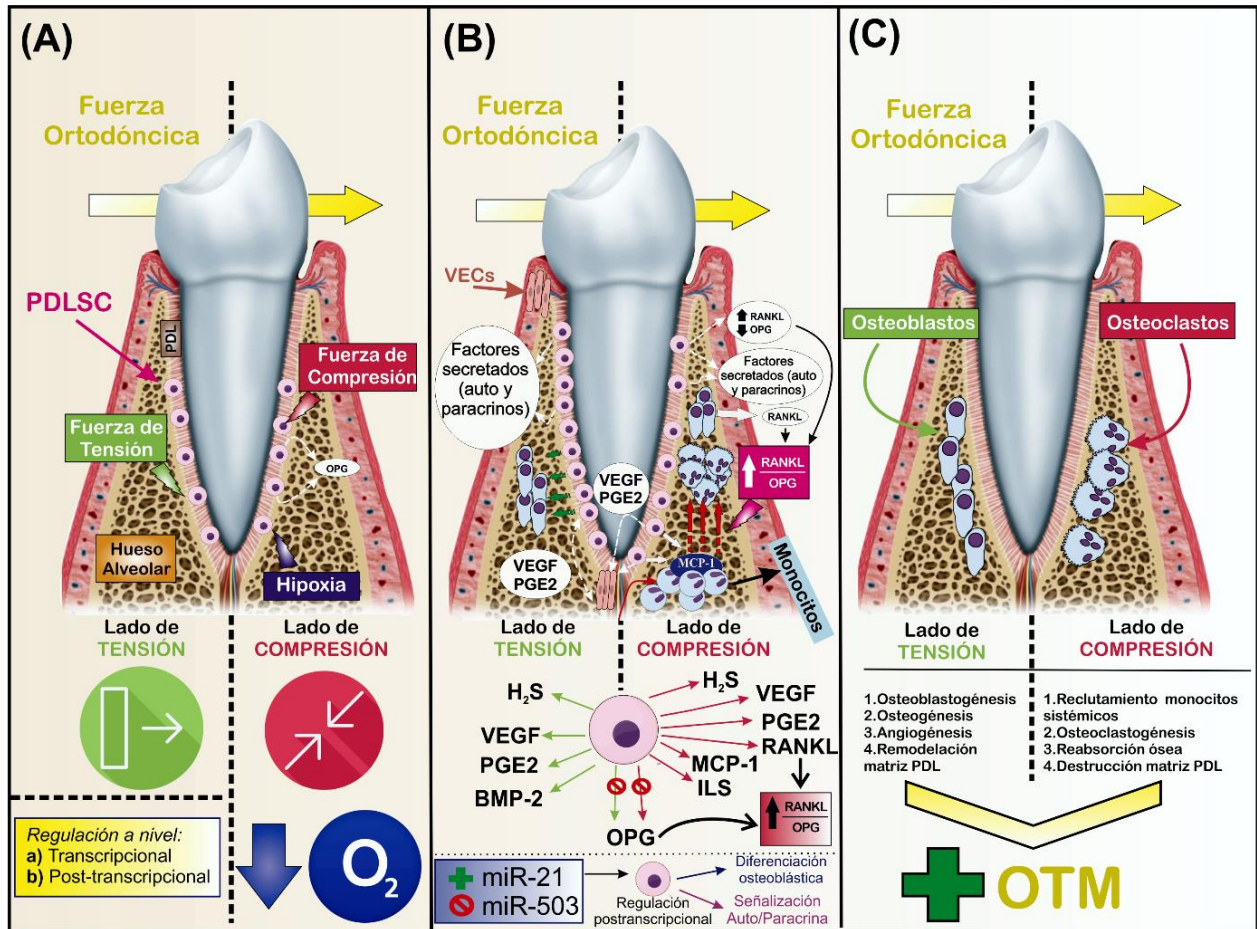


Figura 3: Secuencia de los mecanismos mediante los cuales las células madre del ligamento periodontal controlan el movimiento dentario ortodóncico (OTM). (A) Ante aplicación de una fuerza ortodóncica sobre la pieza dentaria, aparecen distintos estímulos tanto mecánicos (fuerzas de tensión y de compresión en lados opuesto del ligamento periodontal) como ambientales (hipoxia) que producen la activación de las células madre del ligamento periodontal (PDLSCs), promoviendo una serie de respuestas basadas en regulación de la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional. (B) En el lado de tensión, las PDLSCs sufren diferenciación osteogénica dando lugar a osteoblastos (OBs), y secretan una serie de factores [H₂S, proteína morfogénica de hueso 2 (BMP-2)] que actúan tanto de manera autocrina como paracrina. En el lado de compresión también ocurre dicha secreción de ciertos mediadores paracrinos, incluyendo la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) que resulta en reclutamiento de monocitos sistémicos a ese lado del ligamento periodontal (PDL). La secreción de RANKL por PDLSCs, OBs y células estromales, así como la reducción de secreción de OPG por PDLSCs produce un incremento del ratio RANKL/OPG que da lugar a la diferenciación osteoclástica de los monocitos reclutados en el lado de compresión. La intercomunicación entre PDLSCs y células endoteliales vasculares (VECs) mediante VEGF y PGE2 potencia la osteogénesis y el acoplamiento de la misma con angiogénesis en el lado de tensión. Como parte de la respuesta de los PDLSCs se regulan positiva y negativamente ciertos microARNs posibilitando la acción directa (diferenciación) e indirecta (factores paracrinos) de los PDLSCs en el OTM (C) Como resultado, existe un balance mediante el cual en el lado de tensión los OBs crean nuevo tejido óseo mientras que en el de compresión los OCs llevan a cabo resorción ósea. Todo esto, acompañado de remodelación de la matriz de colágeno del PDL por PDLSCs y de angiogénesis para irrigar el nuevo tejido, promueve el OTM. (IL; interleuquina; OPG; osteoprotegerina; PGE2: prostaglandina E2; RANKL: ligando del receptor activador para el NF-κB; ROS; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular)

