



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
MASTER UNIVERSITARIO DE ORTODONCIA Y ORTODPEDIA DENTOFACIAL

Mecanoproteínas ASIC y movimiento dentario
Bases de la mecanotransducción

Claudia Stan

Trabajo Fin de Master
Mayo de 2012



UNIVERSIDAD DE OVIEDO
MASTER UNIVERSITARIO DE ORTODONCIA Y ORTODPEDIA DENTOFACIAL

Mecanoproteínas ASIC y movimiento dentario
Bases de la mecanotransducción

Claudia Stan

Tutor: José Antonio Vega Alvarez

Historia de este Documento

Versión	Fecha	Comentarios
---------	-------	-------------

Índice

1. Introducción.....	5
2. Estado actual del problema.....	7
2.1. Canales iónicos	7
2.1.1. Introducción	7
2.1.2. Canales ASIC	8
2.2. Ligamento periodontal.....	11
2.3. Movimiento ortodoncico	13
2.4. Mecanotransducción	14
3. Objetivos.....	17
4. Material y técnica	18
5. Resultados.....	21
5.1. Identificación del ligamento periodontal	21
5.2. Localización de los canales ASIC2 en el ligamento periodontal	22
5.4. Relación de los canales ASIC2 con el ligamento periodontal / movimiento ortodoncico	23
6. Discusión	267
7. Conclusiones.....	30
8. Bibliografía.....	31

Tabla de Ilustraciones

Figura 1.	Familias de canales iónicos.....	5
Figura 2.	Esquema básico de una canal ENaC/DEG.....	9
Figura 3.	La estructura de los canales iónicos (ASIC)..	10
Figura 4.	La familia de canales ionicos ASIC.....	10
Figura 5.	Ilustración del movimiento ortodoncico..	14
Figura 6.	Puntos cefalométricos en la telerradiografía; Error! Marcador no definido.	

Tablas

Tabla 1. Propiedades de los canales ASIC 11

RESUMEN.- Algunas proteínas de la familia de las degenerinas/ENaC, especialmente los ASIC (canales iónicos sensibles a ácido), funcionan como sensores generales y como mecanosensores, o pueden ser necesarios para la mecanosensación, en una amplia gama de especies y tipos celulares. En el presente trabajo se investigó mediante técnicas de inmunohistoquímica la expresión del canal iónico ASIC2 en el ligamento periodontal del primer molar superior de rata, en condiciones de normalidad y tras someter el diente a tracción ortodóntica (50 g) durante 10 días. En condiciones de normalidad el ligamento periodontal expresa ASIC2, que se ve incrementado en la zona de tensión y desaparece en la zona contraria como consecuencia de la tensión. Además, el movimiento ortodóntico experimental conlleva aparición de ASIC2 en los odontoblastos, en las fibras nerviosas pulpares y en el tejido óseo y cemento del lado sometido a tensión. Estos resultados demuestran que en el diente de rata la expresión del canal iónico ASIC2 es regulado mecánicamente y puede actuar como mecanoproteína.

Palabras clave: canales iónicos ASIC2, ligamento periodontal, movimiento ortodóntico, mecanotransducción, rata

SUMMARY.- Some proteins of the degenerin/ENaC family, primarily the acid-sensing ion channel (ASIC) ones, work as general somatosensory sensors and mechanosensors, or they may be necessary for the mecanosensation in a wide range of cell types and species. In the present study the expression of ionic channel ASIC2 was assessed immunohistochemically in the periodontal ligament of the rat first upper molar, in both normal conditions and after orthodontic traction (50 g) for 10 days. ASIC2 is normally present in the periodontal ligament, and it increased in the zone of tension and disappears in the opposite zone as a result of the tension. In addition, the experimental orthodontic movement results in expression of ASIC2 in the odontoblasts, pulpar nerve fibres, and in the bony weave and cement of the tensed side. These results demonstrate that in the rat tooth the expression of ionic channel ASIC2 is regulated mechanically and can act like mechanoprotein.

Keywords: acid sensing ion channels ASIC2, periodontal ligament, orthodontic movement, mechanotransduction, rat

1. Introducción

Las bases moleculares de los procesos sensitivos se asocian a la expresión de canales iónicos específicos en las fibras nerviosas y en las células sensoriales. Existen numerosas familias de canales iónicos implicados en estos procesos (Figura 1). Al menos una de ellas siempre interviene en el desencadenamiento de impulsos nerviosos más o menos específicos, pero en ningún caso exclusivos de un tipo de sensibilidad (Belmonte y Viana, 2008).

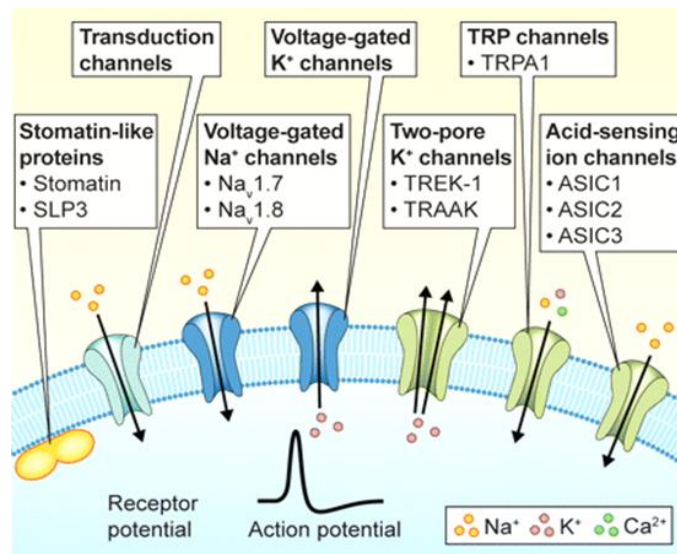


Figura 1.- Familias de canales iónicos relacionados con diferentes tipos de sensibilidad. Las clases de canales iónicos que convierten o modulan la sensibilidad “de contacto” aparecen en negrita (Tomado Lumpkin y Cols., 2010).

Pero los canales iónicos, o al menos algunos de ellos, son capaces de transducir los factores mecánicos que actúan sobre las células, es decir, convierten las fuerzas en efectos biológicos controlando, regulando y modulando, la expresión de genes y la síntesis de algunas proteínas.

De todas las familias de canales iónicos con potencial papel mecaotransductor, las proteínas de la familia ASIC (acid-sensing ion channels), perteneciente a la superfamilia de las degenerinas/canales epiteliales de Na⁺, es la que mejor se conoce y más se ha estudiado.

En el área estomatólogica son pocos los trabajos que han analizado la presencia de proteínas ASIC, limitándose la mayoría de los estudios a los nervios y el aparato

sensitivo de la pulpa. Así, algunos autores han encontrado inmunorreacción para estas proteínas en los receptores de tipo Ruffini del ligamento periodontal (Rahman et al., 2011) y en los nervios de la pulpa dentaria (Ichikawa y Sugimoto, 2002). Por otro lado, también se ha demostrado la presencia de esta proteína en los odontoblastos de los dientes humanos (Solé-Magdalena y Cols., 2011).

El presente trabajo de investigación se ha planteado sobre la base de que todas las células sometidas a presiones y/o fuerzas deben de expresar mecanoproteínas capaces de transducirlas y producir efectos biológicos. Algunas células del diente, y sobre todo del ligamento periodontal deberían expresar por tanto estas proteínas. Este estudio explora si en estas localizaciones hay ASIC2 y si su expresión y localización son reguladas por las fuerzas a las que normalmente se somete al diente en los movimientos ortodóncicos.

2. Estado actual del problema

Con el fin de poder hacer comprensible el estudio que se ha realizado y sacar el mayor provecho a los resultados que se obtengan, se ha hecho una revisión en detalle de los tres aspectos esenciales que toca este trabajo: los canales iónicos y la mecanotransducción, el ligamento periodontal y el movimiento ortodóntico.

2.1. Canales iónicos

2.1.1. Introducción

Los canales iónicos son proteínas de transmembrana, permeables a algunos tipos de iones (cationes, aniones) que desempeñan un papel crucial en la transducción nerviosa que ocurre en los órganos de los sentidos de la mayoría de las especies animales, desde los mamíferos a peces y nematodos (Montell, 2005; Bandell y Cols., 2007; Lingueglia, 2007). Puede afirmarse, pues, que los sistemas sensores son dependientes de la activación de canales iónicos que traducen estímulos específicos en señales eléctricas. Existen varias familias de canales iónicos.

