



Universidad de Oviedo



ASTURIAS  
CAMPUS DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**  
**MÁSTER UNIVERSITARIO DE ORTODONCIA Y ORTOPEDIA**  
**DENTOFACIAL**

**PAPEL DE LAS METALOPROTEASAS EN LA**  
**REMODELACIÓN DEL LIGAMENTO PERIODONTAL**  
**DURANTE LA MOVILIZACIÓN DENTARIA**  
**ORTODÓNCICA**

**ANA MARCOS CARDO**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**Oviedo, Mayo 2016**





Universidad de Oviedo



ASTURIAS  
CAMPUS DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL

**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**  
**MÁSTER UNIVERSITARIO DE ORTODONCIA Y ORTOPEDIA**  
**DENTOFACIAL**

**PAPEL DE LAS METALOPROTEASAS EN LA**  
**REMODELACIÓN DEL LIGAMENTO PERIODONTAL**  
**DURANTE LA MOVILIZACIÓN DENTARIA**  
**ORTODÓNICA**

**TRABAJO FIN DE MASTER**

**ANA MARCOS CARDO**

**Tutor/a: José Antonio Vega Álvarez**





Universidad de Oviedo



ASTURIAS  
CAMPUS DE EXCELENCIA  
INTERNACIONAL

**José A. Vega Álvarez**, Catedrático de Anatomía adscrito al Departamento de Morfología y Biología Celular de la Universidad de Oviedo

**CERTIFICO:**

Que el trabajo titulado “Papel de las metaloproteasas en la remodelación del ligamento periodontal durante la movilización dentaria ortodónica” presentado por **Dña. Ana Marcos Cardo** ha sido realizado bajo mi dirección y cumple los requisitos para ser presentado como Trabajo de Fin de Máster en Ortodoncia y Ortopedia Dento-Facial.

En Oviedo a 3 de Mayo de 2016



# RESUMEN Y ABSTRACT



## **RESUMEN**

## **ABSTRACT**

## **PALABRAS CLAVE**

## **KEY WORDS**





**INDICE**

<b>1. INTRODUCCIÓN. ....</b>	<b>3</b>
<b>2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA .....</b>	<b>9</b>
2.1. Remodelación ósea: el ciclo del hueso.....	9
2.2. Remodelación tisular durante los movimientos ortodóncicos .....	14
2.3. Bases moleculares de la remodelación tisular .....	16
2.4. El análisis del fluido crevicular gingival como método diagnóstico.....	19
<b>3. MATERIAL Y TÉCNICAS .....</b>	<b>25</b>
3.1. Material .....	25
3.2. Técnicas .....	26
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>31</b>
<b>5. DISCUSION.....</b>	<b>39</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>47</b>



# INTRODUCCIÓN





## 1. INTRODUCCIÓN.

El movimiento producido por una fuerza ortodóncica aplicada sobre la corona de un diente causa una respuesta inflamatoria aguda de los tejidos blandos periodontales (ligamento periodontal -LPO- y encía) la cual desencadena una serie de procesos biológicos que llevan a la remodelación tanto de los tejidos blandos como del propio hueso. Tales cambios conducen a la síntesis de diferentes moléculas biológicamente activas (ácido araquidónico, factores de crecimiento, citoquinas y enzimas) que son, en última instancia, los responsables de la remodelación ósea y el subsiguiente movimiento dentario (ver Schenkein et al., 2010).

Una manifestación de esos complejos procesos tisulares y biológicos puede encontrarse en el fluido crevicular gingival (FCG) que rodea los dientes que se están moviendo, ya que cambian sus componentes y, seguramente, deberían de aumentar las concentraciones de las moléculas que intervienen de una manera más activa en tales modificaciones. En los últimos años, algunos trabajos han estudiado la composición del FCG durante el movimiento ortodóncico de los dientes (ver Apuzzo et al., 2013; Anand-Kumar et al., 2015), habiéndose encontrado, por ejemplo, variaciones en los niveles de algunas citoquinas y metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs; Capelli et al., 2011; Canavarró et al., 2013; Almeida et al., 2015; Karasawa et al., 2015). El análisis de los componentes del FCG es, pues, un método no invasivo que permite conocer la respuesta celular al movimiento dentario. El fluido se



puede recoger fácilmente y los posibles biomarcadores que se pueden determinar en él son casi ilimitados, ya que su número aumenta de forma paralela a los conocimientos sobre la mecanobiología de los movimientos ortodóncicos. Por tanto, las variaciones en los componentes del FCG pueden ser un método muy útil para conocer los cambios que se están produciendo en el diente, hueso y tejidos periodontales durante el tratamiento ortodóncico (ver Apuzzo et al., 2013; Anand-Kumar et al., 2015).

El presente trabajo de investigación se diseñó para determinar si algunas de las MMPs que están implicadas en el proceso de remodelación ósea y/o del LPO (ver Estado actual del problema) varían sus concentraciones en el FCG durante el movimiento de los dientes inducido por movimientos ortodóncicos, así como para determinar si existen diferencias en tales concentraciones entre las zonas de presión y tracción de los dientes sometidos a la acción de la fuerza ortodóncica. Y los hallazgos que se obtengan pueden servir para ajustar, mejorar y acortar dichos tratamientos y para evitar los posibles efectos colaterales de los mismos.

Con el fin de encuadrar con claridad el trabajo de investigación realizado en el contexto de la ortodoncia, en el apartado que sigue, se estudiarán en detalle los siguientes aspectos: la remodelación tisular en el curso de los movimientos ortodóncicos, las bases moleculares de esos procesos, y las variaciones en la composición del FCG determinadas por el movimiento dentario. El trabajo intenta además vincular la ciencia básica a la ortodoncia clínica. En la actualidad es



necesario que los ortodoncistas conozcan las bases biológicas de lo que ocurre en el diente y en los tejidos que lo rodean cuando se aplica sobre él una fuerza para poder tratar de una forma más adecuada y racional los problemas clínicos diarios.



# ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

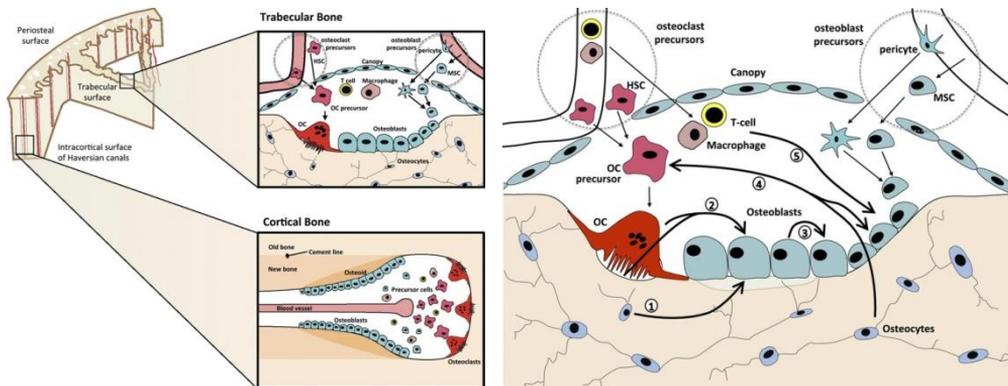




## 2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

### 2.1. Remodelación ósea: el ciclo del hueso

Los huesos, a pesar de su aparente inactividad, están sometidos a una renovación permanente en la que se destruye el hueso viejo y se produce hueso nuevo; este proceso se denomina remodelación ósea. En él intervienen todos los tipos celulares (osteoblastos, osteocitos, osteoclastos y células óseas de superficie o revestimiento). Los osteoclastos destruyen zonas de los huesos dispersas y microscópicas denominadas unidades de remodelación ósea (URO; más conocidas por sus siglas en inglés, BRU: *bone remodeling units*); posteriormente se rellenan por tejido óseo neoformado por los osteoblastos. En cuanto a los osteocitos, funcionan como mecanosensores que organizan todo el proceso; y las células de revestimiento están implicadas en el inicio y finalización de la remodelación ósea, pero su función exacta aun no es conocida (ver Eriksen, 2010). El proceso de remodelación ósea representa un mecanismo para reemplazar el hueso que ha sufrido daño por acción mecánica repetitiva, así como una forma de adaptación del esqueleto a los factores biomecánicos locales y las influencias hormonales sistémicas. Desde un punto de vista celular y molecular, el proceso de remodelación ósea es muy complejo (Sims y Gooi, 2008; Sims y Martin, 2014; Figura 1).



**Figura 1.-** Esquema de los mecanismos celulares y moleculares implicados en la remodelación ósea. Tomado Sims y Martin, 2014.

La diferencia entre la cantidad de hueso que se destruye y la que se forma en cada una de las URO se conoce como balance óseo, y la velocidad de renovación ósea, es decir, el volumen de hueso renovado en la unidad de tiempo, se denomina recambio óseo (turnover). Como consecuencia de ello se forman cavidades tuneliformes en el hueso cortical (cono de apertura) o lacunares en el trabecular (laguna de Howship) (Figura 1). El ciclo de la remodelación ósea se divide en cuatro etapas o fases: **activación**, **resorción**, **inversión** y **formación**. La fase de activación comienza con el reclutamiento de los pre-osteoclastos a zonas del hueso en las que han desaparecido las células de revestimiento. Los pre-osteoclastos proliferan, diferencian y fusionan para formar los osteoclastos maduros, caracterizados por ser multinucleados y contener gran cantidad de gránulos citoplasmáticos. El fenómeno de activación es consecuencia de la intervención de una serie de señales no bien conocidas, entre las que deben estar cambios en las fuerzas mecánicas locales, en la situación endocrinológica general del



individuo, en el ambiente paracrino del lugar que va a ser remodelado, y en la propia estructura ósea surgidos como consecuencia del envejecimiento o del sufrimiento de un daño.

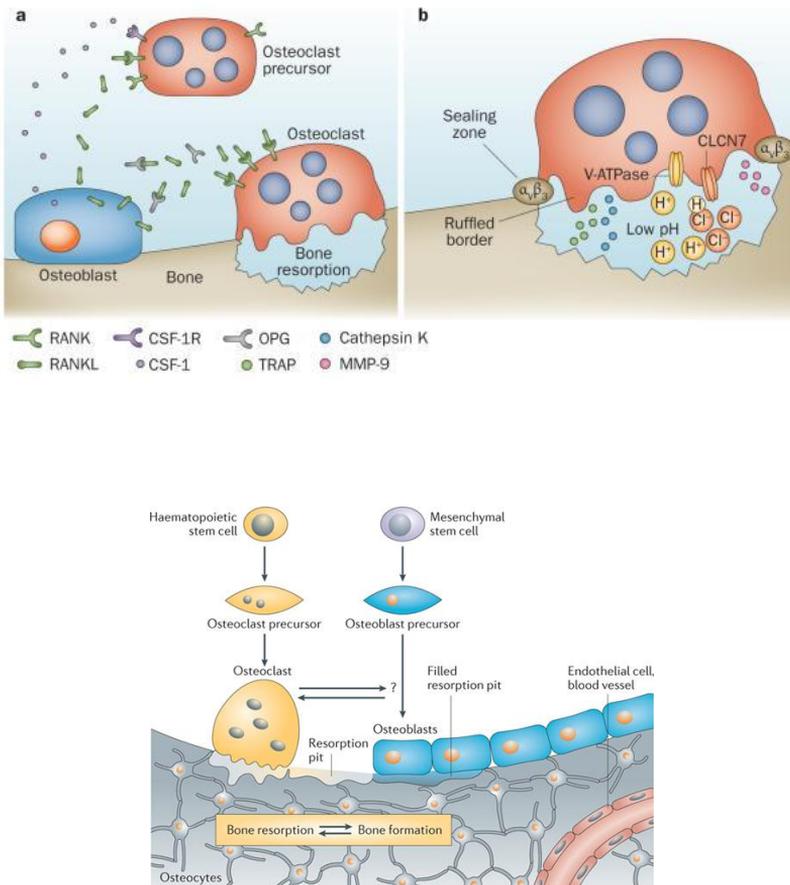
Antes de que comience la fase de resorción, los osteoclastos deben fijarse al hueso. Para ello, las células de revestimiento se retraen dejando huecos a través de los cuales pasan los osteoclastos. Tras establecer contacto con la matriz ósea, las células osteoclásticas se fijan al hueso por medio de la integrina  $\alpha v \beta 3$  presente en la superficie de los osteoclastos por determinadas proteínas de la matriz ósea (vitronectina, fibronectina). Tras la unión se produce la activación en el osteoclasto de la quinasa p60c-src, que interviene en la reorganización de su citoesqueleto y hace que los osteoclastos adapten la típica forma activa con el borde de adhesión rugoso y un anillo rico en filamentos de actina en torno a él y que al unirse a la matriz cierra el espacio que queda entre ambas. Después de fijarse a las superficies óseas, los osteoclastos maduros comienzan a resorber hueso. La disolución de la base mineral precede al de la fase orgánica y es mediado por la secreción de hidrogeniones ( $H^+$ ) a través de un mecanismo de transporte activo ATPasa-dependiente. Los  $H^+$  facilitan la disolución del cristal de hidroxapatita y el pH idóneo ( $pH = 4,5$ ) para que actúen las enzimas lisosomales que disuelven la fase orgánica. En este proceso intervienen las **metaloproteinasas (MMPs) 2, 9 y 13** y la catepsina K. Los productos de degradación del hueso son fagocitados por el osteoclasto que finalmente muere por apoptosis.