En concreto, miR-503-5p es regulado negativamente de manera muy drástica durante diferenciación osteogénica inducida por un estímulo mecánico. Además, en el estudio se exploró la función de este miARN durante la diferenciación osteogénica en respuesta a una fuerza mecánica de tensión *in vitro* e *in vivo*. *In vitro*, los investigadores demostraron que miR-503-5p regula negativamente la diferenciación osteogénica en PDLSCs de rata sometidas a estrés

mecánico (medido por actividad de ALP y expresión de Runx2); *in vivo* (en un modelo de rata de OTM sometido a fuerza ortodóncica por 14 días), se observó que miR-503-5p es capaz de contrarrestar la formación de hueso inducida por estrés mecánico (con menor expresión de Runx2 y ALP y menor número de osteoblastos y formación de hueso en el lado de tensión de PDL). En resumen, el estudio concluye que miR-503-5p es un regulador negativo de la diferenciación osteogénica de las PDLSCs y de la formación de hueso en el lado de tensión del PDL en respuesta a fuerzas mecánicas¹¹³. Curiosamente, estudios previos ya habían indicado que miR-503 participaba en el metabolismo óseo como regulador negativo de la osteoclastogénesis al reprimir la expresión de RANKL, inhibiendo la formación de OCs y la pérdida de hueso alveolar en el lado de compresión. Por tanto, miR-503 actuaría como inhibidor de tanto la formación como destrucción de hueso alveolar en respuesta a fuerzas ortodóncicas durante el OTM¹¹⁴.

7. CONCLUSIONES

Las conclusiones extraídas mediante esta revisión bibliográfica se exponen a continuación, y son resumidas en la *Figura 3*:

- I. Durante el movimiento dentario ortodóncico hay una remodelación del ligamento periodontal y del hueso alveolar (llevada a cabo por osteoblastos y osteoclastos), durante el cual la pieza dentaria se mueve a una nueva posición periodontal formada por resorción ósea en el lado de compresión y formación de hueso en el lado de tensión. Este proceso se encuentra orquestado por las células madre del ligamento periodontal, que intervienen tanto de manera directa como indirecta (regulación por señales paracrinas).
- II. Ante fuerzas mecánicas de tensión (en el lado de tensión), las células madre del ligamento periodontal se diferencian en osteoblastos, favoreciéndose la osteoblastogénesis y con ello la osteogénesis. No obstante, cuando se excede el límite de fuerza mecánica (con elevadas fuerzas ortodóncicas), la diferenciación osteogénica de las células madre del ligamento periodontal (y la formación de nuevo hueso) se inhibe.