Pero además, algún tipo de canal iónico está presente en la mayoría de las células, independientemente de su naturaleza. Es evidente según este concepto, que aunque en sentido neurobiológico la transducción es un fenotipo el genotipo para ella existe en todas las células.

Cuando una fuerza actúa sobre un tejido, es casi seguro que interfiere con la biología de sus células. Y este efecto, según los conocimientos actuales, se efectúa por medio de la apertura o cierre de diferentes canales iónicos. Pero es evidente, también, que los factores mecánicos no actúan directamente sobre las células aisladas. Por ello debe existir alguna estructura que transmita desde el exterior los efectos a las células, y el mejor candidato para ello es la matriz extracelular. Por otro lado, una vez que se modifica la matriz extracelular por una fuerza, las uniones que tiene con la membrana celular hacen que el canal iónico – el poro- se abra. Y la entrada de iones al interior del citoplasma puede activar cascadas de señalización que actúen sobre el núcleo regulando la expresión génica. Se han descrito en este proceso unas cuantas proteínas G capaces de transducir fuerzas. No obstante, la mayoría de los autores están de acuerdo en que en el proceso de mecanotransducción en las células no especializadas, o si se prefiere no

nerviosas, participa también el citoesqueleto. En una revisión reciente realizada por Valle y Cols. (2012) se recogen todas las posibilidad de interacción fuerza-matriz extracelular-membrana celular-citoesqueleto-núcleo (Figura 2).

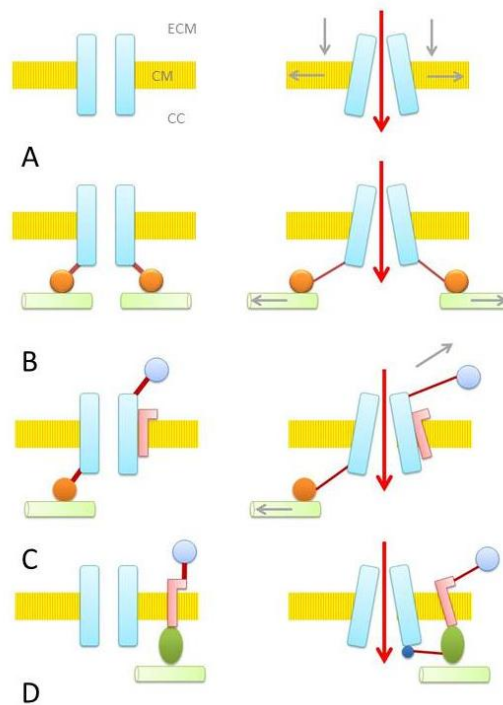


Figura 2.- Esquema que representa los posibles mecanismos de apertura de los canales iónicos por fuerzas mecánicas, y la participación de la membrana celular, la matriz extracelular y el citoesqueleto. Tomada de Valle y Cols. (2012).

2.1.2. Canales ASIC

Las proteínas de los canales ASICs (acid-sensing ion channels), pertenecen a la superfamilia ENa⁺C/DEG (epitelial amiloride-sensitivo sodium channel/degenerin; Kellenberger y Schild, 2002; Holzer, 2009, 2010; Figura 3). DEG/ ENa⁺C son proteínas que pueden funcionar como mecanosensores o pueden ser necesarias para la mecanosensación en varias especies o en varios tipos celulares (ver para una revisión Montañó y Col, 2009; Valle y Cols., 2012). Su distribución en el sistema nervioso es muy amplia, especialmente en el sistema nervioso periférico. Así, se han encontrados transcritos y las proteínas DEG/ ENa⁺C en algunas subpoblaciones de neuronas sensitivas así como en las terminaciones nerviosas en las que se produce la

mecanotransducción como son los receptores del tacto, a nivel de los foículos pilosos, de las vibrisas, de los corpúsculos de Meissner y Pacini (revisado por Valle y Cols., 2012; Cabo y Cols., 2012). De especial interés para nuestro trabajo es la presencia de inmunorreacción para el ASIC3 en los mecanorreceptores de tipo Ruffini del ligamento periodontal de rata (Rahman et al., 2011). ASIC2 y ASIC3 parecen estar implicados en la mecanotransducción (ver Montaña y Cols., 2009; Calavia y Cols., 2010), ASIC2a y b en el gusto (Shimada y Cols., 2006) y en la visión (Ettaiche y Cols., 2004, 2006).

Pero además, los canales ASIC tienen una amplia distribución en otros tejidos de la economía (ver Holzer, 2009), y existen abundantes datos sobre su regulación por factores mecánicos por ejemplo en el disco intervertebral (Uchiyama et al., 2007; Uchiyama et al., 2008).

Originariamente, a los canales ASIC se les atribuyó un papel esencial en la detección de las variaciones extracelulares de pH y de protones, con posterioridad se comprobó que participaban en numerosas funciones, especialmente mecánicas (ver tabla 1).

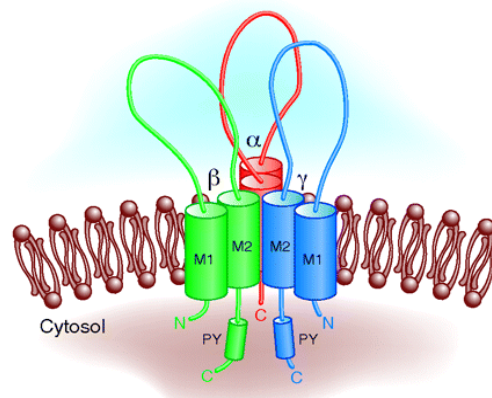


Figura 3.- Esquema básico de un canal ENaC/DEG, la superfamilia a la que pertenecen los canales ASIC. Tomado de Bhalla y Hallow, 2008.

La estructura de los canales ASIC presenta dos dominios de transmembrana (TM1 y TM2), un bucle extracelular largo rico en cisteína responsable de la apertura y los dominios N- y C-terminal que están en contacto con el espacio intracelular. (Figura 4).

ASIC1a se ensamblan como tetrámeros. Champigny y Cols. (1998) demostraron que la región pre-TM2 juega un papel importante en la sensibilidad del pH y apertura del canal y que los nueve aminoácidos de la región TM1 de ASIC3 y de la subunidad ASIC2b

participan en la regulación de la penetración y de la selectividad de los iones (Coscoy, 1999).

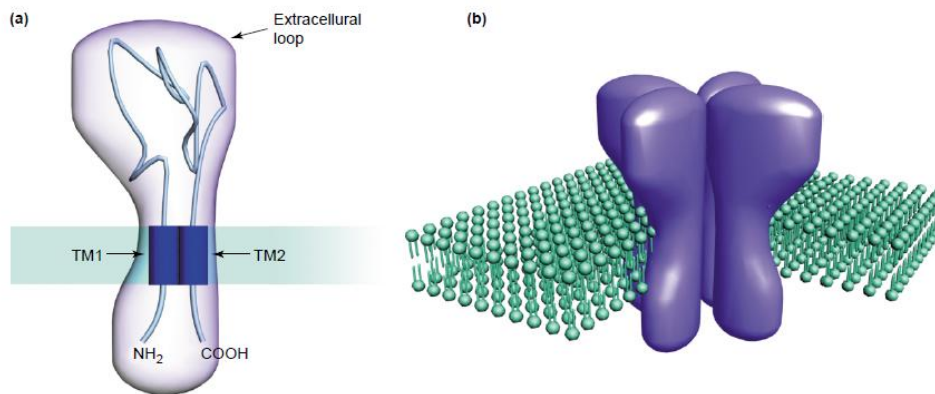


Figura 4.- La estructura de los canales iónicos (ASIC). a) Subunidad ASIC; 2 dominios transmembranaarios (TM), el dominio extracelular y el dominio intracelular. b) cuatro subunidades ensambladas que forman una unidad funcional. Tomado de Krishtal, 2003.

Las proteínas ASIC son codificadas por 4 genes diferentes, que originan 6 proteínas (Wemmie y Cols., 2006) ya que hay *splicing* alternativo de *asic1* y *asic2* (Figura 5). De las seis proteínas ASIC, solamente 4 son activadas por pH ácido: ASIC1a, ASIC1b, 2a y 3 (Lingueglia, 2007).