Una vez finalizada la reabsorción, la superficie ósea queda libre de células, excepto algunos fagocitos mononucleares encargados de eliminar los detritus y de formar la línea de cementación sobre la que se depositara el hueso nuevo. Esta fase se denomina de inversión y durante ella se produce el reclutamiento de los osteoblastos. Tras este periodo de aparente inactividad llegan al hueso los precursores de los osteoblastos, que proliferan y se diferencian como osteoblastos maduros y rellenan de osteoide los huecos formados por los osteoclastos. No se conocen con exactitud los mecanismos que determinan el acoplamiento entre los osteoblastos y los osteoclastos, aunque se cree que intervienen algunos factores de crecimiento. Posteriormente tiene lugar la fase de formación en la que los osteoblastos sintetizan y depositan la matriz osteoide que posteriormente se mineralizara. Se considera que aproximadamente la mitad de los osteoblastos formadores de hueso mueren por apoptosis. La otra mitad se transforma en osteoblastos de superficie (células de recubrimiento) que recubren el hueso neoformado, o a medida que forman hueso, quedan enterrados en él, y se diferencian en osteocitos. Los osteocitos se mantienen en contacto entre sí y con las células de la superficie ósea mediante una red de prolongaciones citoplasmáticas alojada en un sistema canalicular existente en el tejido óseo. Tanto los osteoclastos como los osteoblastos se originan en la medula ósea. Los precursores de los osteoclastos son de estirpe hematopoyética, mientras que los de los osteoblastos pertenecen al mesénquima (estroma) de la medula. Los precursores de los osteoclastos no pueden desarrollarse en ausencia de las células del estroma debido a la implicación del



sistema RANK-RANKL-osteoprotegerina (Figura 2). El papel de los osteoblastos y de los osteoclastos en la remodelación ósea esta fuera de toda duda, pero la función de los osteocitos en la misma es más dudosa (Bonewald, 2011; Goldring, 2015).



**Figura 2.-** Superior: Representación esquemática de las interacciones celulares del eje RANKL–RANK–OPG entre osteoblastos, precursores de osteoclastos y osteoclastos (izquierda) y maquinaria de ácido y enzimas líticas necesaria para la resorción ósea. Tomado de Adamopoulos y Mellins, 2015. Inferior: Representación esquemática del origen de las células implicadas en el proceso de remodelación ósea. Tomado de Redlich y Smolen, 2012.



## 2.2. Remodelación tisular durante los movimientos ortodóncicos

La remodelación ósea que se produce durante el movimiento dentario ortodóncico sigue las pautas generales comentadas en los párrafos anteriores, pero tiene peculiaridades que se exponen a continuación.

El movimiento dentario inducido por la aplicación de una fuerza ortodóncica se caracteriza por cambios de remodelación en los tejidos dentarios y periodontales. En esta situación la fuerza aplicada determina la compresión del hueso alveolar y del LPO por un lado, mientras que en el lado opuesto el ligamento periodontal se estira (zona de tensión). Además, las fuerzas alteran la vascularización del tejido periodontal que como respuesta sintetiza moléculas y metabolitos capaces de inducir respuestas en los tejidos periodontales.

En el movimiento ortodóncico también se produce una respuesta del LPO. Durante la fase inicial, en la que el diente invade y ocupa el espacio ocupado por el LPO este se transforma en hiperhémico, edematoso y infiltrado por células inflamatorias. A continuación hay un descenso progresivo de los fascículos de colágeno como resultado de la acción de algunas **MMPs** y otros agentes catabólicos de la matriz extracelular (MEC). El modelo teórico que describe la inducción del movimiento dentario después de la aplicación de una fuerza externa incluye varias etapas: primero el estiramiento de la matriz del ligamento y del hueso alveolar que altera

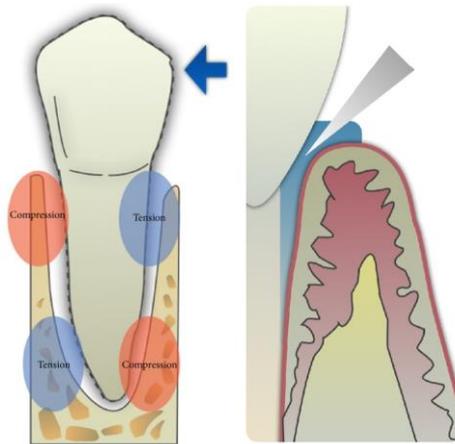


ambos tejidos con deformación celular que se traduce en activación de los fibroblastos y osteoblastos en el ligamento y el hueso, respectivamente; esta remodelación en el ligamento y en el hueso alveolar es lo que consiente que el diente se mueva. Hay que destacar que las células del ligamento reaccionan de forma diferentes a las fuerzas de tensión y de compresión predominando las anabólicas en las primeras y las catabólicas en las segundas (Krishnan y Davidovitch, 2009).

La teoría de la presión-tensión del movimiento ortodóncico, propuesta por Schwartz en 1932, describe el movimiento dentario en un contexto mecánico: en el lado de la presión los efectos biológicos serían los siguientes: alteración del flujo sanguíneo en el LPO presionado, muerte celular en el área de presión del LPO (hialinización), reabsorción del tejido hialinizado por los macrófagos, resorción ósea por osteoclastos del hueso alveolar. Por el lado de la tensión, se activa el flujo sanguíneo en las zonas de estiramiento del LPO lo cual favorece la actividad osteoblástica con el consiguiente depósito de osteoide y su posterior mineralización (ver von Böhl y Kuijpers-Jagtman, 2009) (Figura 3).

Recientemente se ha propuesto que la teoría de presión-tensión no es tan simple y que podría implicar respuestas biológicas tisulares más complejas, sugiriéndose que la zona de oposición al movimiento del hueso puede inducirse por la carga ejercida por las fibras estiradas del LPO, lo que también puede inducir una flexión leve de la pared alveolar; o por resorción directa descargando de la

pared alveolar, en el caso de las fuerzas de baja intensidad; y por resorción indirecta como reparación debida a la isquemia inducida por fuerzas de alta intensidad (Melsen, 2001). Schwarz propuso el concepto clásico de la fuerza óptima como “la fuerza que conducía a un cambio en la presión del tejido blando aproximó la presión arterial de los capilares, lo que previene su obstrucción en el LPO comprimido.” Las fuerzas que exceden el nivel óptimo producirían áreas de necrosis en los tejidos blandos, que previenen la reabsorción ósea, ya que el movimiento del diente no se produciría hasta que no se eliminen los tejidos necrosados.



**Figura 3.-** Izquierda: Zonas de presión y tensión tras la aplicación de un movimiento ortodóncico. Derecha: Localización del fluido crevicular gingival. Tomado de Apuzzo et al. 2013.

### 2.3. Bases moleculares de la remodelación tisular

La respuesta de adaptación bioquímica a la acción de una fuerza ortodóncica es un proceso altamente sofisticado. Muchas de



las etapas del proceso se limitan al LPO o sus proximidades y a las células del hueso alveolar, que son capaces de transformar las fuerzas mecánicas en fenómenos moleculares (transducción de la señal) y dar lugar al movimiento ortodóntico del diente. En realidad, todo ello es la respuesta de las células del LPO, osteoblastos y osteoclastos a las variaciones de la homeostasis local inducida por los mecanismos ortodónticos (ver Masella y Meister, 2006).

La aplicación de una fuerza ortodóntica altera cinco microambientes: la MEC, la membrana celular, el citoesquelto, la matriz proteica del núcleo y la expresión del genoma. Todo este complejo sistema por el que una fuerza se transforma en un proceso biológico constituye el campo de la mecanobiología (ver Del Valle et al., 2012). Es probable que el tratamiento ortodóntico sea una combinación de efectos mecánicos puros y de variaciones moleculares-genéticas-celulares.