- III. Ante fuerzas mecánicas de compresión (en el lado de compresión), las células madre del ligamento periodontal se activan, se secreta MCP-1 (proteína) que es una de las responsables del reclutamiento regional de monocitos inflamatorios sistémicos al ligamento periodontal. Como resultado de la activación de las células madre del ligamento periodontal ante fuerzas de compresión también se aumenta el ratio RANKL/OPG que produce la diferenciación de los monocitos reclutados a osteoclastos, favoreciendo la osteoclastogénesis y con ello la resorción ósea.

- IV. La ruta Wnt/ β -catenina mantiene la homeostasis ósea durante el movimiento dentario ortodónico al regular el balance entre actividad osteoblástica y osteoclástica.
- V. Es de vital importancia tener precaución a la hora de aplicar fuerzas ortodónicas frecuentes en pacientes que tengan enfermedades sistémicas ya que el sistema inmunitario participa de forma activa y sistémica en los procesos que desencadenan este tipo de fuerzas.
- VI. Cuando se interrumpe una fuerza ortodónica, el ligamento periodontal puede regenerarse y los dientes recolocados recidivar a la posición anterior (recidiva temprana). Esta recidiva se ve favorecida por la presencia de células madre del ligamento periodontal que producen Col-I por un mecanismo regulado por la ruta TGF- β /Smad.
- VII. La hipoxia local presente en el lado de compresión del ligamento periodontal durante el movimiento dentario ortodónico es un factor promotor de resorción ósea del hueso alveolar. En ese lado, tanto la compresión como la hipoxia tienen roles independientes y efectos combinativos en el inicio de la osteoclastogénesis inducida por las células del ligamento periodontal durante el movimiento dentario ortodónico.
- VIII. Estas condiciones hipóxicas también son determinantes en la formación de hueso alveolar en el lado de tensión. La hipoxia inicia una intercomunicación (basada en señales paracrinas) entre células madre del ligamento periodontal, osteoblastos y células endoteliales vasculares para acoplar la formación de nuevo hueso alveolar a la neoangiogénesis o formación de nuevos vasos sanguíneos que irrigen el nuevo tejido.
- IX. Existen miARNs que actúan como reguladores positivos o negativos del movimiento dentario ortodónico a nivel postranscripcional. miR-21 favorece tanto la osteoblastogénesis como la osteoclastogénesis en los lados de tensión y compresión, respectivamente. miR-503-5p inhibe tanto la osteoblastogénesis como la osteoclastogénesis en los lados de tensión y compresión, respectivamente. Por tanto, miR-21 es un promotor de la remodelación del hueso durante el movimiento dentario ortodónico, mientras que miR-503-5p es un inhibidor.
- X. Ante fuerzas producidas en el movimiento dentario ortodónico, el sulfuro de hidrógeno favorece la osteoclastogénesis en el lado de compresión regulando positivamente a MCP-1 (atrae monocitos) y aumentando el ratio RANKL/OPG (favorece la diferenciación de monocitos a osteoclastos), mientras que en el lado de tensión se ha visto que es posible que favorezca la osteogénesis. Por tanto, el sulfuro de hidrógeno se presenta como un promotor de la remodelación del hueso durante el movimiento dentario ortodónico.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Mummery C, Stolpe A Van de, Roelen BAJ, Clevers H. Stem Cells. Scientific Facts and Fiction. Second. 2014. 70-73 p.
2. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* (80-). 1998 Nov;282(5391):1145 LP-1147.
3. Vass A. US scientists clone first human embryo. *BMJ Br Med J*. 2001 Dec;323(7324):1267.
4. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*. 2006 Mar;126(4):663–76.
5. Robinton DA, Daley GQ. The promise of induced pluripotent stem cells in research and therapy. *Nature*. 2012 Jan;481:295.
6. Chapman AR, Scala CC. Evaluating the first-in-human clinical trial of a human embryonic stem cell-based therapy. *Kennedy Inst Ethics J*. 2012 Sep;22(3):243–61.
7. Lanza R, Atala A. *Essentials of Stem Cell Biology*. 2014. 7-16 p.
8. Ilic D, Polak JM. Stem cells in regenerative medicine: introduction. *Br Med Bull*. 2011;98:117–26.
9. Ilic D, Devito L, Miere C, Codognotto S. Human embryonic and induced pluripotent stem cells in clinical trials. *Br Med Bull*. 2015;116:19–27.
10. The Nobel Assembly at Karolinska Institutet. The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012. Press Release. 2012.
11. 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 U S A*. 2003 May;100(10):5807–12.
