

Regulación genética de la aceleración biológica del movimiento dentario ortodóncico



María Cadenas de Llano Pérula

RESUMEN DE TESIS
DOCTORAL

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

Directores:

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



INDICE

1. Introducción.....	4.
2. Hipótesis.....	4.
3. Objetivos.....	6.
3.1. Objetivos Generales.....	6.
3.1. Objetivos Específicos.....	6.
4. Material y métodos.....	7.
4.1. Búsqueda Bibliográfica.....	7.
4.2. Diseño del estudio experimental.....	8.
4.3. Procesamiento y análisis muestral.....	11.
4.3.1. Extracción ARN.....	11.
4.3.2. Análisis por microarray.....	11.
4.3.3. Procedimientos histológicos.....	11.
4.4. Análisis Estadístico y Bioinformático.....	12.
5. Resultados.....	13.
5.1. Resultados de la revisión bibliográfica sistemática.....	13.
5.2. Registros clínicos de movimiento dental.....	13.
5.3. Resultados del procesado in vitro y preparación muestral.....	14.
5.3.1. Resultados del aislamiento, cuantificación y calidad del ARN.....	14.
5.3.2. Resultados del array de expresión génica tras inducir MDO.....	15.
5.3.2.1. Expresión génica a las 24 horas.....	17.
5.3.2.2. Expresión génica a los 3 días.....	17.
5.3.2.3. Expresión génica a los 7 días.....	18.
5.3.2.4. Expresión génica a los 12 días.....	18.
5.4. Resultados histológicos.....	19.
6. Discusión.....	19.
7. Conclusiones Finales.....	23.
8. Bibliografía.....	24.

1. INTRODUCCIÓN

La evolución del conocimiento acerca de las bases celulares que desencadenan el movimiento dentario ortodóncico (MDO), junto con el avance en las técnicas biomoleculares, han abierto un nuevo campo de investigación: la modulación biológica del movimiento dentario. Reducir la duración del tratamiento ortodóncico es algo que preocupa tanto al paciente como al profesional, razón por la cual, se han publicado hasta la fecha numerosas técnicas con el objetivo de acelerar biológicamente el MDO, incluyendo técnicas quirúrgicas como la corticotomía.

Sin embargo, según nuestro punto de vista, resulta imposible plantear un modelo articulado de aceleración del movimiento dentario sin previamente afianzar y comprobar las bases que ya tenemos sobre la expresión génica que controla tal proceso. Para esto, se ha realizado en el presente estudio una extensa revisión bibliográfica, repasando los procedimientos ya propuestos y evaluando su aplicación real en la práctica clínica. Al mismo tiempo, con el fin de obtener la mayor cantidad de información posible, se ha comparado la expresión génica del movimiento dentario ortodóncico normal, y acelerado mediante corticotomía. Se ha realizado un estudio animal en 28 ratas Wistar, aplicando fuerza ortodóncica entre los incisivos y molares del ambas hemimaxilas del maxilar superior, y en la mitad de ellas se ha practicado al mismo tiempo corticotomía alveolar. Se midió la cantidad de movimiento dentario y se tomaron muestras óseas para extracción de ARN y posterior análisis por microarray.

El objetivo principal de éste trabajo es establecer una línea temporal clara de lo que ocurre, genéticamente hablando, al aplicar una fuerza externa sobre los dientes y el hueso circundante; qué moléculas participan en el proceso y cuál es el papel de las células madre implicadas en el metabolismo óseo. Finalmente, y basándonos en los datos existentes, sería quizás posible diseñar una nueva técnica que nos permitiera acelerar el movimiento ortodóncico de forma segura, evitando los riesgos y efectos secundarios inherentes a la cirugía.

2. HIPÓTESIS

Los defensores de la corticotomía alveolar como coadyuvante del tratamiento ortodóncico argumentan que la aceleración del movimiento ortodóncico obtenida con esta técnica quirúrgica, se produce a expensas de una disminución en la resistencia física que opone el entramado alveolar al

movimiento de la unidad dental, que ocurre de forma concomitante con el denominado fenómeno de aceleración regional (RAP). Este último ha sido explicado como un proceso inflamatorio inducido por una agresión quirúrgica inespecífica a los tejidos, que desencadena un aumento de mediadores de la inflamación y otras moléculas resultando en una reabsorción ósea aumentada. A pesar de estas propuestas, la realidad científica es que las verdaderas bases celulares que centran el fenómeno de aceleración ortodóncica secundaria a la corticotomía alveolar permanecen aún sin esclarecer.

Paralelamente, se ha descrito en la literatura reciente (1), evidencia de la activación selectiva de progenitores celulares de modo secundario a una agresión quirúrgica en procesos de distracción ósea. Del mismo modo, la activación, supervivencia y diferenciación de las células osteoclasticas, se ha descrito íntimamente ligada a procesos de regulación por parte de la colonia de células madre mesenquimales. (2)

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

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

Además, si existe una conexión real entre la activación de células madre mesenquimales responsables del aumento de la osteoclastogenesis tras la inflamación causada por la agresión quirúrgica a los tejidos, y somos capaces de comprobarlo aclarando el patrón genico implicado, sería posible en un futuro próximo utilizar células madre como una técnica segura y muy específica

diseñada con el fin de acelerar el MDO individualmente, evitando la agresividad, riesgos y efectos secundarios de este tipo de cirugías.

3. OBJETIVOS

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

3.1. Objetivos Generales

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

3.2. Objetivos Específicos

- Validación de un nuevo modelo experimental ortodóncico de aplicación animal, de fácil reproducción con el fin de simplificar las comparaciones en futuras investigaciones similares.
- Utilización de una nueva técnica de gran utilidad, el análisis por microarray, al campo del MDO, con el fin de aclarar las bases biológicas subyacentes al mismo.