Los mediadores biológicos de los procesos que acontecen en hueso alveolar y el LPO como consecuencia del movimiento dentario incluyen, entre otros, las prostaglandinas (Funk, 2001), las interleukinas y el factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (Kwan et al., 2004) y la MMPs, que son el objeto del presente estudio.

La MEC es el componente extracelular de los tejidos que presta apoyo a las células, almacena factores de crecimiento y regula la adhesión, el movimiento y las interacciones celulares (Benjamin y Khalil, 2012; Cobo, 2015). La formación y degradación de la MEC es



crucial en todos esos procesos biológicos implicados en el mantenimiento de la homeostasis y regeneración tisulares. Estos procesos biológicos están bajo el control de una familia de 28 endopeptidases conocidas como **metaloproteinasas de la MEC** (MMPs), metaloproteinasas con multidomios de Zn especializadas en la degradación de diferentes componentes de la MEC (Vu y Werb, 2000; Lenglet et al., 2013). La MEC está formada principalmente de polisacáridos, como el ácido hialurónico, las fibras de colágeno y elastina, proteoglicanos, como el condroitín sulfato o el heparán sulfato, lugares de unión de factores de crecimiento, moléculas de adhesión celular y otras moléculas que mantienen los tejidos hidratados. Los diferentes componentes de la MEC son dianas específicas para las diferentes MMPs. En base a la especificidad de sustrato se clasifican en 5 grupos: colagenasas (MMP-1, -8, -13), gelatinasas (MMP-2, -9), estromielisinas (MMP-3, -10, -11), matrilisinas (MMP-7 and -26), MMPs tipo membrana (MP MMP-14, 15, 16) y otras (MMP-12, -20 y -27 con estructura similar a la estromielisina; MMP-19, una proteasa degradante de la membrana basal; MMP-20, específica del diente; MMP-21, una gelatinasa que se expresa en algunos carcinomas; MMP-23, implicada en la reproducción; y MMP-28 o epilisina, que participa en las enfermedades reumáticas (Huxley-Jones et al., 2007; Benjamin y Khalil, 2012). Las MMPs han sido estudiadas en diferentes ámbitos de la odontología tanto en condiciones de normalidad como patológicas (Sambandam y Neelakantan, 2014; Jain y Bahuguna, 2015) y han sido propuestas como biomarcadores de diferentes patologías sistémicas y locales (Galliera et al., 2015).



La actividad de las MMPs se regula estrechamente a diferentes niveles, desde la transcripción génica a la traslación, activación proenzimática e inhibición por proteínas reguladoras, como los inhibidores tisulares de la metaloproteinasas (tissue-inhibitors of MMPs: TIMPs) que pueden neutralizar las MMPs y por tanto prevenir el exceso de degradación de la MEC. Por su participación en la biología tisular normal y su implicación en algunas patologías, hace que tanto las MMPs como sus inhibidores, hayan sido propuestos como biomarcadores de las mismas (Raffetto y Khalil, 2008; Galliera et al., 2010).

#### **2.4. El análisis del fluido crevicular gingival como método diagnóstico**

El FCG es un exudado presente en el surco gingival cuyo componente acuoso deriva sobre todo del suero pero que, al pasar a través de los tejidos blandos periodontales (el propio LPO y la encía) modifica su composición, y ésta varía de acuerdo al estado de esos tejidos (Tollefsen y Saltvedt, 1980). El FCG puede recogerse con relativa facilidad en surco gingival, sin necesidad de emplear métodos invasivos, y su análisis ofrece un gran potencial como fuente de los factores asociados a y/o derivados de los cambios en el hueso alveolar y tejidos periodontales como consecuencia de los movimientos ortodóncicos. En otras palabras, el FCG es una zona de fácil acceso a biomarcadores de lo que sucede durante los movimientos ortodóncicos. La presencia o ausencia de algunas sustancias en el FCG, así como elevaciones o descensos en ellas, permitiría identificar el nivel de remodelado de los tejidos



periodontales durante el movimiento ortodóncico, en base a su papel en la mecanobiología del mismo.

Un biomarcador puede definirse como una sustancia que se mide y evalúa como indicador de procesos biológicos normales o patológicos, o de la efectividad de un tratamiento farmacológico. Debe de ser específico y sensible y tener la capacidad de informar sobre una situación biológica; en el ámbito de la ortodoncia de los cambios en los tejidos duros y blandos en cada una de las fases del movimiento dentario (Brooks et al., 2009).

Existen abundantes estudios que han determinado diferentes componentes de la MEC y de sus metabolitos en el FCG en diferentes patologías dentales y periodontales. Los datos que se relacionan a continuación hacen referencia exclusivamente a estudios realizados en humanos (ver Krishnan y Davidovitch, 2006, 2009; Dudic et al., 2006). Hay revisiones recientes disponibles sobre la utilización de compuestos detectables en el FCG como biomarcadores del movimiento ortodóncico en distintos modelos animales (ver Apuzzo et al., 2013).

Pender et al. (1994) investigaron los cambios en los glicosaminoglicanos en el flujo de GCF en tres etapas de tratamiento ortodóncico, antes del tratamiento ortodóncico, encontrando escasas variaciones. Otros autores se han entrado en marcadores específicos de la resorción ósea (osteocalcina N-telopeptido) (Garlet et al., 2008), las enzimas proinflamatorias y de las prostaglandinas (Linkhart et al., 1991; Lowney et al., 1995; Grieve et al. 1994; Walker y Buring, 2001;



Sekhavat et al., 2002; Dudic et al., 2006; Nishijima et al., 2007) y de las actividades fosfatásicas alcalina y ácida (Perinetti et al., 2003, 2004). Además, existen diferencias en los lados de compresión y tracción: en el primero se produce una mayor expresión de TNF- $\alpha$ , RANKL, y MMP-1, mientras que el lado de tensión hay mayor expresión de IL-10, TIMP-1, colágeno de tipo I, osteoprotegerina y osteocalcina; la expresión de transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) fue similar en ambos lados (Garlet et al., 2007, 2008).

