



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN ORTODONCIA Y ORTOPEDIA FACIAL

**MECANOPROTEINAS TRP (TRANSIENT-RECEPTOR POTENCIAL)**

**Y MOVIMIENTO DENTARIO**

**Laura Broseta Collado**

**Trabajo Fin de Master  
Mayo de 2012**



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

MASTER UNIVERSITARIO EN ORTODONCIA Y ORTOPEDIA FACIAL

**MECANOPROTEINAS TRP (TRANSIENT-RECEPTOR POTENCIAL)**

**Y MOVIMIENTO DENTARIO**

**Laura Broseta Collado**

Tutor. José Antonio Vega Alvarez

## **INDICE**

<b>1. INTRODUCCION</b>	<b>5</b>
<b>2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA</b>	
<b>2.1 CANALES IONICOS: MECANOPROTEINAS</b>	<b>7</b>
<b>2.1.1 Introducción</b>	
<b>2.1.2 Canales TRP</b>	
<b>2.2 LIGAMENTO PERIODONTAL</b>	<b>10</b>
<b>2.2.1 Anatomía</b>	
<b>2.2.2 TRP en ligamento periodontal</b>	
<b>2.3 MOVIMIENTO ORTODONCICO</b>	<b>13</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>4. MATERIAL Y TECNICAS</b>	<b>18</b>
<b>4.1 MATERIAL</b>	
<b>4.2 TECNICAS: INMUNOHISTOQUIMICA</b>	
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>21</b>
<b>6. DISCUSION</b>	<b>26</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b>	<b>29</b>
<b>8. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>30</b>

**RESUMEN.-** Algunos miembros de la familia de los canales iónicos TRP (transient receptor potential) funcionan como proteínas en una amplia variedad de tejidos y células. En el presente estudio se han utilizado técnicas de inmunohistoquímica para analizar la presencia de la mecanoproteína TRPV4 en el ligamento periodontal del primer molar superior de la rata en condiciones de normalidad y sometido a tracción ortodóncica (50 g) durante 10 días. En el diente control la inmunorreacción para TRPV4 es escasa o ausente en el ligamento periodontal mientras que es moderada en los odontoblastos y sus procesos. Tras someter el diente a tracción hay un aumento generalizado en la expresión de TRPV4 por parte del ligamento y de los somas de los odontoblastos del lado del diente sometido a tracción, mientras que desaparece en los procesos. En conjunto estos resultados sugieren que TRPV4 participa en la mecanotransducción más en el interior del diente que fuera del mismo, y que su expresión es regulada por factores mecánicos.

**Palabras clave:** TRPV4, ligamento periodontal, odontoblastos, movimiento ortodóncico, rata

**SUMMARY.-** Some members of the TRP (transient receiving potential) family of ion channels are regarded to work as proteins in a wide variety of tissues and cells. In the present study we used immunohistochemistry to analyze the occurrence of the putative mechanoproteins TRPV4 in the periodontal ligament of the upper first molar superior of the rat in normal conditions an after orthodontic traction (50 g) during 10 days. In the control tooth the immunoreactivity for TRPV4 was faint or absent in the periodontal ligament whereas it was moderate in the odontoblasts and their processes. After tooth traction there was a whole increase in the expression of TRPV4 by the periodontal ligament and the somas of the odontoblasts of the side of the tooth submitted to tension, whereas it disappears in their processes. Altogether these results suggest that TRPV4 participates more in the mecanotransduction inside the tooth than outside he himself, and that its expression is regulated by mechanical factors.

**Keywords:** TRPV4, periodontal ligament, odontoblasts, orthodontic movement, rat

## 1. INTRODUCCIÓN

Durante los últimos 10 años una serie de trabajos han demostrado que en la base se los procesos mecánicos, tanto en las células nerviosas como no nerviosas se encuentra la activación de una serie de canales iónicos, especialmente miembros pertenecientes a tres superfamilias: TRP (transient-receptor potential), DEG/ENaC (denererinas/canales de  $\text{Na}^+$  epiteliales) y de doble poro de  $\text{K}^+$ . Nuestro trabajo se centra en el estudio de uno de los miembros de la superfamilia TRP, familia vanilloide, el TRPV4 que ha sido puesto en relación con la mecanorrecepción tanto en los vertebrados como en los invertebrados.