- Determinación de la validez clínica de la corticotomía alveolar como método de aceleración ortodóncica.
- Comparación estadística, histológica y clínica de las modulaciones del movimiento ortodóncico clásico y acelerado.
- Estudio de la expresión genética a lo largo del MDO.
- Comparación de los perfiles genéticos del movimiento ortodóncico clásico y acelerado.
- Comprobar a nivel molecular la base biológica de los métodos de aceleración, con el objetivo de orientar nuestros esfuerzos a crear una nueva técnica de modificación del MDO sin los riesgos inherentes a la cirugía.
- Conectar las reacciones tisulares que se producen tras la aplicación de de fuerza ortodóncica con la respuesta de las células madre óseas.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. Búsqueda bibliográfica

La revisión bibliográfica sistemática se realizó mediante la búsqueda en la base de datos MedLine (Entrez PubMed, www.ncbi.nlm.nih.gov), incluyendo publicaciones sin límite anterior de tiempo y actualizada hasta el 7 de Febrero de 2014. Así mismo se revisaron otras bases de datos como SCOPUS, Embase, Ebscohost y SCIRUS. Con el fin de detectar literatura no publicada por los canales convencionales que pudiera ser relevante para nuestra búsqueda, se utilizó la base de datos OpenGrey de la Asociación Europea para la Explotación de “Literatura Gris” ó EAGLE (European Association for Grey Literature Explotation). Además, las principales revistas de Ortodoncia indexadas en el JCR (*Journal Citation Report*) se revisaron a mano para identificar estudios potenciales no incluidos en los criterios de selección designados para esta búsqueda.

Se utilizaron los términos descriptores o términos MeSH (Medical Subject Heading) "tooth movement" AND “time factors” en búsqueda cruzada con los siguientes términos: “gene therapy”, “drug”, “piezocision”, “corticotomy”, “electromagnetic fields”, “low-level laser therapy” AND “bioelectric energy sources”. La búsqueda se realizó de acuerdo con las líneas establecidas por el “National Health Service Centre for Reviews and Dissemination” (3), así como las líneas PRISMA establecidas por Liberati et al en 2009. (4)

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

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

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

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

Objetivo medido: tasa de movimiento dentario ortodóncico.

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

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

4.2. Diseño del estudio experimental

Toda actuación sobre animales fue aprobada previamente por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA) de la Universidad de Sevilla. El modelo animal fue Rata Wistar, utilizándose veintiocho especímenes para los procedimientos de análisis de expresión génica a nivel del hueso

alveolar peridentario. Para dicho análisis se siguió un diseño experimental a boca partida empleándose un total de 56 hemimaxilas que fueron tomadas como unidad experimental para realizar el análisis de expresión génica. Se realizó una monitorización constante de los animales estableciendo un análisis de expresión génica en cuatro puntos temporales estratégicos (T1: 24 horas, T2: 3 días, T3: 7 días y T4 12 días) determinados en ensayos previos. El análisis de datos clínicos de movimiento dentario con y sin cirugía de corticotomía en los días establecidos (T1-T4) se tomó a partir de las mediciones de 48 hemimaxilas a partir de un número total de 32 animales siguiendo idéntica distribución en grupo sometido a corticotomía y controles.

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

La aparatología seleccionada para ejercer la fuerza ortodóncica fue una adaptación del modelo propuesto por Ren et al en 2004 (6). Se ferulizaron el primer, segundo y tercer molar con una ligadura de acero inoxidable de 0,2 mm de diámetro (Dentaurum) para la preservación del anclaje ferulizado como una única unidad y se insertó un muelle cerrado de Sentalloy de 0,22 mm de diámetro, (GAC, Dentsply Int.) aplicando una fuerza constante de 25 g por hemimaxila y por tanto una fuerza inferior a 10 g por unidad dentaria sometida a movimiento dentario.

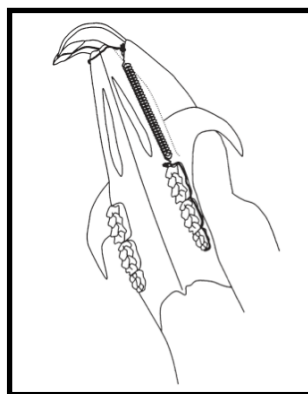


Figura 1. Esquema del modelo propuesto por Ren. (7)

El procedimiento quirúrgico de corticotomía alveolar fue realizado por un sólo operador siguiendo las líneas propuestas por Sanjideh (8). Se practicó una incisión oblicua con bisturí (hoja nº15, GmbH, Solingen, Germany) mesial al primer molar, continuando a lo largo del borde gingival palatino hasta el tercer molar para facilitar el levantamiento de colgajo y el desbridamiento mucoperióstico del mismo. Se realizaron decorticaciones verticales en mesial y distal del primer molar, bajo irrigación salina abundante y a baja revolución, junto con perforaciones directas en la tabla cortical utilizando una fresa de micromotor de carburo de tungsteno (H141 010 Komet, GmbH, Lemgo, Germany). Se realizó posteriormente la reposición del colgajo y la sutura del mismo de empleando hilo sintético reabsorbible monofilamento (Caprosyn® 6-0, 30 inches) y mediante nudo doble. Debido a la atropina, las secreciones salivares eran mínimas, y el sangrado de la herida se controló aplicando presión sobre la herida hasta conseguir una adecuada hemostasia. Todos los animales contaron con la hemimaxila contralateral como control interno no sometida a cirugía de corticotomía alveolar y exclusivamente sometida a idéntica fuerza ortodóncica a la administrada en la hemimaxila intervenida.