12. Seo B-M, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahim J, et al. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 2004 Mar;364(9429):149–55.
13. Reynolds AJ, Jahoda CAB. Cultured human and rat tooth papilla cells induce hair follicle regeneration and fiber growth. *Differentiation*. 2004;72(9):566–75.
14. Morszeck C, Götz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kühn U, Möhl C, et al. Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 2005;24(2):155–65.
15. Park B-W. Dental tissues as adult stem cell source. *J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg*. 2013 Apr;39(2):41–2.
16. Trounson A, McDonald C. Stem Cell Therapies in Clinical Trials: Progress and Challenges. *Cell Stem Cell*. 2018 Mar;17(1):11–22.
17. Mohanty P, Prasad NKK, Sahoo N, Kumar G, Mohanty D, Sah S. Reforming craniofacial orthodontics via stem cells. *J Int Soc Prev Community Dent*. 2015;5(1):13–8.
18. Kasper FK. Tissue Engineering for Orthodontists: The Transforming Science Simplified. *Semin Orthod*. 2017;23(4):355–65.
19. Murphy NC, Davidovitch Z, Bissada NF, Kucska S, Dashe J, Enlow DH. Stem Cell Therapy for Orthodontists: A Conceptual Introduction. In: Vishwakarma A, Sharpe P, Shi S, Ramalingam M, editors. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*. 1st ed. Elsevier; 2014. p. 799–822.
20. Iglesias-Linares A, AM M, Yañez-Vico R, Mendoza-Mendoza A, Gonzalez-Moles M, Solano-Reina E. The use of gene therapy vs. corticotomy surgery in accelerating orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2011 Jul;14(3):138–48.
21. Iglesias-Linares A, RM Y, AM M, Mendoza-Mendoza A, Orce-Romero A, Solano-Reina E. Osteopontin gene SNPs (rs9138, rs11730582) mediate susceptibility to external root resorption in orthodontic patients. *Oral Dis*. 2013 Apr;20(3):307–12.
22. Iglesias-Linares A, Yanez-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 Nov;45(11):1018–26.
23. Frost HM. Osteoporosis: A Rationale for Further Definitions? *Calcif Tissue Int*. 1998;62(2):89–94.
24. Fushiki R, Mayahara K, Ogawa M, Takahashi Y, Karasawa Y, Tsurumachi N, et al. High-magnitude mechanical strain inhibits the differentiation of bone-forming rat calvarial progenitor cells. *Connect Tissue Res*. 2015 Jul;56(4):336–41.
25. Meikle MC. The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod*. 2006 Jun;28(3):221–40.
26. Li M Le, Yi J, Yang Y, Zhang X, Zheng W, Li Y, et al. Compression and hypoxia play independent roles while having

- combinative effects in the osteoclastogenesis induced by periodontal ligament cells. *Angle Orthod.* 2016 Jan;86(1):66–73.
27. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2006 Mar;129(4):469.e1-469.e32.
28. Butler WT, Birkedal-Hansen H, Beegle WF, Taylor RE, Chung E. Proteins of the periodontium. Identification of collagens with the [alpha1(I)]2alpha2 and [alpha1(III)]3 structures in bovine periodontal ligament. *J Biol Chem.* 1975 Dec;250(23):8907–12.
29. PER R. Ultrastructural changes of the periodontal fibers and their attachment in rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *Eur J Oral Sci.* 1973 Oct;81(6):467–80.
30. Bumann A, Carvalho RS, Schwarzer CL, Yen EH. Collagen synthesis from human PDL cells following orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 1997 Feb;19(1):29–37.
31. Feng L, Yang R, Liu D, Wang X, Song Y, Cao H, et al. PDL Progenitor-Mediated PDL Recovery Contributes to Orthodontic Relapse. *J Dent Res.* 2016 May;95(9):1049–56.
32. Beertsen W. Migration of fibroblasts in the periodontal ligament of the mouse incisor as revealed by autoradiography. *Arch Oral Biol.* 1975;20(10):659–IN19.
33. Sodek J. A new approach to assessing collagen turnover by using a micro-assay. A highly efficient and rapid turnover of collagen in rat periodontal tissues. *Biochem J.* 1976 Nov;160(2):243–6.
34. Zhang L, Liu W, Zhao J, Ma X, Shen L, Zhang Y, et al. Mechanical stress regulates osteogenic differentiation and RANKL/OPG ratio in periodontal ligament stem cells by the Wnt/ β -catenin pathway. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj.* 2016;1860(10):2211–9.