Con relación a las MMPs, un estudio pionero llevado a cabo por Apajalahti et al. (2003) demostró que la MMP-2 aumentaron perceptiblemente en el FCG de 4 a 8 h después de la aplicación de la fuerza ortodóncica, mientras que la MMP-1 no se modificaba. Ingman et al. (2005) encontraron resultados similares a finales del 1 mes de tratamiento. Trabajos más completos, como el llevado a cabo por Cantarella et al. (2006) demostró que estas proteínas degradantes de la MEC tenían diferentes niveles en el FCG en las caras de presión y de tracción de los dientes sometidos a movimiento ortodóncico, y que variaban en función del tiempo. En general, la compresión aumenta los niveles de MMPs (MMP-1 tiene el pico máximo a 1 hora, siendo el pico máximo a las 8 horas mientras que la tensión aumenta las MMPs durante la primera hora y se restablecen los niveles basales a las 8 horas. Por su lado, Capelli et al. (2011) analizaron los niveles de MMP-3, 9 y 13 en FCG a diferentes tiempos del movimiento ortodóncico en el FCG (7 días antes de comenzar el tratamiento y 1h, 24 h, y a los 14, 21 y 80 días) mediante inmunoensayo. En este caso los niveles de las tres MMPs se modificaron con el tiempo en la cara



de compresión. En un estudio similar realizado por Canavarro et al. (2013) se determinó determinaron los niveles MMP-1, -2, -3, -7, -8, -12, y -13 en el FCG en la caras de presión y tensión a las 1 y 24 horas, y los 7, 14, y 21 días. Estos autores no encontraron diferencias entre los controles y los grupos experimentales en ninguno de los tiempos, ni entre las caras de presión y tensión. Almeida et al. (2015), por su lao, analizaron los niveles de MMP-1, -2, -3, -7, -8, -12, y -13 a diferentes tiempos durante el movimiento ortodónico (una semana antes de comenzar la activación, inmediatamente después de la activación, después de 1 h, 24 h, y 7, 14, y 21 días) utilizando técnicas de inmunoensayo. Estos autores encontraron variaciones en los niveles de MMP-1 y en MMP-12 a las 24 horas de la activación, y concluye que los niveles de MMPs en el FCG no sufren cambios significativos como consecuencia de los movimientos ortodónicos. Por su parte en un modelo *in vitro* Karasawa et al. (2015) observaron disminución en la expresión de MMP-1, -3, y -13, y aumento de TIMP-2, y -3.

# MATERIAL Y TÉCNICAS





### **3. MATERIAL Y TÉCNICAS**

#### **3.1. Material**

Para la realización del presente trabajo se utilizaron muestras de FCG humano, obtenidas de pacientes del Instituto Asturiano de Odontología (IAO; Oviedo). Las muestras de GCG se obtuvieron de 16 sujetos (3 mujeres y 5 varones; edad media: 12,5 años; rango de edades: 11 a 13 años) a los que se les había prescrito tratamiento ortodóncico por diferentes motivos. Los sujetos fueron informados de las características y objetivos del estudio, y se obtuvo el consentimiento informado de sus padres o tutores legales. El estudio fue aprobado por el Comité Ético de IAO.

Antes de la recolección del FCG se limpio la superficie del diente para eliminar cualquier placa supragingival y se aplicó una corriente de aire durante 5 segundos. A continuación se recogió el FCG mediante tiras de papel estériles estándar (Periopaper®, Interstate Drug Exchange). Las tiras se introdujeron en el surco crevicular y mantenida en esa posición durante 30 segundos. De cada sujeto se tomaron muestras en el lado de presión y de el de tensión a los siguientes tiempos: 7 días antes de colocar aparatología (T0), a las 24 horas (T1), a los 7 días (T2), a los 14 días (T3) y a los 30 días (T4) tras la aplicación del tratamiento (Tabla 1). Uno de los pacientes (nº 3) no completo el estudio y en



otros 3 (nº 2, 4 y 7) no se pudieron obtener las muestras a todos los tiempos.

Nº	Identificación	Sexo	Edad	T0	T1	T2	T3	T4
1	GAF	V	13					
2	ARS	V	13					
3	SPL	V	13					
4	AJF	M	13					
5	ASJ	M	11					
6	DQM	V	12					
7	JDM	M	13					
8	SRM	V	12					

**Tabla 1.-** Pacientes incluidos en el estudio, indicando sexo, edad y tiempos a los que se recolectó la muestras de FCG. T0: 7 días antes de colocar aparatología; T1: a las 24 horas; T2: a los 7 días; T3: a los 14 días; T4: a los 30 días

Las tiras de papel se metieron en Eppendorf® estériles y almacenados a -4°C hasta el momento de su utilización.

### 3.2. Técnicas

La actividad MMP de los extractos proteicos del FCG se determinó utilizando un kit Fluorimetric SensoLyte 520 Generic MMP Assay Kit (AnaSpec) siguiendo las instrucciones del proveedor, y se realizó en los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Oviedo. Este



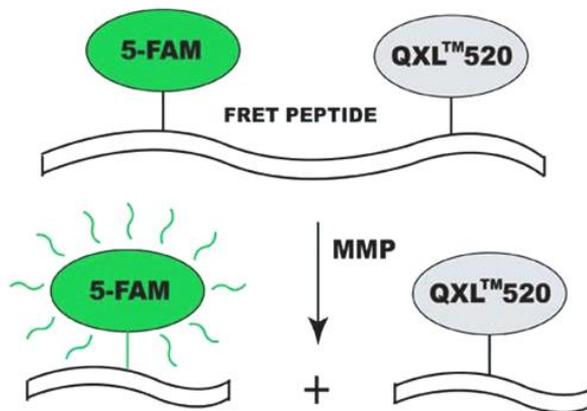
kit detecta la actividad de las MMPs de las MMP-1 a la MMP-14.

Las proteínas totales se extrajeron de las tiras de papel embebidas en el FCG utilizando un tampón de lisis Tris-CCI 50 mM Tris-HCl, pH 7.4; 300 mM NaCl; 1% Triton X-100; y el cóctel inhibidor de proteasas etilendiamina libre de ácido tetracético (Roche). Posteriormente, proteínas aisladas se incubaron durante 24 h con 4-aminofenil acetato mercúrico para activar todas las pro-MMPs presentes en el FCG. Las proteínas extraídas se llevaron hasta un volumen total de 1 ml.

El péptido apagado se incubó en pocillos con un formato de 96-well (50  $\mu$ l por well) durante 60 min a temperatura ambiente con los extractos de las proteínas aisladas del FCG. Tras la incubación se leyeron los pocillos a una longitud de onda de excitación/emisión = 490/520 nm para determinar las unidades relativas de fluorescencia. Los resultados se expresan en unidades relativas de fluorescencia, corregida por el *background*, por microgramo de proteína. Los datos de 3 experimentos independientes se calculó la media y el error estándar de la media, y las diferencias se determinaron mediante el test de ANOVA.



El principio de la técnica utilizada es el siguiente: se utiliza como sustrato un péptido-FRET (*Forster resonance energy transfer*; transferencia de energía de resonancia) apagado que tras romperse por la enzima (MMP en nuestro caso) genera fluorescencia que puede ser cuantificada en un lector de placa. Las unidades de fluorescencia relativas se correlacionan directamente con la actividad enzimática. El kit utilizado ha sido optimizado para la detección de MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 12, 13, y 14, y es entre 5 y 20 veces más sensible que los test para detectar cada MMP de manera separada (Figura 4).



**Figura 4.-** Fundamento de la técnica para la detección de la actividad MMPs utilizando un sustrato múltiple para diferentes MMPs. Tomado de Rakhmanova et al., 2015.

# RESULTADOS





---

#### 4. RESULTADOS.

De todas las MMPs que podían ser detectados con el kit utilizado en el trabajo se han seleccionado MMP1, MMP2, MMP3, MMP8, MMP9 y MMP13 por dos motivos: el volumen de FCG disponible (y en consecuencia la cantidad de proteína en ellos) y las MMP que según los datos bibliográficos disponibles tienen mayor implicación funcional en el movimiento dentario. En las tablas que siguen, y que sirven para exponer los resultados, las cuadrículas en color rojo (compresión) o azul (tensión) muestran las diferencias estadísticamente significativas a los diferentes tiempos de la investigación.