Para obtener las mediciones de movimiento dentario se utilizó un mini-calibre de alta precisión y lentes de aumento. Se realizó un seguimiento temporal de los animales en el que se midió la distancia entre la cara mesial del primer molar y el grupo incisivo, obteniendo el movimiento total de la media de los dobles valores tomados por un único operador tanto en el grupo experimental como en ambos grupos controles.

Se realizó el sacrificio de los especímenes en T1: 24 horas, T2: 3 días, T3: 7 días y T4: 12 días, mediante inhalación con monóxido de carbono y extirpación inmediata de la región ósea requerida a nivel alveolar mediante fractura ósea por tracción. Se extrajo el maxilar superior completo, eliminando todo el tejido blando y los dientes con la ayuda de un escalpelo, ultracongelando las muestras de hueso alveolar inmediatamente mediante inmersión en nitrógeno líquido a -125°C y almacenándolas posteriormente a -80°C hasta el procesado de la muestra para realizar la de extracción y aislamiento de ARN.

4.3. Procesamiento y análisis muestral

4.3.1. Extracción ARN

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

4.3.2. Análisis por microarray

La expresión génica se analizó mediante ensayo de expresión a medida tipo Taqman® (Life Technologies Corp., Carlsbad, CA, USA). Se empleó un OpenArray® individualizado y específicamente diseñado para el presente estudio con análisis de expresión génica a nivel de 224 locus específicos, para lo cual se realizó previamente una revisión de la literatura que permitiese optimizar la inclusión y selección de genes de expresión en modelo de rata. Se incluyeron genes de expresión a nivel de células madre mesenquimales (MSCs), hematopoyéticas (HSCs) e hipoxia.

4.3.3. Procedimientos histológicos

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

- Fijación en paraformaldehído al 4% durante menos de 24 horas.
- Decalcificación: las muestras se incluyeron en una solución acuosa del 45% de ácido fórmico y 20% de citrato sódico, con recambio cada 21 días.

- Deshidratación e inclusión: deshidratación por medio de inmersión gradual en concentración alcohólica creciente y se realizó la extracción del alcohol con una solución de Xilano al 100% y posterior inclusión en parafina.
- Obtención de cortes seriados de 7µm de espesor a partir de los bloques de parafina en microtomo rotatorio (Microtomo rotatorio. Accu-Cut SRM 200). Se fijaron en porta-objetos (HistoBond®. 1mm. Marienfeld)
- Tinción con Hematoxilina-Eosina y montaje en solución no acuosa para cobertura con un cubre-objetos antes de su visualización y análisis.

Las valoraciones de los cortes histológicos se realizaron en microscopio óptico de luz invertido (Fotomicroscopio Olympus R201)..

4.4. Análisis estadístico y bioinformático

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

Para la determinación de la fiabilidad y la precisión del método de medición por parte del examinador se determinó mediante el test t de Student y el cálculo de la fórmula de Dalberg (9), respectivamente. Para todos los cálculos se consideró un valor de $p < .05$ como estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron a través del software informático SPSS para Windows versión 17.0 (Illinois, CH, USA).

Para el análisis de expresión génica se normalizaron previamente las muestras a partir de la expresión de genes endógenos (10) y posteriormente se tomaron los modelos de análisis lineal (11) así como el análisis proporcional siguiendo metodología descrita (2). Asimismo para el análisis de expresión por clusters se empleó el *clustering analysis expander package* (<http://acgt.cs.tau.ac.il/expander/>).

5. RESULTADOS

5.1. Resultados de la revisión bibliográfica sistemática

La búsqueda electrónica identificó 218 títulos. Noventa y un artículos completos se revisaron finalmente, de los cuales 74 cumplían los criterios de inclusión, 4 de ellos se añadieron como resultados de búsqueda manual y 1 tras contactar con el autor. 19 de los artículos incluidos fueron publicados durante esta revisión e incluidos durante las actualizaciones realizadas. (13-19) De los 74 finalmente incluidos, 13 fueron Ensayos clínicos randomizados y se según el sistema de puntos seguido, 12 de los artículos se determinaron como de Calidad alta (HQ), 22 como de Calidad media (MQ):22) y el resto de calidad baja o como alto riesgo de sesgo.

La mayor parte de la muestra se componía de estudios experimentales en animales, siendo la rata el modelo animal más frecuente (44 de 74 artículos, 29 Wistar y 15 Sprague-Dawley), seguida por el perro (6 de 74, todos ellos para testar técnicas quirúrgicas) y en siete casos, conejos, cerdos de guinea, monos y ratones. Sólo 16 artículos incluían humanos, y de ellos, únicamente 13 eran ensayos clínicos randomizados, y el resto, tanto en humanos como en animales, eran estudios comparativos cuyo tamaño muestral raramente incluía más de 25 sujetos por grupo (10 de 74 artículos). Se encontraron medidas de ciego sólo en 21 artículos, 17 ciegos simples y 4 dobles ciegos. De los 74 estudios, 10 se denominaron como bajo riesgo de sesgo, 22 con riesgo moderado y el resto con riesgo alto de sesgo. Se identificaron 4 métodos principales de modificación biológica del movimiento dentario ortodóncico, técnicas quirúrgicas (18 artículos de 74, 11 de ellos correspondientes a corticotomía), métodos químicos (33 de 74), LLLT (16 de 74), Campos magnéticos (3 de 74) y Terapia génica (4 de 74)

5.2. Registros clínicos de movimiento dental

Analizando el movimiento final de cada hemiarcada del conjunto de los animales que componen este grupo experimental y en relación a los objetivos de nuestro estudio, se observó un aumento del movimiento dentario de un 46,24% en la hemiarcada sometida a corticotomía y ortodoncia, comparado con la hemiarcada contralateral sometida únicamente a ortodoncia que sirvió de control interno al final del período experimental. Esto se traduce en una estimulación o aceleración del movimiento dentario en el grupo dónde se ha realizado la intervención quirúrgica (Fig 2).