35. Shen T, Qiu L, Chang H, Yang Y, Jian C, Xiong J, et al. Cyclic tension promotes osteogenic differentiation in human periodontal ligament stem cells. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014 Oct;7(11):7872–80.
36. Liu J, Li Q, Liu S, Gao J, Qin W, Song Y, et al. Periodontal Ligament Stem Cells in the Periodontitis Microenvironment Are Sensitive to Static Mechanical Strain. *Stem Cells Int.* 2008 Feb;1380851.
37. Naohisa W, Danijela M, Songtao S, Mark BP, Stan G. Immunomodulatory properties of human periodontal ligament stem cells. *J Cell Physiol.* 2009 Jan;219(3):667–76.
38. Huang GT-J, 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 Sep;88(9):792–806.
39. Li C, Li G, Liu M, Zhou T, Zhou H. Paracrine effect of inflammatory cytokine-activated bone marrow mesenchymal stem cells and its role in osteoblast function. *J Biosci Bioeng.* 2016;121(2):213–9.
40. Eom YW, Oh J-E, Lee JI, Baik SK, Rhee K-J, Shin HC, et al. The role of growth factors in maintenance of stemness in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;445(1):16–22.
41. Veerle B, Ton S, J. de VT, Vincent E. Direct cell–cell contact between periodontal ligament fibroblasts and osteoclast precursors synergistically increases the expression of genes related to osteoclastogenesis. *J Cell Physiol.* 2006 Nov;222(3):565–73.
42. Wise GE, King GJ. Mechanisms of Tooth Eruption and Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res.* 2008 May;87(5):414–34.
43. Nayak BN, Wiltshire WA, Ganss B, Tenenbaum H, McCulloch CAG, Lekic C. Healing of Periodontal Tissues Following Transplantation of Cells in a Rat Orthodontic Tooth Movement Model. *Angle Orthod.* 2008 Sep;78(5):826–31.
44. Han M-J, Seo Y-K, Yoon H-H, Song K-Y, Park J-K. Effect of mechanical tension on the human dental pulp cells. *Biotechnol Bioprocess Eng.* 2008;13(4):410–7.
45. Jianying Z, H-C. WJ. Mechanobiological response of tendon stem cells: Implications of tendon homeostasis and pathogenesis of tendinopathy. *J Orthop Res.* 2009 Nov;28(5):639–43.
46. Wang JH-C, Thampatty BP. An introductory review of cell mechanobiology. *Biomech Model Mechanobiol.* 2006 Mar;5(1):1–16.
47. Komori T, Yagi H, Nomura S, Yamaguchi A, Sasaki K, Deguchi K, et al. Targeted Disruption of *Cbfa1* Results in a Complete Lack of Bone Formation owing to Maturational Arrest of Osteoblasts. *Cell.* 1997 Mar;89(5):755–64.
48. Komori T. Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2 BT - Osteoimmunology. In: Choi Y, editor. Boston, MA: Springer US; 2010. p. 43–9.
49. Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT. Transcription Factor Runx2 and its Application to Bone Tissue Engineering. *Stem*

Cell Rev Reports. 2012;8(3):891–7.

50. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/Cbfa1: A Transcriptional Activator of Osteoblast Differentiation.* Cell. 1997 Mar;89(5):747–54.
51. Otto F, Thornell AP, Crompton T, Denzel A, Gilmour KC, Rosewell IR, et al. *Cbfa1, a Candidate Gene for Cleidocranial Dysplasia Syndrome, Is Essential for Osteoblast Differentiation and Bone Development.* Cell. 1997 Mar;89(5):765–71.
52. Charlotte W, Lovisa H, Pernilla L, Sonia M, Sonoko N, H. LU, et al. *Functional Characterization of Osteoblasts and Osteoclasts from Alkaline Phosphatase Knockout Mice.* J Bone Miner Res. 2009 Dec;15(10):1879–88.
53. Narisawa S, Yadav MC, Millán JL. *In Vivo Overexpression of Tissue-Nonspecific Alkaline Phosphatase Increases Skeletal Mineralization and Affects the Phosphorylation Status of Osteopontin.* J Bone Miner Res. 2013 Jul;28(7):1587–98.
54. zur Nieden NI, Kempka G, Ahr HJ. *In vitro differentiation of embryonic stem cells into mineralized osteoblasts.* Differentiation. 2003;71(1):18–27.