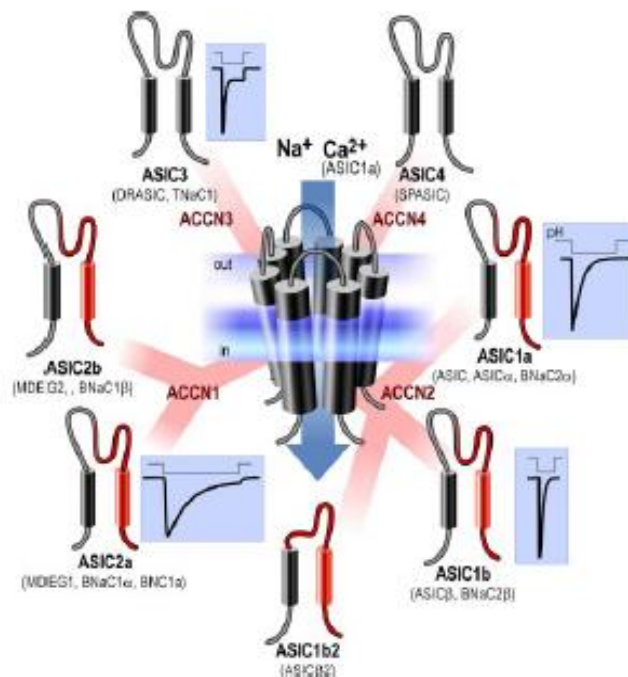


Figura 5.- La familia de canales iónicos ASIC (slicing – rojo). Tomado de Lingueglia, 2007.

Tabla 1. Propiedades de los canales ASIC (modificado de Lingueglia, 2007)

Identidad	Familia	Modos de activación	Rango
ASIC1a	DEG/ENaC	Mecánico (Tacto)	pH 6.2-6.8
ASIC1b	DEG/ENaC	Mecánico (Tacto)	pH 5.1-6.2
ASIC2a	DEG/ENaC	Mecánico (Tacto)	pH 4.1-5.0
ASIC2b	DEG/ENaC	Mecánico (Tacto)	n/a
ASIC3	DEG/ENaC	Mecánico (Tacto/nocicepción)	pH 6.2-6.7
ASIC4	DEG/ENaC		n/a

En el mecanismo de activación de los ASIC los protones extracelulares juegan un papel crucial. Los canales ASIC se abren/cierran por los protones extracelulares y son responsables por las corrientes ácidas, al menos por lo que se refiere al sistema nervioso (Gruol y Cols., 1980; Krishtal y Pidoplichko, 1981; Varming, 1999; Benson et al., 2002). En consecuencia, los ASIC *in vivo* es probable que afecte la función neuronal como respuesta al ácido extracelular. Cabe preguntarse si sucede lo mismo en las células no nerviosas, aunque los escasos datos disponibles sugieren que son capaces de abrirse en respuesta a estímulos mecánicos independientemente de la acidez del medio (Jahr y Cols., 2005; Kolker y Cols., 2010).

2.2. El ligamento periodontal

El ligamento periodontal es un tejido conectivo muy vascularizado, localizado entre las raíces de los dientes conectando las mismas al hueso alveolar; continúa con el tejido conectivo de la encía y se comunica con los espacios medulares a través de los conductos vasculares Volkmann del hueso (Carranza y Newman, 1998).

Tiene varias funciones como: la distribución y la absorción de las fuerzas masticatorias, ortodoncias, el soporte del diente por la orientación de las fibras de colágeno y la nutrición mediante el aporte sanguíneo.

A nivel de la cresta alveolar, el ligamento periodontal se continúa con el tejido gingival conectivo, mientras que a nivel apical se continúa con el tejido pulpar.

Presenta una estructura compleja que consiste, en la mayor parte, de fibras de colágeno organizadas en paquetes fibrosos y que representan el 50% del peso total del ligamento. Aparte de eso, el componente acelular presenta fibras de oxitalan y elastina, pero en menor cantidad que las de colágeno.

El componente celular del ligamento periodontal incluye fibroblastos, que representan 45% del tejido conectivo periodontal, células inflamatorias, células vasculares y nerviosas, células mesenquimales indiferenciadas y restos epiteliales de Malassez. Los osteoblastos y los cementoblastos se encuentran en la periferia del ligamento, en contacto con los tejidos duros mientras que los osteoclastos y los odontoclastos aparecen en las zonas de resorción.

El ligamento periodontal tiene escasa celularidad y su mayor volumen está constituido por fibras de colágeno de tipo III dispuestas en haces con orientaciones bien definidas.

Normalmente en el ligamento dentario se diferencian los siguientes fascículos fibrilares:

a) transeptales: atraviesan la cresta, y no se organizan completamente hasta que con el diente opuesto se halle en función (oclusión). Se encuentran en la parte mesodistal de los dientes adyacentes y están embebidas en el cemento de los dientes a cada lado;

b) de la cresta alveolar: van de la cresta alveolar al ligamento periodontal y se unen al cemento. Evitan la extrusión del diente y se oponen a los movimientos laterales.

c) horizontales: pasan del cemento al hueso alveolar y corren en ángulo recto respecto al eje mayor del diente. Se encargan de resistir las fuerzas laterales u horizontales.

d) oblicuas: son las más potentes y numerosas, y se encuentran adheridas al cemento más apicalmente que al hueso. Soportan las tensiones masticatorias verticales, impidiendo que el diente se intruya.

e) apicales: van desde cemento alrededor del ápice radicular hasta el hueso que forma la base del alveolo. Evitan los movimientos de lateralidad y extrusión, y amortigua los de intrusión.

f) interradiculares: divergen desde el cemento hacia el diente en las zonas de las furcas de los dientes multirradiculares. Evitan los movimientos de lateralidad y rotación.

g) periodontales

En el ligamento periodontal también se encuentran las denominadas fibras de oxitalán, consideradas una variante de las fibras elásticas. Se localizan en la región transeptal y se pueden insertar tanto en hueso como en cemento. La función exacta del sistema de fibras de oxitalán no ha sido aclarada aun.

En conjunto, todos esos tipos de fibras se encargan de proporcionar un revestimiento de tejido blando para proteger los vasos y nervios de lesiones por fuerzas mecánicas, transmitir las fuerzas oclusales al hueso, son responsables de la inserción del diente al hueso, conservar los tejidos gingivales en relación adecuada con los dientes y ejercer resistencia contra el impacto de las fuerzas oclusales.

2.3. Movimiento ortodóncico

El movimiento ortodóncico representa una remodelación del hueso alveolar provocada por la aplicación de una fuerza mecánica a nivel del diente. Cuando se aplica una fuerza mesial a nivel de un diente, el diente se va mover en dicha dirección. Para que esto ocurra, tiene que haber una resorción en la superficie mesial (en la zona de compresión) y aposición en la superficie distal (en la zona de tensión).

Las células periodontales comprimidas entre la raíz del diente y el hueso alveolar secretan citocinas de resorción ósea que estimulan la formación de osteoclastos y la resorción del hueso en la dirección del vector de la fuerza ortodóncica. La duración del movimiento ortodóncico tiene dos fases. Cuando se aplica una fuerza ortodóncica a nivel de un diente, ese mismo se mueve inmediatamente 0.2-0.3mm como resultado de la deformación compresiva en la membrana periodontal (Figura 6). El diente se queda detenido en esa posición durante varios días. Mientras, el tejido necrótico aparece en la membrana periodontal comprimida. Así, a nivel de la médula adyacente a la zona necrótica se inicia la resorción osteoclastica socavando la resorción ósea.

La resorción del hueso alveolar, a nivel del espacio periodontal ocurre tras la eliminación del tejido necrótico de la membrana periodontal comprimida (resorción

ósea frontal). Después del inicio de la resorción ósea frontal, el diente se mueve rápido y continuamente debido a la fuerza ortodóncica.

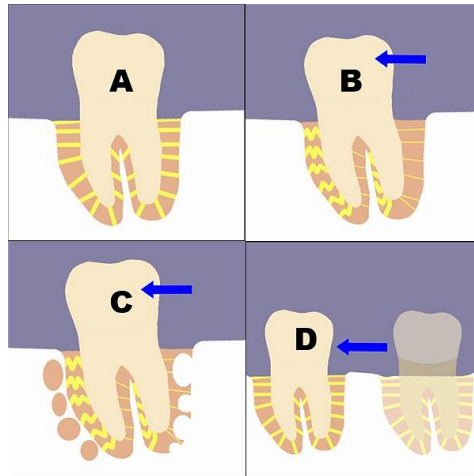


Figura 6.- Ilustración del movimiento ortodóncico. A el diente en su alveolo; B movimiento del diente tras la aplicación de una fuerza ortodóncica; C zona de resorción; D posición final del diente.