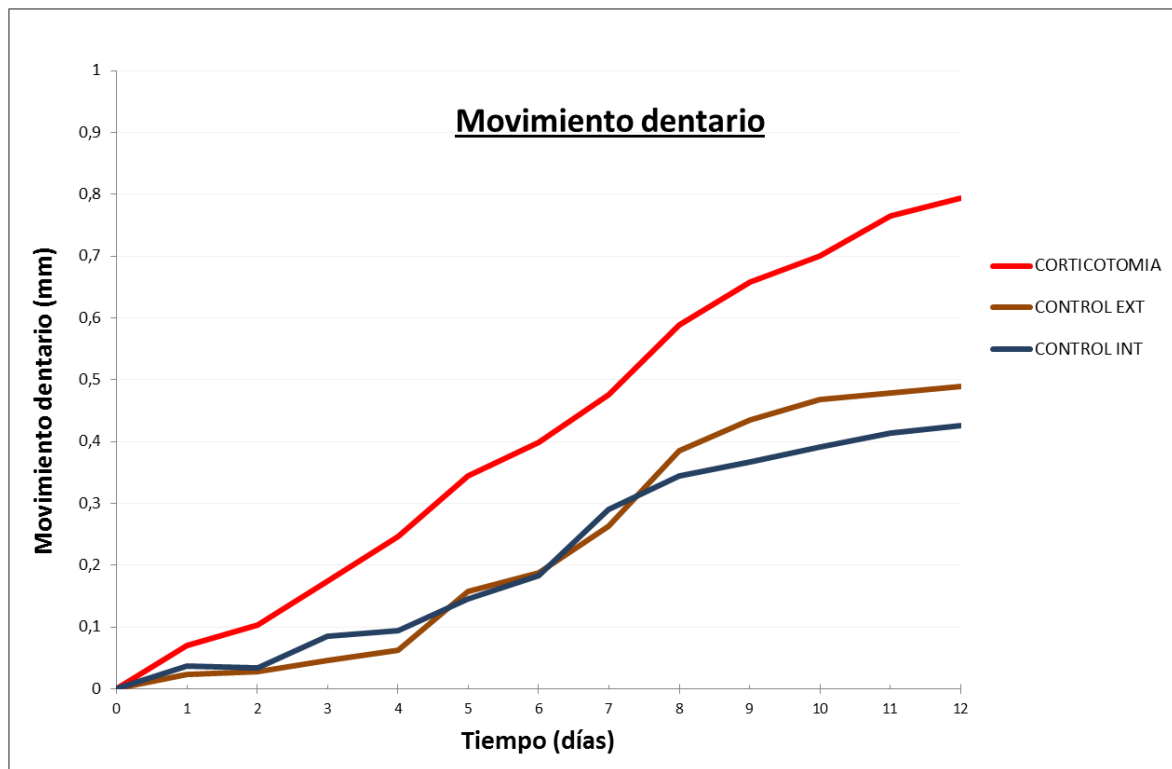


Figura 2. Cuantificación del movimiento dentario en mm.

En un análisis secuenciado pormenorizado de los resultados clínicos obtenidos los datos indican que en el primer, el tercer, el séptimo y el último día de aplicación de fuerza ortodóncica, encontramos que la hemiarcada sometida a cirugía registró una tasa de movimiento porcentual del superior siempre al 38% comparada con la hemiarcada control interno y control externo ($p < 0.001$). Todo el período experimental seleccionado reflejó un aumento estadísticamente significativo con respecto a los grupos de control tanto interno como externo a lo largo del tramo observacional seleccionado. Asimismo de modo coherente no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos controles ($p > 0.05$). (Figura 2)

5.3. Resultados del procesado in vitro y preparación muestral

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

Se obtuvo una media de 8.18 μg ARN por muestra y una media de 6.44 y 5.70 μg en el grupo de 24 horas en los grupos control y cirugía respectivamente; 5.27 y 9.59 μg en el grupo de 3 días en control y cirugía; 12.62 y 8.32 μg en el grupo de 7 días en control y cirugía y finalmente 9.38 y 8.08

µg en el grupo de 12 días en control y cirugía. La concentración de ARN por muestra se describe en el Anexo 9.3. (Informe de calidad del ARN) Si analizamos los datos por grupo, encontramos una concentración media ARN de 275 y 210.3 µg/µl para controles y cirugía en el grupo de 24 h; 244 y 336.33 µg/µl para controles y cirugía en el grupo de 3 días; 207.33 y 190.67 µg/µl para controles y cirugía en el grupo de 7 días, y 277.67 y 246 µg/µl para controles y cirugía en el grupo de 12 días. El número de integridad del ARN ó “RNA integrity number” (RIN) en el grupo de 24 h resultó ser una media 2.3 y 2.4 para controles y cirugía respectivamente, 2.3 y 2.6 en el grupo de 3 días para controles y cirugía; 2.3 y 2.4 en el de 7 días para controles y cirugía y finalmente 2.3 y 2.6 en el grupo de 12 días para controles y cirugía. Estos datos nos dejan una media total de RIN= 2.4 en el conjunto total de las 24 muestras, 2.4 para los controles y 2.5 para las cirugías.