En condiciones basales, en el T0, en el FCG de los sujetos que iban a ser sometidos al estudio no se detectó actividad en 5 las MMPs, y se apreció a niveles residuales (en torno a 0,1 URF/ $\mu$ g de proteína) MMP2, MMP3 y MMP8. Esta actividad seguramente debe de estar en relación con la actividad básica y permanente de remodelación del hueso alveolar en los sujetos en estudio, sobre todo teniendo en cuenta la edad de los mismos ya que se pueden considerar en fase de crecimiento.

La MMP1, también denominada colagenasa intersticial o colagenasa de los fibroblastos, interviene en la degradación de diferentes tipos de colágeno en la MEC. Como consecuencia de los movimientos ortodóncicos su actividad se encuentra aumentada exclusivamente en la zona de tensión, con valores máximos a los 14 días (Tabla 2).



Tabla 2.- Valores relativos de actividad de MMP1 expresados en URF/ $\mu$ g de proteína

MMP1	T0	T1	T2	T3	T4
Compresión	0	0	0,1	0	0
Tensión	0	0,2	0,2	1,6 $\pm$ 0,2	0,2

A MMP2 también se la conoce bajo el término de gelatinasa 1, e interviene principalmente en los procesos de degradación del colágeno IV de las membranas basales y en la remodelación ósea. En el curso de los movimientos dentarios su actividad se encuentra aumentada, a partir de la primera semana hasta el final del periodo de tiempo estudiado tanto en la cara de compresión como de tensión, siendo más evidentes las variaciones en la primera (Tabla 3).

Tabla 3.- Valores relativos de actividad de MMP2 expresados en URF/ $\mu$ g de proteína

MMP2	T0	T1	T2	T3	T4
Compresión	0,1	0,3	3,2 $\pm$ 0,2	3,6 $\pm$ 0,1	1,8 $\pm$ 0,2
Tensión	0,1	0,1	2,6 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,3

Por lo que refiere a la MMP3 o estromelisina 1, su espectro de sustratos es mucho más amplio ya que puede degradar diferentes tipos de colágeno (II, III, IV, IX y X), así como proteoglicanos,



fibronectina, laminina y elastina. En los movimientos dentarios inducidos por ortodoncia, en la población analizada en el presente trabajo, las principales variaciones se producen durante las primeras fases del mismo, encontrándose elevación de la actividad en las primeras 24 horas y la primera semana; en los periodos de tiempo más largos, aunque su actividad es mayor que en los controles, es menor que durante la primera semana. Por otro lado los cambios encontrados fueron paralelos en las caras de compresión y tensión de los dientes.

Tabla 4.- Valores relativos de actividad de MMP3 expresados en URF/ $\mu$ g de proteína

MMP3	T0	T1	T2	T3	T4
Compresión	0,1	1,8 $\pm$ 0,3	4,2 $\pm$ 0,2	0,6	0,7
Tensión	0,1	1,6 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,4	0,6	0,4

La MMP8 es también una colagenasa que se secreta de forma inactiva. No obstante, teniendo en cuenta el protocolo experimental realizado en el que se han activado las formas pro-MMP de las MMPs, debe de considerarse que está enzima también está activada. Además los datos experimentales del trabajo así lo sugieren ya que sus niveles de actividad se incrementan de manera moderada con los movimientos ortodóncicos, siendo más evidentes en los periodos de tiempo mayores (Tabla 5).



Tabla 5.- Valores relativos de actividad de MMP8 expresados en URF/ $\mu$ g de proteína

MMP8	T0	T1	T2	T3	T4
Compresión	0,1	0,8	0,8	1,6 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,1
Tensión	0,1	0,4	0,7	1,0 $\pm$ 0,1	1,3 $\pm$ 0,1

La MMP9 o gelatinasa B pertenece al grupo de las matrilisinas y degrada sobre todo los colágenos de tipo IV y V pero también otros componentes de la MEC. En base a los resultados obtenidos, también participa en la remodelación tisular en el curso de los movimientos ortodóncicos ya que su actividad se incrementa por los mismos, sobre todo en las primeras fases del movimiento (hasta los 7 días) y en mayor medida en el lado de compresión (Tabla 6).

Tabla 6.- Valores relativos de actividad de MMP9 expresados en URF/ $\mu$ g de proteína

MMP9	T0	T1	T2	T3	T4
Compresión	0	1,7 $\pm$ 0,1	3,6 $\pm$ 0,3	0,6	0,2
Tensión	0	1,2 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 0,1	0,3	0,3

URF/ $\mu$ g de proteína

Por último, MMP13 o colagenasa 3, es una de las primeras MMPs conocidas y su sustrato fundamental de actuación son los



colágenos. Desde hace años se sabe que interviene en los procesos de turnover óseo y en la osificación. En nuestro trabajo su actividad de se encuentra aumentada tanto en el lado de presión como de tensión, especialmente en éste, desde las 24 horas hasta los 14 días tras la inducción del movimiento dentario ortodóncico (Tabla 7).

Tabla 7.- Valores relativos de actividad de MMP1 expresados en URF/ $\mu$ g de proteína

MMP13	T0	T1	T2	T3	T4
Compresión	0	2,6 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,1	0,8	0
Tensión	0	3,7 $\pm$ 0,4	2,9 $\pm$ 0,1	1,0 $\pm$ 0,1	0,3



# DISCUSSION





## 5. DISCUSION.

El presente trabajo de investigación se diseñó para analizar en el FCG humano los efectos en la actividad de algunas MMPs de los movimientos dentarios inducidos por tratamientos de ortodoncia. Se ha analizado una población reducida, homogénea respecto a la edad, de sujetos en periodo de crecimiento, durante un periodo de tiempo que abarca desde las 24 h hasta los 20 días de iniciado el tratamiento.

Las últimas investigaciones indican que el genoma de todos los organismos vivos tiene un 2% aproximadamente de genes, unos 500 genes, que codifican para proteasas (Fanjul-Fernandez et al., 2010). Las MMPs son endopeptidasas zinc-dependientes que degradan la MEC y poseen características estructurales y funcionales semejantes. Participan en procesos normales y patológicos, embriogénesis, curación de las heridas, inflamación, cáncer, etc ... y en los últimos años se han convertido en dianas terapéuticas en muchos procesos (Lopez-Otin et al., 2009). En la actualidad se dispone de métodos como la eimografía, ELISA, y tests basados en la actividad de péptidos que pueden ser utilizados para los estudios de las MMPs. El primero es un método con rendimiento relativo bajo, mientras que la técnica de ELISA cuantifica de forma relativa pero no da información sobre la actividad de las MMPs. Pero en los últimos años se ha desarrollado la técnica de fluorometría o transferencia de energía de resonancia (*Forster resonance energy transfer*: FRET) ha permitido el análisis continuo y con alto rendimiento de estas enzimas. FRET se basa en la transferencia de energía distancia-dependiente de una molécula



donante a otra aceptora. En general las fracciones del donante y del aceptador son diferentes, y en este caso FRET se puede detectar por la aparición de fluorescencia en el aceptador o el apagado de la misma en el donante. Los ensayos para proteasas normalmente implican a un donante fluorescente en un extremo y a un aceptor apagado en el otro separados entre sí por un péptido que contiene la secuencia en la que rompe la proteasa. Los pares donante/ aceptador deben de tener suficiente superposición espectral para que ocurra la transferencia de energía eficiente que haga que la diferencia de espectros sea distinguible.