Según Melsen (1999), se existen dos tipos de movimiento dentario ortodóncico: movimiento dentario dentro del hueso y el movimiento dentario con el hueso. Las fuerzas ortodóncicas producen compresión del ligamento periodontal en el lado donde el diente se está moviendo y tensión del ligamento periodontal en el otro lado.

Si la fuerza es demasiado alta, provocará isquemia en la parte donde haya compresión y hialinización en la parte donde haya tensión. En este caso, el diente se está moviendo dentro del hueso y la resorción empieza fuera de la zona de hialinización.

Si la fuerza ortodóncica no es excesiva, no se produce hialinización en la zona de compresión del ligamento periodontal y la resorción ósea empieza dentro del espacio de dicho ligamento. En este caso, el diente se está moviendo junto con el hueso.

En ambos casos, hay aposición en el lado donde hay tensión.

2.4. Mecanotransducción

2.3.1. Mecanismo de la mecanotransducción

La mecanotransducción se encarga del estudio de la transmisión y distribución de las señales mecánicas, y su conversión en señales biológicas y químicas dentro de la célula. (Lim y Cols., 2006).

A nivel de las células mecanosensitivas, las fuerzas ortodóncicas se convierten en señal intracelular. Para que se produzca una respuesta coordinada, la información se transmite a otras células no-mecanosensitivas. Para que esto ocurra, tiene que haber:

1. Las fuerzas ortodóncicas externas, tienen que ser convertidas en señal detectable por la célula (mecanismo de transducción)
2. El ligamento periodontal y el hueso alveolar han de tener células capacitadas para detectar señales de carga mecánica y desencadenar una señal (células mecanosensitivas)
3. Las células mecanosensitivas tienen que tener un mecanismo para detectar el señal (mecanoreceptor)
4. El mecanoreceptor tiene que traducir la información en señales intracelulares.
5. Dentro de las células mecanosensitivas, las señales intracelulares llevan a la producción y a la liberación de mediadores celulares que comunican la información a otras células.

Al estimular un una célula con propiedades mecanorreceptoras los canales iónicos se abren y generan una vía de transducción que cambia el potencial de membrana la célula. Ello, junto con deformaciones de la matriz extracelular, de la membrana celular y el citoesqueleto

Cuando una fuerza ortodóncica actúa sobre un diente, tiene que ser transducida en una señal detectable por las células mecanosensitivas.

Se han propuesto tres mecanismos de transducción:

1. La carga del ligamento periodontal (PDL) y del hueso alveolar provoca deformación de la matriz. La mecanosensibilidad de las células del ligamento periodontal, de los odontoblastos y de los osteocitos está relacionada con la cantidad de la deformación o la carga.
2. Las células no se deforman mucho pero son sensibles al estrés del fluido generado por la deformación de la matriz. El hueso se describió como “una esponja mojada en agua” lo que conlleva que la fuerza compresiva que actúa en un lado dirige el fluido intersticial hacia el lado opuesto. La velocidad con la que se va moviendo es proporcional a la velocidad de la fuerza. El líquido que fluye

a través de la red de canalículos – lacunas produce estrés en la superficie de los osteocitos y de las células que cubren la superficie ósea.

3. Los potenciales de estrés generados son responsables de la carga mecánica a nivel del hueso. El fluido del hueso contiene varios iones. El movimiento de los iones provocado por las cargas mecánicas, genera un potencial. Se demostró que las células responden frente los campos eléctricos.

No se sabe si el mecanismo de transducción es principalmente causado por el flujo del líquido o por la deformación de las células debido a la fuerza ortodóncica.

3. Objetivos

El **objetivo general** del presente trabajo es contribuir al conocimiento de las bases moleculares del movimiento ortodónico.

Los **objetivos específicos** son estudiar la expresión de los canales iónicos ASIC2 en el ligamento periodontal y en el diente con el fin de contribuir al conocimiento de las bases celulares y moleculares de la mecanotransducción en estas formaciones.

4. Material y técnicas

4.1. Material

El material utilizado en el presente estudio ha sido obtenido por cortesía del Instituto Asturiano de Odontología. En él se utilizaron los animales controles y sometidos a tratamiento ortodóncico (n = 12), pero no tratados farmacológicamente, del estudio de De Carlos y Cols. (2007), siguiendo el protocolo de experimentación diseñado en un trabajo previo (De Carlos y Cols., 2006).

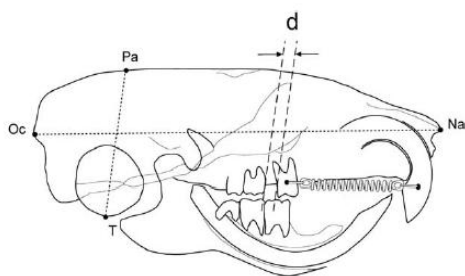


Figura 7.- Modelo de para el estudio del movimiento ortodóncico utilizado en el presente trabajo. Tomado de De Carlos y Cols. (2006)

Brevemente, se utilizaron 12 ratas macho de 3 meses de edad, de la cepa Wistar, procedentes del bioterio de la Universidad de Oviedo. Los animales fueron expuestos un ritmo de 12 horas luz/oscuridad, y alimentados *ad libitum*. A los animales se le aplicó una fuerza de 50 g generada por un resorte extendido entre el primer molar superior izquierdo y el incisivo homolateral; estas condiciones experimentales fueron mantenidas durante 10 días. Los animales fueron sacrificados por inhalación de CO₂ seguida de decapitación. Las cabezas fueron metidas en formaldehído al 10% y conservadas hasta el momento de su utilización.

En el momento de uso, las cabezas los animales se libraron de las partes blandas y se lavaron en agua corriente durante 24 horas. A continuación se separó el segmento del cráneo que contiene los maxilares superiores y se metieron en una solución que contiene formaldehído al 10%, ácido nítrico de 15,4 M y agua destilada (10:5:85 v/v) hasta la descalcificación completa de las piezas (2 a 5 días). Posteriormente las piezas fueron lavados con agua de grifo durante 12 h y procesados para la inclusión rutinaria en parafina. Finalmente las piezas se cortaron a un grosor de 10 µm, perpendiculares al

eje vertical de los dientes y las secciones fueron montadas en portaobjetos gelatinizados. Las raíces del primero molar superior izquierdo fueron consideradas como experimentales y las del lado derecho controles.

4.2. Técnicas: inmunohistoquímica

Las secciones histológicas controles y experimentales fueron procesadas al mismo tiempo para la detección inmunohistoquímica de TRPV4, y de cada animal se procesaron 5 secciones separadas 50 µm entre ellas. Además se investigó en las mismas secciones la presencia de proteína S100 y PGP 9,5 que marcan las células de Schwann de los nervios y receptores periféricos, y los axones y los odontoblastos, respectivamente. Para la realización de la técnica de la peroxidasa-antiperoxidasa indirecta, utilizando anticuerpos primarios específicos y el kit de detección EnVision (Dako, Copenhague, Dinamarca), las secciones fueron rehidratadas y desparafinadas. Las características de los anticuerpos primarios utilizados se recogen en la tabla 1.

Tras la rehidratación las secciones fueron incubadas con la solución Envision FLEX, a pH alto (Dako) y 65° C durante 20 minutos y, a continuación, durante 20 minutos a temperatura ambiente en la misma solución. Posteriormente, las secciones fueron incubadas con los anticuerpos primarios durante la toda la noche a 4° C en cámara húmeda. Tras la incubación con los anticuerpos primarios, las secciones se lavaron en PBS-T durante 20 minutos y a continuación se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente, con el anticuerpo secundario (Dako EnVision® labelled polymer-HR anti-conejo IgG o de IgG anti-ratón, según procediese). Finalmente, tras un lavado en PBS-T se reveló la inmunorreacción con una solución de 3-3' diaminobencidina (DAB, kit de revelado de Dako). Las secciones se lavaron en agua, se deshidrataron en una batería de alcoholes etílicos en concentraciones crecientes, se diafanizaron en xilol y se montaron con Entellan®. Las preparaciones se fotografiaron en un microscopio óptico Nikon Eclipse 80i acoplado a una cámara Nokia DS-5M.

Tabla 1.- Anticuerpos primarios utilizados en el estudio

Antígeno	Origen	Dilución	Distribuidor
PGP 9.5	Conejo	1:1000	Biogenesis ¹
Protein S100	Conejo	1:1000	Dako ²
ASIC2*	Conejo	1:200	Lifespan Biosciences ³

ASIC2: anticuerpo policlonal de conejo que se une al dominio extracelular de ASIC2 de conejo (catálogo LS-C93915).