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

En los resultados de análisis de expresión génica secuenciada a lo largo del período experimental se observan los cambios en la expresión de numerosos genes seleccionados (Figura 3). Tras realizar el análisis de barrido inicial se realizó un tamizaje una vez normalizados respecto a los grupos control en los mismos días experimentales. Posteriormente se seleccionaron todos aquellos genes de expresión en los que se observaron diferencias significativas ($p < .05$) entre el grupo control y experimental y además que mostraban un comportamiento homogéneo con menos de 36 ciclos en el 75% de los replicados

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

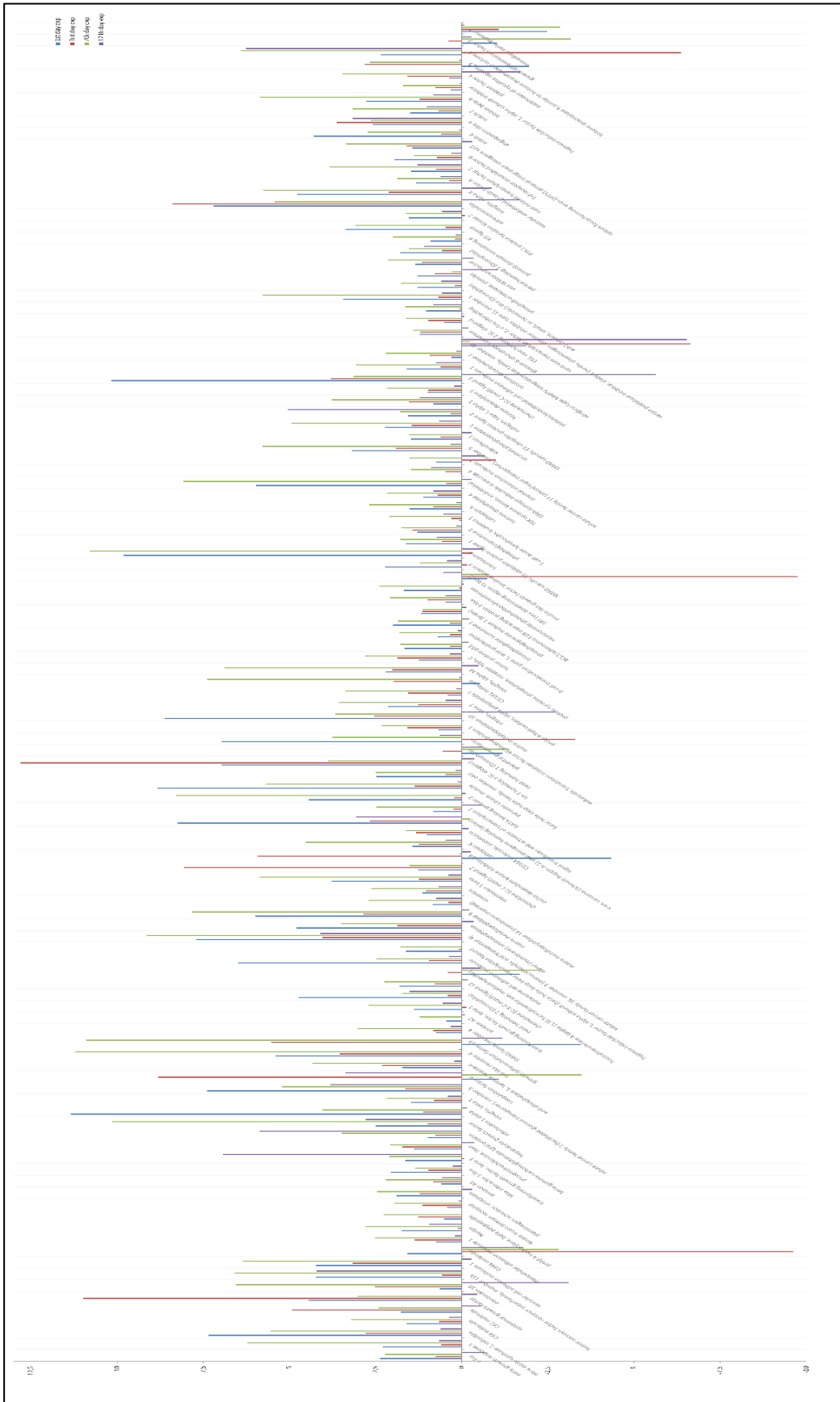


Fig. 3. Cambios de expresión génica con respecto a los controles en cada punto temporal

5.3.2.1. Expresión génica a las 24 horas

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

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

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

5.3.2.2. Expresión génica a los 3 días

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

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

5.3.2.3. Expresión génica a los 7 días

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

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

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

5.3.2.4. Expresión génica a los 12 días

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

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

5.4. Resultados Histológicos

Los registros histológicos obtenidos a partir del grupo experimental tratado con ortodoncia y corticotomía, así como en el grupo control sometido exclusivamente a movimiento dentario ortodónico, muestran un aumento coherente de la reabsorción ósea en ambos grupos. En aquellos grupos sometidos a fuerzas ortodónicas se observa una desestructuración marcada del entramado óseo. No obstante, a modo comparativo, la aplicación de corticotomía observamos produce un marcado aumento de las lagunas reabsortivas compatibles con actividad osteoclástica aumentada. En cualquier caso, es notorio el marcado componente inflamatorio desencadenado en estos grupos sometidos a fuerzas ortodónicas y corticotomía alveolar.

6. DISCUSIÓN

El análisis realizado en nuestro estudio ofrece una gran cantidad de información en cuanto a la secuencia genética implicada en el movimiento dentario ortodónico biológicamente acelerado. En nuestros resultados destaca la expresión de Interleukinas, concretamente IL10, 6 y 1 α y β . Estas últimas se han descrito implicadas como mediadores de la inflamación secundaria a daño óseo (21) y se han encontrado elevadas en los tejidos circundantes tras la aplicación de fuerza ortodónica. (22) A las 24 h, IL6 aumentó su expresión por encima de 7,5 veces en el grupo de cirugía con respecto a los controles, así como la IL 1 α . A los siete días, IL6 e IL 1 β seguían con expresión aumentada, llamando la atención a su vez el gran aumento de la IL10 (entre 5 y 7,5 veces) para bajar dramáticamente hasta la casi inhibición a los 12 días.