55. Cao X, Chen D. *The BMP signaling and in vivo bone formation.* Gene. 2005 Aug;357(1):1–8.
56. Canalis E, Economides AN, Gaggero E. *Bone Morphogenetic Proteins, Their Antagonists, and the Skeleton.* Endocr Rev. 2003 Apr;24(2):218–35.
57. Hanai J, Chen LF, Kanno T, Ohtani-Fujita N, Kim WY, Guo W-H, et al. *Interaction and Functional Cooperation of PEBP2/CBF with Smads: Synergistic induction of the immunoglobulin germline $C\alpha$ Promoter .* J Biol Chem . 1999 Oct;274(44):31577–82.
58. Nishimura R, Hata K, Harris SE, Ikeda F, Yoneda T. *Core-binding factor β (Cbfa1) induces osteoblastic differentiation of C2C12 cells without interactions with Smad1 and Smad5.* Bone. 2018 Mar;31(2):303–12.
59. Cheng S-L, Shao J-S, Charlton-Kachigian N, Loewy AP, Towler DA. *Msx2 Promotes Osteogenesis and Suppresses Adipogenic Differentiation of Multipotent Mesenchymal Progenitors.* J Biol Chem . 2003 Nov;278(46):45969–77.
60. Ichida F, Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Ikeda F, Hisada K, et al. *Reciprocal Roles of Msx2 in Regulation of Osteoblast and Adipocyte Differentiation.* J Biol Chem . 2004 Aug;279(32):34015–22.
61. Newberry EP, Boudreaux JM, Towler DA. *Stimulus-selective Inhibition of Rat Osteocalcin Promoter Induction and Protein-DNA Interactions by the Homeodomain Repressor Msx2.* J Biol Chem . 1997 Nov;272(47):29607–13.
62. Ryoo H-M, Lee M-H, Kim Y-J. *Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells.* Gene. 2006;366(1):51–7.
63. Mirzayans F, Lavy R, Penner-Chea J, Berry FB. *Initiation of Early Osteoblast Differentiation Events through the Direct Transcriptional Regulation of Msx2 by FOXC1.* Kume T, editor. PLoS One. 2012 Nov;7(11):e49095.
64. 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 Mar;80(3):887–91.
65. Li Y, Zheng W, Liu J-S, Wang J, Yang P, Li M-L, et al. *Expression of Osteoclastogenesis Inducers in a Tissue Model of Periodontal Ligament under Compression.* J Dent Res. 2010 Oct;90(1):115–20.
66. Yoon-Ah K, Sun-Kyung L, Dae-Hyung S, Youngho K, Kyung-Hwa K, Jin-Hyung C, et al. *Effects of substance P on osteoblastic differentiation and heme oxygenase-1 in human periodontal ligament cells.* Cell Biol Int. 2013 Jan;33(3):424–8.
67. Ito R, Matsumiya T, Kon T, Narita N, Kubota K, Sakaki H, et al. *Periosteum-derived cells respond to mechanical stretch and activate Wnt and BMP signaling pathways.* Biomed Res. 2014;35(1):69–79.
68. Qin Y-X, Hu M. *Mechanotransduction in Musculoskeletal Tissue Regeneration: Effects of Fluid Flow, Loading, and Cellular-Molecular Pathways.* Biomed Res Int. 2014 Aug;2014:863421.
69. Xie R, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. *Osteoclast differentiation during experimental tooth movement by a short-term force application: An immunohistochemical study in rats.* Acta Odontol Scand. 2008 Jan;66(5):314–20.
70. Matsuzaki K, Udagawa N, Takahashi N, Yamaguchi K, Yasuda H, Shima N, et al. *Osteoclast Differentiation Factor (ODF) Induces Osteoclast-like Cell Formation in Human Peripheral Blood Mononuclear Cell Cultures.* Biochem Biophys Res Commun. 1998;246(1):199–204.
71. Zeng M, Kou X, Yang R, Liu D, Wang X, Song Y, et al. *Orthodontic Force Induces Systemic Inflammatory Monocyte Responses.* J Dent Res. 2015 Jun;94(9):1295–302.

72. Madureira DF, Taddei S de A, Abreu MHNG, Pretti H, Lages EMB, da Silva TA. Kinetics of interleukin-6 and chemokine ligands 2 and 3 expression of periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2012 Mar;142(4):494–500.