PGP 9.5: Protein gene product 9.5

¹Poole, England, UK

²Copenhage, Dinamarca

³Seattle, WA, USA

Los controles de la especificidad de la inmunorreacción se realizaron por exclusión del anticuerpo primario o por incubación con suero de conejo no inmune en lugar del anticuerpo primario. En estas condiciones no se observó en ningún caso inmunomarcaje específico.

Para asegurar detalles estructurales las secciones se contrastaron con hematoxilina de Harris y en algunas secciones se realizó un azul de toluidina rutinario.

5. Resultados

5.1. Identificación del ligamento periodontal

El ligamento periodontal es fácilmente identificable en las secciones perpendiculares al eje mayor del diente. A nivel de las raíces esta formación se dispone como un círculo de fibras dispuesto entre el hueso alveolar y el cemento (Figura 5). En el tipo de secciones analizadas no se pueden distinguir los diferentes subtipos de fibras que lo forman, por lo que la descripción de los resultados se realizará con carácter global.

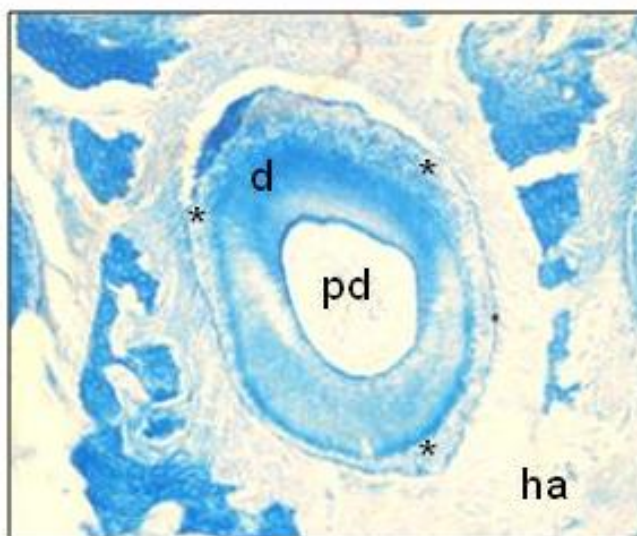


Figura 5.- Raíz del primer molar superior derecho de la rata, rodeada por el ligamento periodontal y el hueso alveolar. d: dentina, ha: hueso alveolar, pd: pulpa dentaria; los asteriscos indican el ligamento periodontal. Tinción de azul de metileno. Magnificación original x10.

El ligamento periodontal está ricamente innervado por fibras procedentes del nervio trigémino y en él se localizan diferentes tipos de fibras nerviosas y de mecanorreceptores. Con el fin de estudiar la distribución de los nervios en el ligamento periodontal se ha estudiado la distribución de la inmunorreacción para la proteína PGP 9.5 (un marcador pan neuronal) y de la proteína S100 (un marcador de las células de Schwann de los nervios periféricos y de las células Schwann-like de los mecanorreceptores del ligamento).

Los perfiles nerviosos en el ligamento periodontal fueron escasos y en ningún caso se han observado arborizaciones axónicas compatibles con corpúsculos de Ruffini o equivalentes. Por otro lado, y como era de esperar, se observó inmunorreacción para

PGP 9.5 en la pulpa dentaria y en los odontoblastos y sus procesos (Figura 6). Además, en algunas zonas del ligamento periodontal, sin ninguna localización preferente, se observan perfiles nerviosos positivos para la proteína S100 pero que en ningún caso se organizan como receptores (Figura 6, imagen derecha).

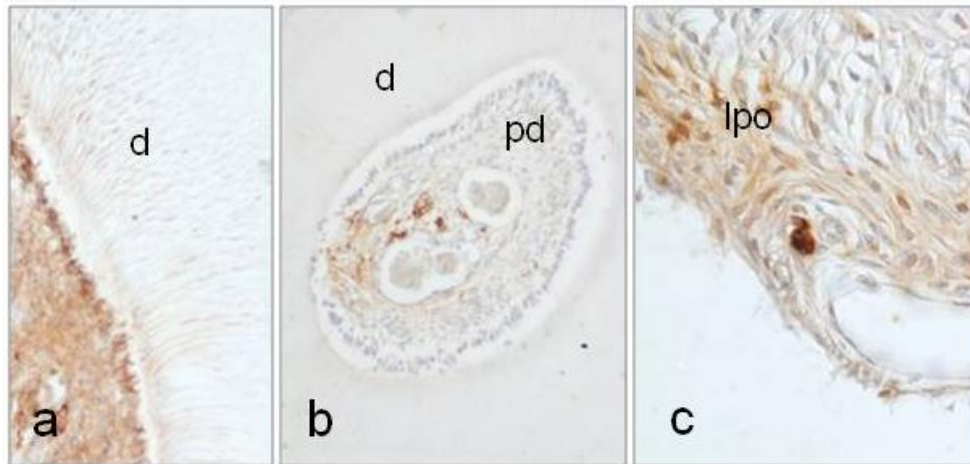


Figura 6.- Localización inmunohistoquímica de la proteína PGP 9,5 (a,b) y de la proteína S100 en odontoblastos, fibras nerviosas pulpares y ligamento periodontal. d: dentina, ha: hueso alveolar, pd: pulpa dentaria; los asteriscos indican el ligamento periodontal. Magnificación original x10 (b) y x40 (a y c).

5.2. Localización de los canales ASIC2 en el ligamento periodontal

La inmunorreacción para el canal iónico ASIC2 en los dientes controles tiene un patrón de localización que es compatible con su presencia a nivel del ligamento periodontal. Aparece como un círculo de color marrón, más o menos intenso, rodeando la totalidad de la raíz de los dientes (Figura 7, imágenes superiores). En algunas zonas, la intensidad de la inmunorreacción es idéntica en todas las fibras, mientras que en otras tiene mayor intensidad en la zona de inserción del ligamento en el cemento (imágenes inferiores).

Con carácter general, el resto de los tejidos del diente y el hueso alveolar son ASIC2 negativos, aunque ocasionalmente se ha observado inmunorreacción difusa para ASIC2 en la pulpa dentaria de algunos dientes. No obstante, en los dientes controles el patrón de distribución pulpar de ASIC2 no es compatible con el marcaje de elementos nerviosos de la pulpa, ni con inmunomarcaje de odontoblastos o sus procesos, si bien en algunos casos la inmunorreacción parece concentrarse en la unión pulpa-dentina.

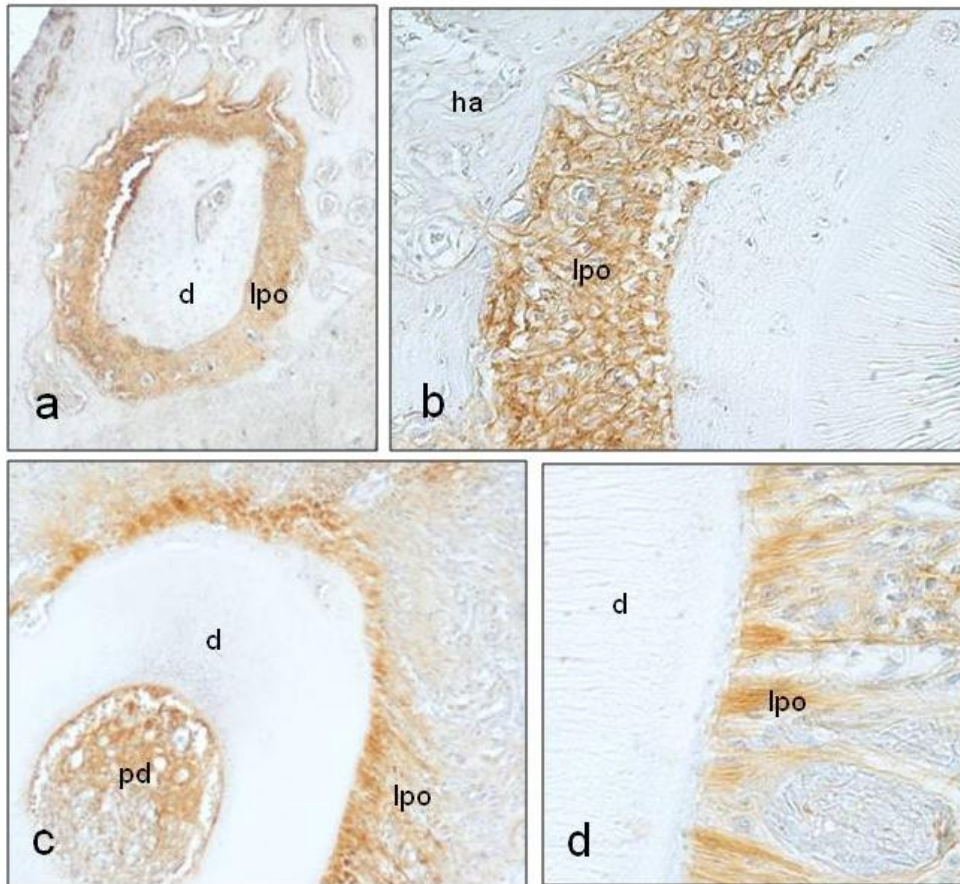


Figura 7.- Localización inmunohistoquímica de la proteína ASIC2 en secciones de raíz dentaria, ligamento periodontal y hueso alveolar. d: dentina, ha: hueso alveolar, pd: pulpa dentaria. Magnificación original x10 (a), x20 (c) y x40 (b y d).