Por otra parte, las Metaloproteinasas de la Matriz (MMPs) se han descrito sensibles al estrés mecánico (23) y relacionadas con la reabsorción ósea en procesos de erupción y de movimiento dentario inducido. (24) Concretamente las MMP9 son reguladoras de la respuesta angiogenica por parte de las células madre. A las 24h, MMP10 aumentó su expresión en más de 7,5 veces respecto a los controles y MMP9 también aumentó entre 5 y 7,5 veces, siendo este aumento incluso mayor a los siete días.

Destaca así mismo el papel del adrenomedullin, un vasodilatador que se ha descrito como potenciador de la angiogenesis por parte de las células madre hematopoyéticas (25), y cuya expresión

aparece muy aumentada en los grupos de 24 h, 3 días y 7 días y que sin embargo decae drásticamente a los 12 días hasta disminuir muy representativamente su expresión.

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

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

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

El Microarray nos permite analizar perfiles de expresión (a nivel de mRNA y microARN) y las variaciones estructurales (número de copias del ADN) a nivel del genoma completo. (26) Los microarrays de mRNA de alta densidad son capaces de analizar hasta 50.000 genes, pero requieren una muy baja degradación de las muestras de ARN, que necesitan tratarse primero con parafina, e incluso entonces, entre un 10 y un 15% de las muestras pueden perderse. (27) El hueso es uno de los tejidos orgánicos con mayor tendencia a la degradación del ARN, lo cual puede apreciarse en nuestras muestras. Debido a esto, elegimos finalmente realizar un Taqman® assay, que consiste en una qPCR exponencial replicada 5 veces, teniendo estadísticamente mayor seguridad en los resultados. (28) Hasta 224 genes pueden analizarse con el Taqman® assay, y tras una exhaustiva consulta bibliográfica, pudimos elegir aproximadamente una lista de genes con alta probabilidad de participar en el movimiento dentario.

Debido a las razones arriba expuestas, prestamos especial atención a mantener la integridad del ARN a la hora de tomar las muestras. En el hueso, la cantidad de expresión de ARN en el tejido ya es limitada, por la baja cantidad de células presentes, embebidas en una matriz mineralizada, y además la degradación ocurre muy rápidamente. Las muestras se tomaron en el menor tiempo posible tras el sacrificio de los animales y los fragmentos de hueso se congelaron inmediatamente

con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C . A pesar de todo, después de la extracción, la cantidad y calidad del ARN era limitada.

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

Las ratas parecen ser el modelo animal más utilizado, y es también el escogido para nuestro experimento. Sin embargo, este tipo de roedores presenta un movimiento fisiológico de los molares en sentido distal, que podría interferir con las medidas y análisis histológicos realizados. Del mismo modo, la erupción continuada de los incisivos que podría influir en el control de la dirección de la fuerza pudiendo implicar la menor fiabilidad en el anclaje previsto. Para esclarecer esta cuestión antes del ensayo definitivo, se realizó un estudio piloto previo adicional para validar la elección de la aparatología y el procedimiento experimental a emplear, así como para la determinación de las reacciones adversas que pudiesen interferir. A pesar de la utilización del aparato propuesto por Ren y col., (7) diseñado específicamente para minimizar los posibles efectos adversos, es difícil controlar la magnitud y dirección de la fuerza ejercida con los muelles, que puede no ser constante o decaer durante el experimento.

Para evitar esto, tratamos de calcular previamente la cantidad ideal de fuerza que se debería usar en este tipo de roedores para evitar daño tisular, pero el rango de fuerza utilizado en los estudios consultados es muy grande, desde los 15 gramos en aquellos estudios que usan campos magnéticos a los 400 gramos de algunas técnicas quirúrgicas. Muchos de los estudios ni siquiera mencionaban la fuerza o lo hacían sólo al principio del experimento, sin cuantificar o notificar el posible decaimiento de la fuerza. Los molares en las ratas son 50 veces menores que en humanos, por lo que a la hora de comparar rangos de fuerza, se debería estimar el área de la superficie radicular. De acuerdo con Ren et al (30), 20 g de fuerza en ratas podría equivaler en humanos a 1kg de fuerza, sin embargo, la mayoría de los artículos usan fuerzas muy superiores a ésta.

En nuestro experimento, se usó aproximadamente una fuerza de 25 g, en la media de lo utilizado en los estudios consultados, (31, 32) donde los rangos de fuerza para ratas varían entre los 10 (33) y los 100 gramos (34).

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

Como método de aplicación de la fuerza ortodóncica elegimos un muelle cerrado de Sentalloy (CCS, closed coil spring), siendo éste es el aparato más usado en la literatura, siendo también muy comúnmente usados los fabricados en Níquel-Titanio. En cuanto a la aparatología ortodóncica, existe también una gran variedad de aparatos utilizados para propósitos similares, desde distractores óseos a resortes o elásticos, pasando por dispositivos diseñados para cada caso específico y hechos a mano o expansores palatinos. Con los CCS, la dirección y magnitud de la fuerza no siempre puede controlarse, pudiendo no ser constante o decaer durante el experimento. Los elásticos a su vez, muestran un decaimiento de la fuerza de 45 a 0 N en los primeros 0.2 mm de decompresión, (7) y la dirección de la fuerza también puede variar.

El hueso alveolar es más denso en ratas que en humanos, sin osteonas ni espacios medulares, y los cambios tisulares relacionados con el tratamiento ortodóncico ocurren más rápido

que en humanos. El tamaño dental es también menor. Para evitar errores en la medición de la tasa de movimiento dentario, los datos se registraron dos veces por dos operadores (M.C. y D.B) diferentes utilizando un calibre electrónico y lentes de aumento adaptadas, y fueron después revisados por un tercer operador (A.I.).