Aunque se conocía desde hace décadas que las fuerzas son capaces de modificar la biología celular alterando su crecimiento, proliferación o muerte, solo en la actualidad ha comenzado a entenderse cuáles son las bases moleculares de esos efectos, dando origen a una nueva rama de la biología: la mecanobiología. Esta debe de entenderse como la ciencia que estudia los efectos sobre la célula (variaciones en la síntesis de una proteína, cambios en la expresión génica) de las fuerzas. También es evidente que salvo en algunas células sensoriales, las fuerzas o las acciones mecánicas, no se pueden ejercer directamente sobre las células, si no a través de las estructuras celulares que hay en el exterior de la célula, es decir, la matriz extracelular. Y la mayoría de los autores también están de acuerdo de que en el interior de las células las acciones mecánicas señalizan a través de proteínas situadas dentro de los citoplasmas y que forman el citoesqueleto. En la reciente revisión realizada por Del Valle y Cols. (2012), se apuntan las posibilidades de interrelación de los canales de la membrana celular, matriz extracelular y citoesqueleto.

Debe de quedar claro desde el principio que la capacidad que tienen las células de transformar una fuerza o acción mecánica en un efecto biológico es casi universal, es decir, cualquier célula sufre cambios ante una fuerza. Este hecho es en sentido estricto una mecanotransducción, aunque este término se utilice casi exclusivamente en neurobiología.

Al plantear este trabajo de investigación se parte de la hipótesis de que el ligamento periodontal y el diente están sometidos a diferentes tipos de fuerzas, que varían en intensidad de acuerdo con la situación funcional. Pero además, en los tratamientos de ortodoncia se ejercen fuerzas para modificar la posición de los dientes. En este estudio

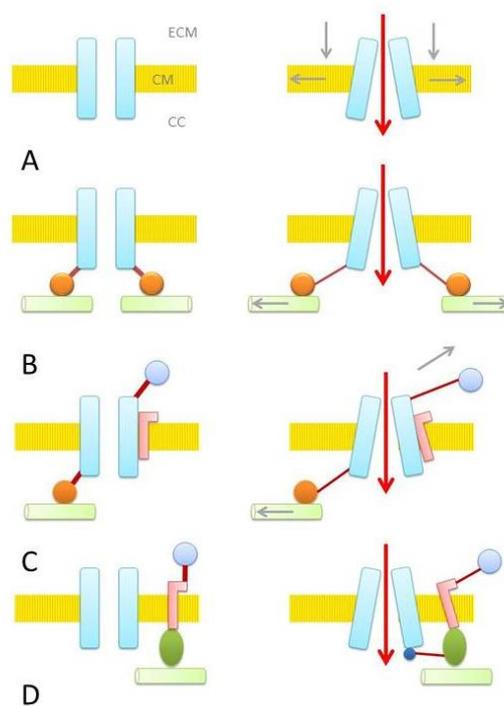
se plantea la siguiente cuestión ¿cambia la expresión de las mecanoproteínas de la familia TRP en el ligamento periodontal y en el propio diente al someterlo a la acción de una fuerza? Los datos de partida son muy escasos. Por un lado, se conoce que los odontoblastos humanos expresan canales iónicos de la familia TRP (transient-receptor potential; Solé-Magdalena y Cols., 2011) pero no existen, hasta donde nosotros conocemos, datos sobre la presencia de canales TRP en las células del ligamento periodontal. Este aspecto puede ser de mucho interés porque podrían plantearse tratamientos farmacológicos moduladores de la actividad de TRPV4 que faciliten o inhiban el movimiento dentario. Además, existen datos que sugieren que los factores mecánicos regulan el potencial regenerativo de las células troncales del ligamento periodontal por medio de canales iónicos (Galler y D'Souza, 2011), por lo que modulando esos canales se podría modificar el proceso regenerativo del ligamento.

## 2. ESTADO ACTUAL DEL PROBLEMA

### 2.1. CANALES IONICOS Y MECANOPROTEINAS

#### 2.1.1. Introducción

Los canales iónicos son proteínas que controlan el paso de iones, y por tanto el gradiente electroquímico, a través de la membrana de toda célula viva. Estos canales actúan como “compuertas” que se abren o se cierran en función de los estímulos externos, aunque algunas sustancias tóxicas pueden desactivar su función natural. Los canales iónicos son esenciales para el proceso de transducción que convierte energía mecánica en cambios en el potencial de membrana (Valle y Cols., 2012) M.E del Valle, T. Cobo, J.L. Cobo, J.A. Vega 2012) en las células especializadas dando origen a la mecanotransducción y mecanosensación. En las células no especializadas, como es el caso de los fibroblastos que forman el ligamento periodontal, los canales iónicos parecen activarse por una deformación localizada de la membrana celular que cómo ya se expuso en el apartado anterior, casi siempre implica al citoesqueleto y a la matriz extracelular (Patel et al, 2001; Sachs, 2010; Yin y Kuebler, 2010) y cuyos mecanismos se resumen en la siguiente imagen (tomada de Valle y Cols., 2012).