5.4. Relación de los canales ASIC2 con el ligamento periodontal / movimiento ortodóncico

La aplicación de la fuerza ortodóncica al primer molar superior de ratas, cambia por completo el patrón de distribución normal de ASIC2 e induce su aparición en tejidos que habitualmente no presentan inmunorreacción sugiriendo que esta proteína es regulable por factores mecánicos.

En primer lugar, se produce un marcado aumento de la inmunorreacción para ASIC2 en las zonas del ligamento periodontal sometidas a tensión, mientras que en las zonas opuestas desaparece casi por completo (Figuras 8 y 9). En esta situación la intensidad de marcaje es mayor en la zona de inserción en el cemento que en la zona de inserción en el hueso.

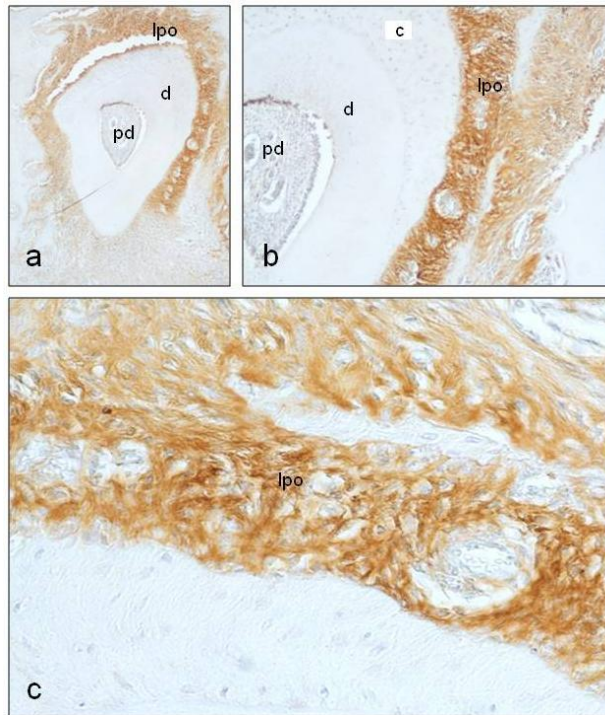


Figura 8.- Localización inmunohistoquímica de la proteína ASIC2 en secciones de raíz dentaria, ligamento periodontal y hueso alveolar de dientes sometidos a movimiento ortodóncico experimental. c: cemento; d: dentina, pd: pulpa dentaria. Magnificación original x10 (a), x20 (b) y x40 (c).

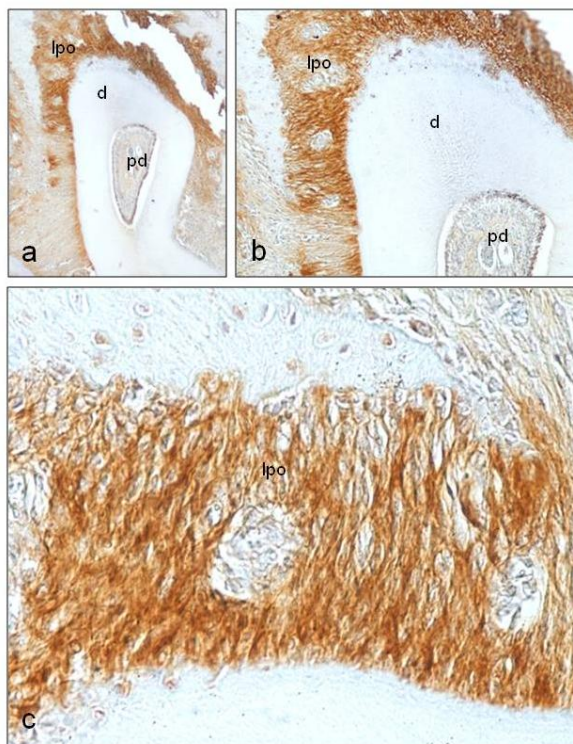


Figura 9.- Localización inmunohistoquímica de la proteína ASIC2 en secciones de raíz dentaria, ligamento periodontal y hueso alveolar de dientes sometidos a movimiento ortodóncico experimental. d: dentina, ha: hueso alveolar, pd: pulpa dentaria. Magnificación original x10 (a), x20 (b) y x40 (c).

En segundo lugar, en los dientes sometidos a la tracción se produce expresión de ASIC2 en el hueso neoformado (Figura 7 y figura 8). No obstante, es imposible identificar el tipo o los tipos de células que expresan ASIC2.

Otro aspecto a destacar en los dientes experimentales es que el patrón de distribución del ASIC2 dentro de la pulpa dentaria es compatible con su presencia en fibras nerviosas (figuras 10b y 11b), aunque sería necesario estudios de co-localización con marcadores neuronales para poder conformarlo.

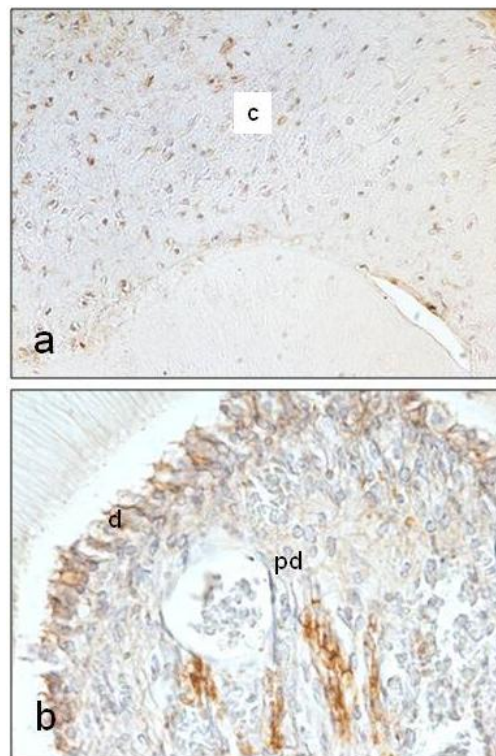


Figura 10.- Localización inmunohistoquímica de la proteína ASIC2 en secciones de raíz dentaria, ligamento periodontal y hueso alveolar de dientes sometidos a movimiento ortodóncico experimental. c: cemento, d: dentina, pd: pulpa dentaria. Magnificación original x40.

En los dientes experimentales también se produce expresión de ASIC2 en los odontoblastos, siendo mayor la intensidad de la inmunorreacción en la zona del diente sometida a tensión (Figuras 10 y 11). Ocasionalmente se ha observado expresión difusa de ASIC2 en las células pulpares, sin poder atribuirles una filiación concreta (Figura 11a).

Finalmente, un fenómeno que se ha observado con regularidad en los dientes experimentales ha sido la presencia de islotes celulares arreactivos para aASIC2 entre

las fibras del ligameto periodontal intensamente positivas (Figuras 8 y 9). Posiblemente se trate de tejido óseo pero debe conformarse en posteriores trabajos.