En cuanto al tiempo de observación, nuestra fase experimental con los animales duró un total de 12 días, teniendo lugar los sacrificios a las 24 h, 3, 7 y 12 días. Elegimos este tiempo de experimentación porque al darse las reacciones químicas y la renovación ósea en espacios de tiempo considerablemente más cortos que en humanos, queríamos evitar que esto influenciara los resultados en la expresión génica más allá de 12 días. Se ha demostrado que tras 7 días, se ha encontrado clara evidencia de pérdida ósea en ratas a las que se les han colocado ligaduras para conseguir MDO. (35)

En la literatura incluida en nuestra revisión sistemática, hay muchas diferencias en cuanto a los periodos observacionales, y de nuevo, es difícil tener una orientación. El tiempo de estudio más corto fueron 5 días (36, 37) y 90 el más largo. (38) La media del tiempo de experimentación en ratas (incluyendo Wistar y Sprague-Dawley) fue de 26.2 días, (39-41) pero las técnicas usadas eran muy variadas. Entre los estudios de terapia génica, la media fue de 30.75 días y entre los estudios de técnicas quirúrgicas (sólo incluyendo estudios de corticotomía con circunstancias similares al nuestro) la media fue de 36.6 días.

7. CONCLUSIONES FINALES

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

1. Se ha descrito en la literatura una gran variedad de métodos “biológicos” de aceleración del movimiento dentario ortodóncico, pero debido a la ausencia de consenso en cuanto a las pautas experimentales (modelo animal, aparatología para la aplicación de la fuerza, rango de fuerza aceptable para cada especie), resulta complejo establecer comparaciones absolutas entre estudios o extraer conclusiones sólidas.

2. La medición del movimiento dentario en ambos grupos, (controles sólo con fuerza ortodóncica y grupo experimental con fuerza ortodóncica y corticotomía) demuestra que efectivamente esta intervención quirúrgica aumenta la tasa neta de movimiento dentario ortodóncico con respecto a los controles de forma muy significativa. (46,2% más de MDO en el grupo de cirugía)
3. En relación a la regulación molecular del mecanismo de aceleración de la corticotomía, a través del array de expresión génica se puede concluir que en el grupo de corticotomía se observa una expresión aumentada de genes correspondientes a mediadores inflamatorios como las Interleukinas (1, 6 y 10) en los días iniciales, activadores de la reabsorción ósea como las MMPs 9 y 10, asimismo se observan en potenciadores de la angiogénesis por parte de las células madre hematopoyéticas. Por otra parte se ve disminuida la síntesis de aquellas moléculas encargadas de promover la osteogénesis por parte de células madre mesenquimales. En el cuarto y último punto temporal, doce días después de la intervención, se observa una disminución clara de la expresión de genes relacionados con la cicatrización ósea y la inflamación.
4. Podríamos afirmar por tanto que se confirma la hipótesis de la existencia de una conexión real entre la activación de células madre mesenquimales responsables del aumento de la osteoclastogénesis tras la inflamación causada por la agresión quirúrgica a los tejidos, por lo que sería posible en un futuro próximo utilizar células madre como una técnica segura y muy específica diseñada con el fin de acelerar el MDO individualmente, evitando la agresividad, riesgos y efectos secundarios de cirugías como la corticotomía con fines ortodóncicos

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Lee DY, Cho TJ, Lee HR, Park MS, Yoo WJ, Chung CY, et al. Distraction osteogenesis induces endothelial progenitor cell mobilization without inflammatory response in man. *Bone*. 2010;46:673-679.
2. Liu W, Wu RD, Dong YL, Gao YM. Neuroepithelial stem cells differentiate into neuronal phenotypes and improve intestinal motility recovery after transplantation in the aganglionic colon of the rat. *Neurogastroenterol Motil*. 2007;19:1001-9
3. National Health Service (NHS) Center for Reviews and Dis-semination. Report Number 4 (2nd ed.). Undertaking Systematic Reviews of Research on Effectiveness. University of York: York Publishing Services Ltd; March 2001.

4. Liberati AI, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JP, et al. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ*. 2009;339:b2700.
5. Chen SS, Greenlee GM, Kim JE, Smith CL, Huang GJ. Systematic review of self- ligating brackets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2010;137:726.e1-18.
6. Han G, Chen Y, Hou J, Liu C, Chen C, Zhuang J, et al. Effects of simvastatin on relapse and remodeling of periodontal tissues after tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2010;138:550.e1-7.
7. Ren Y, Maltha JC, Kuijpers-Jagtman AM. The rat as a model for orthodontic tooth movement- a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod*. 2004;26:483-490.
8. Sanjideh PA, Rossouw PE, Campbell PM, Opperman LA, Buschang PH. Tooth movements in foxhounds after one or two alveolar corticotomies. *Eur J Orthod*. 2010;32:106-13.
9. Bang H, Davidian M. Experimental statistics for biological sciences. *Methods Mol Biol*. 2010;620:3-104.
10. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes." *Genome Biol*. 2002;18;3:RESEARCH0034
11. Smyth GK. Linear models and empirical Bayes for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat. Appl. Genet. Mol. Biol*. 2004;3:3.
12. Kumar PS, Saxena R, Patil S, Keluskar KM, Nagaraj K, Kotrashetti SM. Clinical investigation of periodontal ligament distraction osteogenesis for rapid orthodontic canine retraction. *Aust Orthod J*. 2009;25:147-152.
13. Kaipatur NR, Wu Y, Adeeb S, Stevenson TR, Major PW, Doschak MR. Impact of bisphosphonate drug burden in alveolar bone during orthodontic tooth movement in a rat model: a pilot study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2013;144:557-67
14. Toro EJ, Zuo J, Guitierrez A, La Rosa RL, Gawron AJ, Bradaschia-Correa V, et al. Bis- enoxacin Inhibits Bone Resorption and Orthodontic Tooth Movement *J Dent Res*. 2013;92:925-31
15. Li F, Li G, Hu H, Liu R, Chen J, Zou S. Effect of parathyroid hormone on experimental tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144:523-32
16. Alikhani M, Raptis M, Zoldan B, Sangsuwon C, Lee YB, Alyami B, et al. Effect of micro-osteoperforations on the rate of tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2013;144:639-48.