**Figura 1.-** 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.

Las posibles mecanoproteínas identificadas hasta el momento, son proteínas transmembrana que actúan como canales iónicos convirtiendo los estímulos mecánicos en señales eléctricas o químicas. Diferentes miembros de las superfamilias DEG/ENaC, TRP y K2p se han identificado en los últimos diez años como proteínas mecanosensoras (Arnadottir and Chalfie, 2010; Gillespie and Walker 2001; Lumpkin and Caterina 2007; Belmonte y Viana, 2008; Eid y Cortright, 2009). Analizar cada una de estas familias en profundidad, se escapa por completo al propósito y objetivos del presente trabajo, y los datos que se exponen a continuación están centrados en la superfamilia TRP ya que nuestra investigación se centra en el canal TRPV4.

### **2.1.2. Canales TRP**

Los canales TRP son proteínas de membrana que funcionan como canales iónicos no selectivos para cationes, siendo algunos altamente selectivos para  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  altamente hidratados (Minke y Cook, 2002; Nilius y Cols., 2007). Actúan como receptores de productos naturales del tipo de la capsaicina o el mentol entre otros. Además, son sensores moleculares para diferentes aspectos de la sensación general como la temperatura, osmolaridad o pH. La identificación de algunos canales de TRP como los transductores moleculares y los integradores de una amplia gama de modalidades sensoriales ha abierto nuevas perspectivas en el conocimiento de la sensibilidad (Belmonte y Viana, 2008; Eid y Cortright, 2009). Algunos de los miembros de la superfamilia TRP están implicados en una amplia variedad de procesos de transducción mecánica en diversos órganos y especies (Christensen y Corey, 2007).

Las proteínas TRP son codificadas por 33 genes diferentes en mamíferos (cerca de 60 en pez cebra, 30 en equinodermos, 24 en nematodos, 16 en la mosca de la fruta y uno en levadura). En base a sus propiedades fisiológicas y estructurales se les ha dividido en siete subfamilias: TRPC (clásicos o canónicos), TRPV (vainilloides), TRPM (melastatina), TRPA (anquirina), TRPP (policistina), TRPML (mucolipina) y TRPN (homólogos de la proteína NOMP-C). Esta última familia sólo se ha encontrado en invertebrados y peces. En mamíferos, incluido el hombre, se han identificado hasta la fecha 28 subunidades de TRP diferentes (Clapham y Cols., 2005; Montell, 2005).

Estructuralmente todas las subunidades de los canales TRP son parecidas y están formadas por 6 dominios transmembrana (S1 a S6) con un bucle entre S5 y S6 que

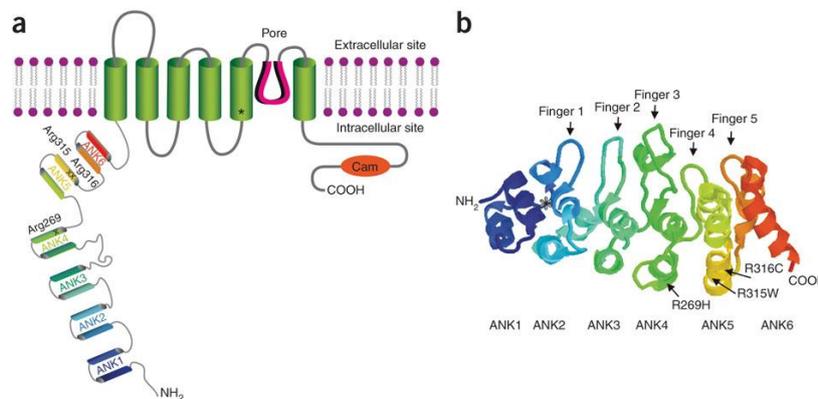
forma un poro. Los dominios N-terminal y C-terminal varían en longitud y contienen diferentes dominios según la subfamilia ( Clapham et al, 2005).

Los canales TRP se expresan en diferentes tejidos y tipos de células. A nivel del ligamento periodontal nunca se ha comunicado la presencia de este tipo de proteínas y recientemente se han detectado algunos miembros en los odontoblastos humanos (Solé-Magdalena y Cols., 2011) reforzando así el concepto de que estas células son mecanorreceptores (ver Son y Cols., 2009).

Los canales TRP son activados y regulados por diversos mecanismos, y responden a estímulos ambientales como la presión, temperatura, el pH, las feromonas, los sabores y la osmolaridad.

### 2.1.2.1. Canal TRPV4

El canal TRPV4 es un canal iónico no selectivo que se expresa en una amplia variedad de tejidos. Está formado por un complejo homotetramérico de subunidades, y es entre 5 y 10 veces más permeable para  $\text{Ca}^{2+}$  que para  $\text{Na}^{+}$ .