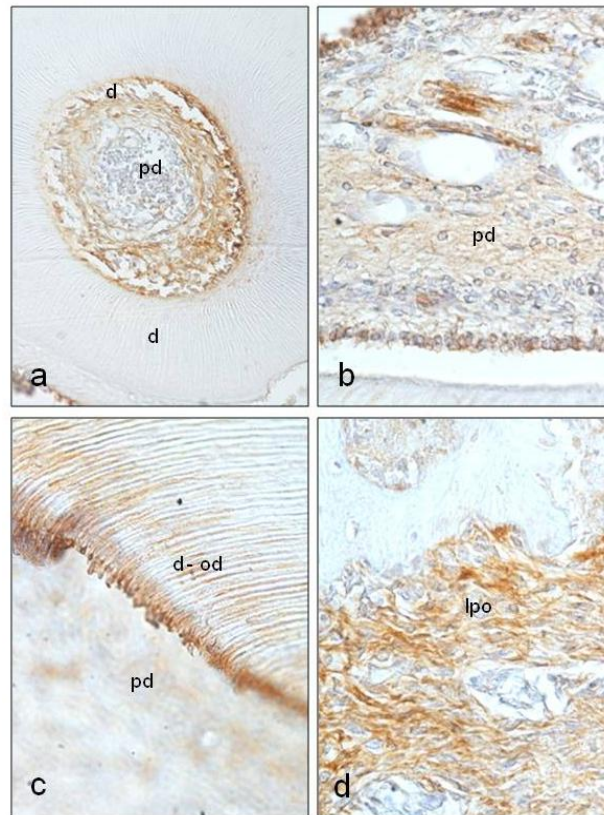


Figura 11.- Localización inmunohistoquímica de la proteína ASIC2 en secciones de raíz dentaria, ligamento periodontal y hueso alveolar de dientes sometidos a movimiento ortodóncico experimental. d: dentina, ha: hueso alveolar, pd: pulpa dentaria. Magnificación original x10 (a), x40 (b,c,d).

6. Discusión

La biología celular y molecular de los procesos relacionados con la mecanorrecepción ha comenzado a conocerse en los últimos años y en las células no nerviosas es un proceso casi desconocido por completo. En principio todas las células del cuerpo son capaces de responder a estímulos mecánicos pero algunas de ellas, por su localización anatómica o disposición dentro de un determinado tejido deben de cumplir una serie de condiciones mecánicas especiales. Este es el caso del ligamento periodontal y, según algunos autores (Magloite et al., 2009), de los odontoblastos.

En todos los procesos de sensibilidad, en sentido amplio, de las células se encuentran canales iónicos de diferentes tipos. En principio, las células mecanorreceptoras expresan canales iónicos capaces de abrirse ante deformaciones de la membrana celular, con independencia de que además intervengan proteínas de la matriz extracelular y el citoesqueleto (ver para revisión Valle et al., 2012). Entre las diferentes familias de canales iónicos posiblemente relacionados con la mecanorrecepción se encuentra la de canales ASIC, especialmente el ASIC2.

El presente estudio se diseñó con el fin de estudiar si el ligamento periodontal de la rata expresa ASIC2 bien en los fibroblastos que lo constituyen o en las formaciones nerviosas que habitualmente se describen en esta localización. Hasta la fecha no existe ningún estudio al respecto por lo que la discusión debe de realizarse de forma general. Por otro lado, no existen referencias sobre la expresión de este canal en los ligamentos de otras localizaciones salvo en el ligamento vertebral común posterior. Recientemente, nuestro laboratorio lo ha demostrado también en los fibroblastos-like y condrocitos-like del disco intervertebral (Vega, comunicación personal).

En condiciones de normalidad, en la rata, el ligamento periodontal expresa inmunoreacción para ASIC2 en todas las fibras que lo forman, sin variaciones regionales. Es la primera vez que se demuestra este hecho por métodos experimentales. Posiblemente, la expresión basal de ASIC2 esté en relación con los requerimientos mecánicos básicos de los fibroblastos que lo forman. Sin embargo, no hemos detectado de manera regular ASIC2 en los somas de los odontoblastos o sus procesos, tal y como se ha descrito recientemente en los dientes humanos (Solé-Magdalena et al., 2011). Es

posible que existan diferencias especie-específicas en la expresión de los canales iónicos en los odontoblastos de diferentes especies, debido a los diferentes requerimientos mecánicos de estas células. Hay que destacar, igualmente, que en ningún caso se han observado perfiles nerviosos inmunorreactivos para ASIC2. El ligamento periodontal posee abundantes mecanorreceptores de tipo Riffini, aunque no hemos logrado ponerlos en evidencia en este trabajo. Este tipo de receptores expresa ASIC3 (Rahman et al., 2011) y se ha demostrado también que otros tipos de mecanorreceptores expresan ASIC2 (Valle et al., 2012; Cabo et al., 2012). Son necesarios por tanto ulteriores estudios para confirmar la presencia de mecanorreceptores en el ligamento periodontal de rata y si expresan proteínas ASIC u otro tipo de mecanoproteína.

En los dientes experimentales, la expresión de ASIC2 en el ligamento periodontal y en el interior del diente, sufre cambios muy importantes. En primer lugar hay un cambio en la distribución de la inmunorreacción para ASIC2: en las zonas del ligamento periodontal sometidas a tensión hay un aumento muy notable de la expresión, mientras que en las zonas opuestas, sometidas a presión, la inmunorreacción desaparece. Este resultado es de gran interés porque sugiere que no todas las acciones mecánicas son capaces de potenciar la expresión de ASIC2 si no exclusivamente las que producen distensión. Por otro lado, se ha observado que en los dientes experimentales hay un aumento del ASIC2 en los odontoblastos, especialmente en los situados en la parte del diente sometida a tensión. Se desconocen los mecanismos biológicos responsables de estos hechos, pero sin duda abren una nueva línea de investigación para entender los movimientos ortodóncicos de una manera global en la que intervienen tanto las células del ligamento periodontal como las del propio diente. Además, la presencia de canales iónicos de tipo ASIC en los odontoblastos hace pensar que estas células tienen más acciones que las propias de secreción y producción de la dentina y que son como proponen Magloire et al. (2009) y Solé-Magdalena et al. (2011) auténticos transductores, posiblemente mecánicos.

Con independencia del posible papel del ASIC2 en la mecanorrecepción por parte de las células del ligamento periodontal y de los odontoblastos, se considera que este canal iónico participa también en la detección de niveles elevados de protones extracelulares y regulación del pH intracelular (Holzer, 2009). Los movimientos ortodóncicos llevan

asociados procesos inflamatorios e isquémicos (ver de Carlos et al., 2006, 2007) que inducen acidosis local y por tanto no es de descartar que ello sea el condicionante, al menos en parte, del aumento de la expresión de ASIC2 en los dientes experimentales. Este aspecto de los canales ASIC es muy interesante en el contexto de la presente investigación y abre posibles fuentes de actuación farmacológica para controlar la acidosis-inflamación que se produce en los tratamientos de ortodoncia ya que la acidosis tisular es uno de los causantes del dolor por inflamación (ver Deval et al., 2010).

El tercer hecho diferencial en los dientes experimentales ha sido la detección de ASIC2 en el cemento de la zona del diente sometida a tensión. No existen datos relativos a este hecho pero si se ha demostrado la presencia de canales ASIC en el tejido óseo y cartilaginoso (Jahr et al., 2005). Este aspecto es de suma importancia porque sugiere que los canales ASIC pueden ser señalizadores en el proceso de osteogénesis.

En conjunto los resultados del presente trabajo aportan nuevos datos sobre la biología de los movimientos ortodóncicos y abren nuevas posibilidades de investigación en el campo de la mecanobiología.

7. Conclusiones

Los resultados del presente estudio experimental permiten llegar a la siguientes conclusiones:

- 1.- El ligamento periodontal de rata expresa el canal iónico ASIC2, sin aparente diferencias topográficas ni regionales.
- 2.- En condiciones de normalidad los odontoblastos de la rata no tienen inmunorreacción para ASIC2.
- 3.- La inducción de un movimiento dentario ortodóncico experimental produce un aumento de la inmunorreacción para ASIC2 en el ligamento periodontal en la parte del mismo sometida a tensión y desaparición de la inmunorreacción en la parte opuesta.
- 4.- La inducción de un movimiento dentario ortodóncico experimental conlleva expresión de ASIC2 en los somas de los odontoblastos y sus procesos, y en las células del cemento del lado del diente sometido a tensión.