73. Taddei SR de A, Andrade Jr. I, Queiroz-Junior CM, Garlet TP, Garlet GP, Cunha F de Q, et al. Role of CCR2 in orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2012 Mar;141(2):153–160.e1.
74. Yoshida Y, Sasaki T, Yokoya K, Hiraide T, Shibasaki Y. Cellular roles in relapse processes of experimentally-moved rat molars. *J Electron Microsc (Tokyo)*. 1999;48(2):147–57.
75. R. AT, C. GD, C. UJ, R. OI, Astrid H, Martin R, et al. Hypoxia is a major stimulator of osteoclast formation and bone resorption. *J Cell Physiol*. 2003 May;196(1):2–8.
76. Sébastien P, Hélène D, Edouard D, Marc D, Valéry D, Noëlle N, et al. Up-regulation of 94-kDa glucose-regulated protein by hypoxia-inducible factor-1 in human endothelial cells in response to hypoxia. *FEBS Lett*. 2004 Nov;579(1):105–14.
77. Flamant L, Toffoli S, Raes M, Michiels C. Hypoxia regulates inflammatory gene expression in endothelial cells. *Exp Cell Res*. 2009;315(5):733–47.
78. Scadden DT. The stem-cell niche as an entity of action. *Nature*. 2006 Jun;441:1075.
79. Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov;414:98.
80. M. FC, Theodore M, Diane HU, Eytan A, A. HJ. Common Molecular Pathways in Skeletal Morphogenesis and Repair. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Feb;857(1):33–42.
81. Gerber H-P, Ferrara N. Angiogenesis and Bone Growth. *Trends Cardiovasc Med*. 2000 Mar;10(5):223–8.
82. Wu Y, Cao H, Yang Y, Zhou Y, Gu Y, Zhao X, et al. Effects of vascular endothelial cells on osteogenic differentiation of noncontact co-cultured periodontal ligament stem cells under hypoxia. *J Periodontal Res*. 2013;48(1):52–65.
83. Arai C, Nomura Y, Ishikawa M, Noda K, Choi J-W, Yashiro Y, et al. HSPA1A is upregulated in periodontal ligament at early stage of tooth movement in rats. *Histochem Cell Biol*. 2010;134(4):337–43.
84. HJ K, NA A. Hypoxia-inducible factor is expressed in giant cell tumour of bone and mediates paracrine effects of hypoxia on monocyte–osteoclast differentiation via induction of VEGF. *J Pathol*. 2008 Feb;215(1):56–66.
85. Park H-J, Baek KH, Lee H-L, Kwon A, Hwang HR, Qadir AS, et al. Hypoxia Inducible Factor-1 α Directly Induces the Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand in Periodontal Ligament Fibroblasts. *Mol Cells*. 2011 Jun;31(6):573–8.
86. Chae HS, Park H-J, Hwang HR, Kwon A, Lim W-H, Yi WJ, et al. The Effect of Antioxidants on the Production of Pro-Inflammatory Cytokines and Orthodontic Tooth Movement. *Mol Cells*. 2011 Aug;32(2):189–96.
87. Motohira H, Hayashi J, Tatsumi J, Tajima M, Sakagami H, Shin K. Hypoxia and Reoxygenation Augment Bone-Resorbing Factor Production From Human Periodontal Ligament Cells. *J Periodontol*. 2007 Aug;78(9):1803–9.
88. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, et al. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 1996 Apr;380:435.
89. Riddle RC, Khatri R, Schipani E, Clemens TL. Role of hypoxia-inducible factor-1 α in angiogenic–osteogenic coupling. *J Mol Med (Berl)*. 2009 Jun;87(6):583–90.
90. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007 May;26:3100.
91. Lou J, Tu Y, Li S, Manske PR. Involvement of ERK in BMP-2 Induced Osteoblastic Differentiation of Mesenchymal Progenitor Cell Line C3H10T1/2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000;268(3):757–62.
92. Schmidt C, Pommerenke H, Dürr F, Nebe B, Rychly J. Mechanical Stressing of Integrin Receptors Induces Enhanced Tyrosine Phosphorylation of Cytoskeletally Anchored Proteins. *J Biol Chem*. 1998 Feb;273(9):5081–5.
93. Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, Bonventre J V. MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Oct;96(22):12866–9.
94. Fukushima H, Jimi E, Okamoto F, Motokawa W, Okabe K. IL-1-induced receptor activator of NF- κ B ligand in human periodontal ligament cells involves ERK-dependent PGE2 production. *Bone*. 2005 Mar;36(2):267–75.