17. Kim YS, Kim SJ, Yoon HJ, Lee PJ, Moon W, Park YG. Effect of piezopuncture on tooth movement and bone remodeling in dogs. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2013;144:23-31.
18. Duan J, Na Y, Liu Y, Zhang Y. Effects of the pulse frequency of low-level laser therapy on the tooth movement speed of rat molars. *Photomed Laser Surg.* 2012;30:663-7.
19. Genc G, Kocadereli I, Tasar F, Kilinc K, El S, Sarkarati B. Effect of low-level laser therapy (LLLT) on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci.* 2013;28:41-7.
20. Arantes GM, Arantes VM, Ashmawi HA, Posso IP. Tenoxicam controls pain without altering orthodontic movement of maxillary canines. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:14–19.
21. Saito M, Saito S, Ngan PW, Shanfeld J, Davidovitch Z. Interleukin-1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1991;99:226-40.
22. Luppapornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *Eur J Orthod.* 2010;32:596-601
23. Bolcato-Bellemin AL, Elkaim R, Abehsera A, Fausser JL, Haikel Y, Tenenbaum H. Expression of mRNAs encoding for alpha and beta integrin subunits, MMPs, and TIMPs in stretched human periodontal ligament and gingival fibroblasts. *Journal of Dental Research* 2000;79:1712–16.
24. Huang XF, Zhao YB, Zhang FM, Han PY. Comparative study of gene expression during tooth eruption and orthodontic tooth movement in mice. *Oral Dis.* 2009;15:573-79
25. Sakimoto S1, Kidoya H, Kamei M, Naito H, Yamakawa D, Sakaguchi H, et al. An angiogenic role for adrenomedullin in choroidal neovascularization. *PLoS One.* 2013;8:e58096.
26. Rage F, Boulisfane N, Rihan K, Neel H, Gostan T, Bertrand E, et al. Genome-wide identification of mRNAs associated with the protein SMN whose depletion decreases their axonal localization. *RNA.* 2013;19:1755-66.
27. Shi L, Reid LH, Jones WD, Shippy R, Warrington JA, Baker SC, et al. The MicroArray Quality Control (MAQC) project shows inter- and intraplatform reproducibility of gene expression measurements. *Nat Biotechnol.* 2006;24:1151–61.
28. Pomeroy R, Duncan G, Sunar-Reeder B, Ortenberg E, Ketchum M, Wasiluk H, et al. A low-cost, high-throughput, automated single nucleotide polymorphism assay for forensic human DNA applications. *Anal Biochem.* 2009;395:61-7
29. Graves DT, Kang J, Andriankaja O, Wada K, Rossa C Jr. Animal Models to Study Host-Bacteria Interactions Involved in Periodontitis *Front Oral Biol.* 2012;15:117–32.

30. Tengku BS, Joseph K, Harbrow D, Taverne AAR, Symons AL. Effect of a static magnetic field on orthodontic tooth movement in the rat. *Eur J Orthod.* 2000; 22:475-87
31. Altan BA, Sokucu O, Ozkut MM, Inan S. Metrical and histological investigation of the effects of low-level laser therapy on orthodontic tooth movement. *Lasers Med Sci* 2012;27:131-40.
32. Yamaguchi M, Hayashi M, Fujita S, Yoshida T, Utsunomiya T, Yamamoto H et al. Low-energy laser irradiation facilitates the velocity of tooth movement and the expressions of matrix metalloproteinase-9, cathepsin K, and alpha(v) beta(3) integrin in rats. *Eur J Orthod* 2010;32:131-9
33. Wang L, Lee W, Lei DL, Liu YP, Yamashita DD, Yen SL. Tissue responses in corticotomy- and osteotomy-assisted tooth movements in rats: histology and immunostaining. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2009;136:770.e1-11.
34. Xie R, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Inflammatory responses in two commonly used rat models for experimental tooth movement: comparison with ligature-induced periodontitis. *Arch Oral Biol.* 2011; 56:159-67
35. de Carlos F, Cobo J, Perillan C, Garcia MA, Arguelles J, Vijande M, et al. Orthodontic tooth movement after different coxib therapies. *Eur J Orthod.* 2007;29:596-99.
36. Gurton AU, Akin E, Sagdic D, Olmez H. Effects of PGI2 and TxA2 analogs and inhibitors in orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2004;74:526-532.
37. Salazar M, Hernandez L, Ramos AL, Micheletti KR, Albino CC, Nakamura Cuman RK. Effect of teriparatide on induced tooth displacement in ovariectomized rats: a histomorphometric analysis. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:337-44.
38. Meh A, Sprogar S, Vaupotic T, Cör A, Drevenšek G, Marc J, et al. Effect of cetirizine, a histamine (H(1)) receptor antagonist, on bone modeling during orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:323-9
39. Davila JE, Miller JR, Hodges JS, Beyer JP, Larson BE. Effect of neonatal capsaicin treatment on orthodontic tooth movement in male Sprague-Dawley rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2011;139:345-52.
40. Teixeira CC, Khoo E, Tran J, Chartres I, Liu Y, Thant LM, et al. Cytokine expression and accelerated tooth movement. *J Dent Res.* 2010;89: 1135-41.