Las MMPs investigadas en el presente intervienen en diferentes procesos biológicos relacionados con el movimiento dentario (Meeran, 2012) y su actividad es regulada por las citoquinas y factores proinflamatorios que se producen en el curso de los movimientos ortodóncicos (Pulkoski-Gross, 2012). La mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha que ponen en relación las MMPs con los movimientos ortodóncicos se centran en determinar la elevación o descenso de los niveles (Capelli et al., 2011; Canavarró et al., 2013; Almeida et al., 2015; Karasawa et al., 2015) o del inmunomarcaje (Fernández-González et al., 2015, 2016) durante el movimiento dentario. La técnica utilizada en nuestro trabajo determina la actividad de las MMPs más que su presencia. Este hecho es muy importante si se tiene en consideración que algunas MMPs se liberan de forma no activa y que, por tanto su presencia en el espacio extracelular, o es nuestro caso el FCG, no indica necesariamente que se encuentren activas. Por otro lado, es difícil comparar resultados



con los aportados por otros investigadores ya que el fundamento del sistema de valoración de las MMPs es diferente.

En cualquier caso, en el presente trabajo se ha detectado que el movimiento ortodóncico no modifica la actividad de MMP1 salvo a las dos semanas del tratamiento en la cara de tensión; aumenta la actividad de MMP2 tanto en las cara de compresión como de tensión, aunque algo más en la primera, a partir de la semana de tratamiento; incrementa la actividad de MMP3 de forma paralela y progresiva en ambos lados durante la primera semana; MMP8 aumenta su actividad en ambos lados a los 15 y 30 días; la actividad de MMP9 esta aumentada en ambos lados durante la primera semana; y MMP13 también se incrementa en la primera semana, aunque en el lado de tensión se mantiene su actividad también a los 15 días. Expresado en forma de cronograma los resultados se exponen en la tabla 8.

Comparando estos resultados con los existentes en la bibliografía con relación a las MMPs en FCG, se aprecia que son parcialmente concidentes con los de Apajalahti et al. (2003), Ingman et al. (2005), y Capelli et al. (2011). Pero difieren completamente de los de Canavaro et al. (2013) que no encontraron diferencias entre los controles y los grupos experimentales en ninguno para ninguna de las MMPs estudiadas, a ningún tiempo, ni entre las caras de presión y tensión; y de los de Karasawa et al. (2015) observaron disminución en la expresión de MMP-1, -3, y -13. Todas estas diferencias seguramente deben de ser atribuidas: a los diferentes métodos de valoración de las MMPs, a diferencias en la edad de los grupos de



pacientes estudiados y posiblemente a variaciones individuales de los sujetos.

Tabla 8.- Tiempos de actividad de las MMPs analizadas

	24 h	7 días	14 días	30 días
MMP1				
MMP2				
MMP3				
MMP8				
MMP9				
MMP13				

A la vista de estos datos resulta evidente que son necesarios ulteriores estudios para determinar si la medición de la actividad de MMPs en FCG puede considerarse un biomarcador de lo que sucede en el hueso y en el ligamento periodontal durante los movimientos ortodóncicos (ver Apuzzo et al., 2013; Anand-Kumar et al., 2015).

El trabajo realizado ofrece datos importantes sobre la biología y la cronobiología de los movimientos dentarios inducidos por movimientos ortodóncicos. Sin embargo, también presenta una serie de limitaciones que conviene poner de manifiesto. El valor muestral fue escaso y ello hace que los resultados deban de ser tomados con precaución. Por otro lado, aunque representa una notable ventaja para interpretar los hallazgos, el escaso rango de edades de los sujetos incluidos en el estudio hace que no puedan extrapolarse a la



población general. Además, hubiera sido de interés poder valorar un mayor número de MMPs así como sus inhibidores. Pero la cantidad de FCG que se puede obtener de cada sujeto limita el número de ensayos que se pueden realizar. Y también conviene destacar que este tipo de análisis no son económicos y que también este factor limita el trabajo. Sería deseable realizar un estudio pues, con mayor población, mayor rango de edades, y más análisis para corroborar los prometedores datos del presente estudio ya que podrían ser de gran interés para mejorar los tratamientos de ortodoncia.



# BIBLIOGRAFÍA





---

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Adamopoulos IE, Mellins ED. Alternative pathways of osteoclastogenesis in inflammatory arthritis. *Nat Rev Rheumatol.* 2015;11:189-94.
- Almeida RC, Capelli J Jr, Teles RP. Levels of gingival crevicular fluid matrix metalloproteinases in periodontally compromised teeth under orthodontic forces. *Angle Orthod.* 2015; 85:1009-14.
- Anand-Kumar S, Saravanan K, Kohila K, Sathesh Kumar S. Biomarkers in orthodontic tooth movement. *J Pharm Bioallied Sci.* 2015; 7(Suppl 2): S325–S330.
- Apajalahti S, Sorsa T, Railavo S, Ingman T. The *in vivo* levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2003;82:1018-22.
- Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. Biomarkers of Periodontal Tissue Remodeling during Orthodontic Tooth Movement in *Mice and Men*: Overview and Clinical Relevance. *Scientific World Journal.* 2013; 2013: 105873.
- Benjamin MM, Khalil RA. Matrix metalloproteinase inhibitors as investigative tools in the pathogenesis and management of vascular disease. *EXS* 2012; 103:209-79.
- Brooks PJ, Nilforoushan D, Manolson MF, Simmons CA, Gong SG. Molecular markers of early orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2009;79:1108-13.



- Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011; 26:229-38.
- Canavarro C, Teles RP, Capelli J jr. Matrix metalloproteinases - 1, -2, -3, -7, -8, -12, and -13 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a longitudinal randomized split-mouth study. *Eur J Orthod.* 2013; 35:652-8.
- Cantarella G, Cantarella R, Caltabiano M, Risuglia N, Bernardini R, Leonardi R. Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;130:568.e11-6.
- Capelli J Jr, Kantarci A, Haffajee A, Teles RP, Fidel R Jr, Figueredo CM. Matrix metalloproteinases and chemokines in the gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 2011; 33:705-11.
- Cobo T. Efecto de la periositina en la expresión génica y el comportamiento de las células del metabolismo ósea: sus implicaciones en el tratamiento de ortodncia. Tesis Doctoral. Universidad de Oviedo, 2015.
- Del Valle ME, Cobo T, Cobo JL, Vega JA. Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins. *Microsc Res Tech.* 2012; 75:1033-43
- Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci.* 2006;114:416-22.



- Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010; 11:219-27.
- Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1803:3-19.
- Fernández-González FJ, Cañigral A, López-Caballo JL, Brizuela A, Cobo T, de Carlos F, Suazo I, Pérez-González Y, Vega JA. Recombinant osteoprotegerin effects during orthodontic movement in a rat model. *Eur J Orthod.* 2015. pii: cju056.
- Fernández-González FJ, López-Caballo JL, Cañigral A, Menéndez-Díaz I, Brizuela A, de Cos FJ, Cobo T, Vega JA. Osteoprotegerin and zoledronate bone effects during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2016; 19:54-64.
- Funk CD. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in eicosanoid biology. *Science.* 2001; 294:1871-5.
- Galliera E, Banfi G, Corsi MM. Human bone disorders: pathological role and diagnostic potential of matrix metalloproteinases. *Int J Biochem Cell Biol* 2010; 42:1590-3.
- Galliera E, Tacchini L, Corsi Romanelli MM. Matrix metalloproteinases as biomarkers of disease: updates and new insights. *Clin Chem Lab Med.* 2015; 53:349-55.
- Garlet TP, Coelho U, Repeke CE, Silva JS, Cunha Fde Q, Garlet GP. Differential expression of osteoblast and osteoclast



- chemmoattractants in compression and tension sides during orthodontic movement. *Cytokine*. 2008;42:330-5.
- Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci*. 2007;115:355-62.
  - Goldring SR. The osteocyte: key player in regulating bone turnover. *RMD Open*. 2015; 1 (Suppl 1):e000049.
  - Grieve WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 beta (IL-1 beta) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1994;105:369-74.
  - Huxley-Jones J, Robertson DL, Boot-Handford RP. On the origins of the extracellular matrix in vertebrates. *Matrix Biol* 2007; 26:2-11.
  - Ingman T, Apajalahti S, Mäntylä P, Savolainen P, Sorsa T. Matrix metalloproteinase 1 and 8 in GCF during orthodontic tooth movement: A pilot study during 1 month follow-up after fixed appliance activation. *Eur J Orthod*. 2005;27:202-7.
  - Jain A, Bahuguna R. Role of matrix metalloproteinases in dental caries, pulp and periapical inflammation: An overview. *J Oral Biol Craniof Res* 2015; 5: 212-8.
  - Karasawa Y, Tanaka H, Nakai K, Tanabe N, Kawato T, Maeno M, Shimizu N. Tension Force Downregulates Matrix Metalloproteinase Expression and Upregulates the Expression of Their Inhibitors through MAPK Signaling Pathways in MC3T3-E1 cells. *Int J Med Sci*. 2015; 12:905-13.



- Kwan Tat S, Padrines M, Théoleyre S, Heymann D, Fortun Y. IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: Interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2004;15:49-60.
- Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006;129:469-e1–469-e32.
- See comment in PubMed Commons below Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2009; 88:597-608.
- Lenglet S, Mach F, Montecucco F. Role of matrix metalloproteinase-8 in atherosclerosis. *Mediators Inflamm* 2013; 2013:659282.
- Linkhart TA, Linkhart SG, MacCharles DC, Long DL, Strong DD. Interleukin-6 messenger RNA expression and interleukin-6 protein secretion in cells isolated from normal human bone: regulation by interleukin-1. *J Bone Min Res.* 1991; 6:1285-94.
- López-Otín C, Palavalli LH, Samuels Y. Protective roles of matrix metalloproteinases: from mouse models to human cancer. *Cell Cycle.* 2009; 8:3657-62.
- Lowney JJ, Norton LA, Shafer DM, Rossomando EF. Orthodontic forces increase tumor necrosis factor  $\alpha$  in the human gingival sulcus. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 1995;108:519-24.
- Masella RS, Meister M. Current concepts in biology of orthodontic tooth movement. *Am J Orthod.* 2006; 129:458-68.



- Meeran NA. Biological response at the cellular level within the periodontal ligament on application of orthodontic force - An update. *J Orthod Sci.* 2012 1:2-10.
- Melsen B. Tissue reaction to orthodontic tooth movement- A new paradigm. *Eur J Orthod.* 2001; 23:671-81.
- Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells *in vitro*. *Orthod Craniofac Resnone.* 2006;9:63-70.
- Perinetti G, Paolantonio M, D'Attilio M, D'Archivio D, Dolci M, Femminella B, Festa F, Spoto G. Aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. A controlled short-term longitudinal study. *J Periodontol.* 2003; 74:145-52.
- Perinetti G, Paolantonio M, Serra E, D'Archivio D, D'Ercole S, Festa F, Spoto G. Longitudinal monitoring of subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and crevicular alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities around orthodontically treated teeth. *J Clin Periodontol.* 2004; 31:60-7.
- Pender N, Samuels RH, Last KS. The monitoring of orthodontic tooth movement over a 2-year period by analysis of gingival crevicular fluid. *Eur J Orthod.* 1994; 16:511-20.
- Pulkoski-Gross AE. Historical perspective of matrix metalloproteases. *Front Biosci (Schol Ed).* 2015; 7:125-49.



- Raffetto JD, Khalil RA. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in vascular remodeling and vascular disease. *Biochem Pharmacol* 2008; 75: 346–59.
- Rakhmanova V, Meyer R, Tong X. , Ph.D. Assay: New Substrates for FRET-Based Assays. Use of a Long-wavelength Fluorophore to Detect the Activity of MMPs. *Gen Exclusives tutorials*. 2015, 27
- Redlich K, Smolen JS. Inflammatory bone loss: pathogenesis and therapeutic intervention. *Nat Rev Drug Discov*. 2012; 11:234-50.
- Sambandam V, Neelakantan P. Matrix metalloproteinases (mmp) in restorative dentistry and endodontics. *J Clin Pediatr Dent*. 2014; 39:57-9.
- Schwarz AM. Tissue changes incident to orthodontic tooth movement. *Int J Orthod*. 1932; 18:331-52.
- Schenkein HA, Koertge TE, Brooks CN, Sabatini R, Purkall DE, Tew JG. IL-17 in sera from patients with aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2010; 89:943-7.
- Sekhavat AR, Mousavizadeh K, Pakshir HR, Aslani FS. Effect of misoprostol, a prostaglandin E1 analog, on orthodontic tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2002; 122:542-7.
- Sims NA, Gooi JH. Bone remodeling: Multiple cellular interactions required for coupling of bone formation and resorption. *Semin Cell Dev Biol*. 2008; 19:444-51.



- Sims NA, Martin TJ. Coupling the activities of bone formation and resorption: a multitude of signals within the basic multicellular unit. *Bonekey Rep.* 2014; 3:481.
- Tollefsen T, Saltvedt E. Comparative analysis of gingival fluid and plasma by crossed immunoelectroforeseis. *J Periodont Res.* 1980; 15:96-106.
- von Böhl M, Kuijpers-Jagtman AM. Hyalinization during orthodontic tooth movement: A systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod.* 2009; 31:30-6.
- Vu TH, Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14:2123-33.
- Walker JB, Buring SM. NSAID impairment of orthodontic tooth movement. *Ann Pharmacother.* 2001;35:113-5.