95. Nukaga J, Kobayashi M, Shinki T, Song H, Takada T, Takiguchi T, et al. Regulatory Effects of Interleukin-1 β and Prostaglandin E2 on Expression of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand in Human Periodontal Ligament Cells. *J Periodontol*. 2004

Feb;75(2):249–59.

96. Li X, Pilbeam CC, Pan L, Breyer RM, Raisz LG. Effects of prostaglandin E2 on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice. *Bone*. 2002 Mar;30(4):567–73.
97. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest*. 2005 Feb;115(2):282–90.
98. Janet R, J. MK, Louisa T, S. NM, D. CB, T. RC. Formation of osteoclast-like cells is suppressed by low frequency, low intensity electric fields. *J Orthop Res*. 2005 Feb;14(1):7–15.
99. Gadalla MM, Snyder SH. Hydrogen Sulfide as a Gasotransmitter. *J Neurochem*. 2010 Apr;113(1):14–26.
100. Vandiver MS, Snyder SH. Hydrogen Sulfide: A gasotransmitter of clinical relevance. *J Mol Med (Berl)*. 2012 Mar;90(3):255–63.
101. Liu Y, Yang R, Liu X, Zhou Y, Qu C, Kikuri T, et al. Hydrogen Sulfide Maintains Mesenchymal Stem Cell Function and Bone Homeostasis via Regulation of Ca(2+) Channel Sulfhydration. *Cell Stem Cell*. 2014 Jul;15(1):66–78.
102. Yang R, Liu Y, Shi S. Hydrogen Sulfide Regulates Homeostasis of Mesenchymal Stem Cells and Regulatory T Cells. *J Dent Res*. 2016 Dec;95(13):1445–51.
103. Su Y, Liu D, Liu Y, Zhang C, Wang J, Wang S. Physiologic Levels of Endogenous Hydrogen Sulfide Maintain the Proliferation and Differentiation Capacity of Periodontal Ligament Stem Cells. *J Periodontol*. 2015 Aug;86(11):1276–86.
104. Liu F, Wen F, He D, Liu D, Yang R, Wang X, et al. Force-Induced H₂S by PDLSCs Modifies Osteoclastic Activity during Tooth Movement. *J Dent Res*. 2017 Feb;96(6):694–702.
105. Ketting RF. microRNA Biogenesis and Function BT - Regulation of microRNAs. In: Großhans H, editor. New York, NY: Springer US; 2010. p. 1–14.
106. Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem Rev*. 2013 Aug;113(8):6207–33.
107. Lian JB, Stein GS, van Wijnen AJ, Stein JL, Hassan MQ, Gaur T, et al. MicroRNA control of bone formation and homeostasis. *Nat Rev Endocrinol*. 2012 Jan;8(4):212–27.
108. Isaac B. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett*. 2005 Sep;579(26):5904–10.
109. Wei FL, Wang JH, Ding G, Yang SY, Li Y, Hu YJ, et al. Mechanical Force-Induced Specific MicroRNA Expression in Human Periodontal Ligament Stem Cells. *Cells Tissues Organs*. 2014;199(5–6):353–63.
110. Chang M, Lin H, Luo M, Wang J, Han G. Integrated miRNA and mRNA expression profiling of tension force-induced bone formation in periodontal ligament cells. *Vitr Cell Dev Biol - Anim*. 2015;51(8):797–807.
111. Chen N, Sui BD, Hu CH, Cao J, Zheng CX, Hou R, et al. microRNA-21 Contributes to Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res*. 2016 Jun;95(12):1425–33.
112. Sugatani T, Vacher J, Hruska KA. A microRNA expression signature of osteoclastogenesis. *Blood*. 2011 Mar;117(13):3648–57.
113. Liu L, Liu M, Li R, Liu H, Du L, Chen H, et al. MicroRNA-503-5p inhibits stretch-induced osteogenic differentiation and bone formation. *Cell Biol Int*. 2017;41(2):112–23.
114. Chao C, Peng C, Hui X, Hou-De Z, Xian-Ping W, Er-Yuan L, et al. MiR-503 Regulates Osteoclastogenesis via Targeting RANK. *J Bone Miner Res*. 2014 Jan;29(2):338–47.
115. Forostyak O, Dayanithi G, Forostyak S. CNS Regenerative Medicine and Stem Cells. *Opera Medica Physiol*. 2016;2(1):55–62.