8. Bibliografía

- Bhalla V, Hallows KR. 2008. Mechanisms of ENaC regulation and clinical implications. *J Am Soc Nephrol* 19: 1845-1854.
- Bandell M, Macpherson LJ, Patapoutian A. 2007. From chills to chilis: mechanisms for thermosensation and chemesthesis via thermoTRPs. *Curr Opin Neurobiol* 17: 490-497.
- Belmonte C, Viana F. 2008. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 4, 14 doi: 10.1186/1744-8069-4-14.
- Benson CJ, Xie J, Wemmie JA, Price MP, Henss JM, Welsh MJ, Snyder PM. 2002. Heteromultimerics of DEG/ENaC subunits form H⁺-gated channels in mouse sensory neurons. *Proc. Natl. Acad.Sci. U. S. A.* 99, 2338–2343.
- Cabo R, Galvez MA, San Jose I, Laura R, Lopez-Muñiz A, García-Suarez O, Cobo, T, Insausti R, Vega JA. 2012. Immunohistochemical localization of acid-sensing ion channel 2 (ASIC2) in cutaneous Meissner and Pacinian corpuscles of *Macaca fascicularis*. *Neurosci Lett* 516: 197-201.
- Calavia MG, Montañó JA, García-Suárez O, Feito J, Guervós MA, Germanà A, Del Valle M, Pérez-Piñera P, Cobo J, Vega JA. 2010. Differential localization of Acid-sensing ion channels 1 and 2 in human cutaneous pacinian corpuscles. *Cell Mol Neurobiol* 30: 841-848.
- Carranza F, Newman M. 1998. *Periodontología clínica* Ed. McGraw-Hill Interamericana 8^a ed, pp. 33-39.
- Champigny G, Voilley N, Waldmann R, Lazdunski M. 1998. Mutations causing neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans* drastically alter the pH sensitivity and inactivation of the mammalian H⁺-gated Na⁺ channel MDEG1. *J Biol Chem* 273: 15418-15422.
- Coscoy S., de Weille J.R., Lingueña E., Lazdunski M. 1999. The pre-transmembrane 1 domain of acid-sensing ion channels participates in the ion pore. *J. Biol. Chem.* 274, 10129-10132.

- de Carlos F, Cobo J, Díaz-Esnal B, Arguelles J, Vijande M, Costales M. 2006. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 129: 402-406.
- de Carlos F, Cobo J, Perillan C, Garcia MA, Arguelles J, Vijande M, Costales M. 2007. Orthodontic tooth movement after different coxib therapies. *Eur J Orthod* 29:596-299.
- Deval E, Gasull X, Noël J, Salinas M, Baron A, Diochot S, Lingueglia E. 2010. Acid-sensing ion channels (ASICs): pharmacology and implication in pain. *Pharmacol Ther* 128: 549-558.
- Ettaiche M, Deval E, Cougnon M, Lazdunski M, Voilley N. 2006. Silencing acid-sensing ion channel 1a alters cone-mediated retinal function. *J Neurosci* 26: 5800-5809.
- Ettaiche M, Guy N, Hofman P, Lazdunski M, Waldmann R. 2004. Acid-sensing ion channel 2 is important for retinal function and protects against light-induced retinal degeneration. *J Neurosci* 24:1005-1012.
- Gruol DL, Barker JL, Huang LY, MacDonald JF, Smith TG Jr. 1980. Hydrogen ions have multiple effects on the excitability of cultured mammalian neurons. *Brain Res* 183, 247–252.
- Holzer P. 2009. Acid-sensing ion channels and receptors. *Handb Exp Pharmacol* 194: 283-332.
- Holzer P. 2010. Acid sensing by visceral afferent neurones. *Acta Physiol (Oxf)* Accepted article doi: 10.1111/j.1748-1716.2010.02143.x
- Ichikawa H, Sugimoto T. 2002. The co-expression of ASIC3 with calcitonin gene-related peptide and parvalbumin in the rat trigeminal ganglion. *Brain Res* 943: 287-291.
- Jahr H, van Driel M, van Osch GJ, Weinans H, van Leeuwen JP. 2005. Identification of acid-sensing ion channels in bone. *Biochem Biophys Res Commun*

- Kellenberger S, Schild L. 2002. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* 82: 735-767.
- Kolker SJ, Walder RY, Usachev Y, Hillman J, Boyle DL, Firestein GS, Sluka KA. 2010. Acid-sensing ion channel 3 expressed in type B synoviocytes and chondrocytes modulates hyaluronan expression and release. *Ann Rheum Dis* 69:903
- Krishtal OA, Pidoplichko VI. 1981. A receptor for protons in the membrane of sensory neurons may participate in nociception. *Neuroscience* 6: 2599–2601.
- Krishtal, O. 2003. The ASICs: Signaling molecules? Modulators? *Trends Neurosci* 26: 477-483.
- Lim CT, Zhou EH, Quek ST. 2006. Mechanical models for living cells. A review. *J Biomech* 39:195-216.
- Lingueglia E. 2007. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem*. 282: 17325-17329.
- Lumpkin EA, Marshall KL, Nelson AM. 2010. The cell biology of touch. *J Cell Biol* 191: 237-248.
- Magloire H, Couble ML, Thivichon-Prince B, Maurin JC, Bleicher F. 2009. Odontoblast: a mechano-sensory cell. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* 312B: 416-424
- Melsen. B. 1999. Biologicas reaction of alveolar bone to orthodontic tooth movement, *Angle Orthod* 69:151-158.
- Montaño JA, Calavia MG, García-Suárez O, Suarez-Quintanilla JA, Gálvez A, Pérez-Piñera P, Cobo J, Vega JA. 2009. The expression of ENa(+)-C and ASIC2 proteins in Pacinian corpuscles is differently regulated by TrkB and its ligands BDNF and NT-4. *Neurosci Lett* 463: 114-118.
- Montell C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 22;2005(272):re3.
- Rahman F, Harada F, Saito I, Suzuki A, Kawano Y, Izumi K, Nozawa-Inoue K, Maeda T. 2011. Detection of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in periodontal Ruffini endings of mouse incisors. *Neurosci Lett* 488:173-177

- Sackin H. 1995. Stretch-activated ion channels, *Kidney Int* 48:1134-1147.
- Shimada S, Ueda T, Ishida Y, Yamamoto T, Ugawa S. 2006. Acid-sensing ion channels in taste buds. *Arch Histol Cytol* 69: 227-231.
- Solé-Magdalena A, Revuelta EG, Menéndez-Díaz I, Calavia MG, Cobo T, García-Suárez O, Pérez-Piñera P, De Carlos F, Cobo J, Vega JA. 2011. Human odontoblasts express transient receptor protein and acid-sensing ion channel mechanosensor proteins. *Microsc Res Tech* 74: 457-463.
- Uchiyama Y, Cheng CC, Danielson KG, Mochida J, Albert TJ, Shapiro IM, Risbud MV. 2007. SMAD3 functions as a transcriptional repressor of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc. *J Bone Miner Res* 22: 1996-2006.
- Uchiyama Y, Guttapalli A, Gajghate S, Mochida J, Shapiro IM, Risbud MV. 2008. Expression of acid-sensing ion channel 3 (ASIC3) in nucleus pulposus cells of the intervertebral disc is regulated by p75NTR and ERK signaling. *J Bone Miner Res* 23: 1619-1628.
- Valle ME, Cobo T, Cobo JL, Vega JA. 2012. Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins. *Microsc Res Tech* doi: 10.1002/jemt.22028.
- Varming, T. (1999) Proton-gated ion channels in cultured mouse cortical neurons. *Neuropharmacology* 38, 1875–1881.
- Wemmie JA, Price MP, Welsh MJ. 2006. Acid-sensing ion channels: advances, questions and therapeutic opportunities. *Trends Neurosci* 29: 578-586.

Origen de la figuras no originales y tablas del trabajo

Figura 1: Lumpkin EA, Marshall KL, Nelson AM. 2010. The cell biology of touch. *J Cell Biol* 191: 237-248.

Figura 2: Valle ME, Cobo T, Cobo JL, Vega JA. 2012. Mechanosensory neurons, cutaneous mechanoreceptors, and putative mechanoproteins. Wiley Periodicals, Inc. doi: 10.1002/jemt.22028.

Figura 3: Bhalla V., Hallows K.R. 2008. Mechanisms of ENaC Regulation and Clinical Implications. *J Am Soc Nephrol* 19: 1845–1854, 2008. doi: 10.1681/ASN.2008020225.

Figura 4: Krishtal, O. The ASICs: Signaling molecules? Modulators? *Trends in Neurosciences*; 2003 Sep;26(9):477-83

Figura 4: Lingueglia E. 2007. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem*. 282: 17325-17329.

Figura 5: tomada de <http://www.dentalorg.com/biology-of-tooth-movement.html>

Figura 6: de Carlos F., Cobo J., Díaz-Esnal B., Arguelles J., Vijande M., Costales M. 2006. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 2006;129:402-6.

Tabla 1: Lingueglia E. 2007. Acid-sensing ion channels in sensory perception. *J Biol Chem*. 282: 17325-17329.