**Figura 2.-** Modelo esquemático de la estructura de TRPV4. Tomado de Auer-Grumbach y Cols. (2010)

TRPV4 puede ser activado por diferentes mecanismos físicos (deformaciones de la membrana celular, calor, estimulación mecánica) y químicos (endocannabinoides, ácido araquidónico y ésteres de forbol). Aunque el papel TRPV4 no se conoce en detalle parece estar involucrado en la detección de diferentes modalidades de sensibilidad como lo demuestra su amplia localización y distribución tisular (ver Amato y Cols., 2012). Por otro lado, los estudios realizados en ratones deficientes en TRPV4 sugieren un papel importante de este canal en la regulación de la osmolaridad del cuerpo,

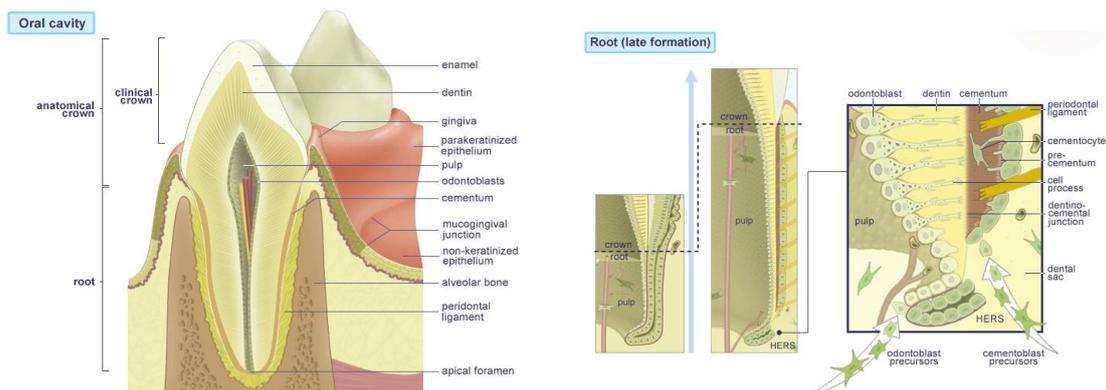
mecanosensación, percepción de la temperatura, regulación vascular y posiblemente en la audición (Liedtke, 2005; Plant y Strotmann, 2007).

## 2.2. EL LIGAMENTO PERIODONTAL

El trabajo de investigación realizado se centra en la expresión de proteínas mecánicas en el ligamento periodontal y por ello es conveniente realizar una breve descripción del mismo con el fin de comprender mejor la descripción de los resultados.

### 2.2.1. Anatomía del ligamento periodontal

El ligamento periodontal es una delgada capa de tejido conectivo fibrilar situada en el espacio periodontal que fija la raíz dentaria al hueso alveolar a través del cemento. Forma parte del periodoncio que es el conjunto de tejidos que conforman el órgano de soporte del diente (cemento, ligamento periodontal, hueso alveolar). El periodoncio está aislado de la cavidad bucal por la encía que rodea el cuello del diente y la unión dentogingival que une la encía al diente. Estas dos últimas estructuras forman el periodoncio de protección o corion gingival, ya que aísla el ligamento, el hueso y la raíz del medio séptico bucal. A nivel del apice dentario el conectivo periodontal se pone en contacto con el tejido conectivo pulpar. El espesor del ligamento periodontal oscila entre 0,10 y 0,38 mm., disminuye con la edad y aumenta con la masticación.



**Figura 3.-** Esquemas de la anatomía y estructura del ligamento periodontal. Tomado de M. Mckee, Histology of the Oral Cavity, Teeth 1.

[http://alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit\\_4/unit%204%202005/L-06%202008%20%20histology%20of%20the%20oral%20cavity%20-%20teeth%201.xml](http://alexandria.healthlibrary.ca/documents/notes/bom/unit_4/unit%204%202005/L-06%202008%20%20histology%20of%20the%20oral%20cavity%20-%20teeth%201.xml)

Las fibras del ligamento periodontal se insertan en la pared interna de la lámina cribosa del hueso alveolar que es una fina capa de tejido óseo compacto. Las fibras de colágeno

que lo forman son como cuerdas retorcidas que pueden ser remodeladas de modo continuo sin perder su arquitectura y función. Estas fibras se disponen oblicuamente entre el hueso y el cemento. Embriológicamente el ligamento periodontal deriva del neuroectodermo, de la capa germinativa ectomesenquimal o mesenquima cefalico. De ahí derivan también el tejido dentinopulpar, el cemento y el hueso alveolar.

Funcionalmente, las fibras del ligamento periodontal se disponen formando grupos:

a) grupo crestalveolar (oblicuas ascendentes): van desde la cresta alveolar hasta justo por debajo de la unión cemento adamantina. Evitan principalmente los movimientos de extrusión del diente;

b) grupo horizontal o de transición: situadas por debajo del grupo anterior y corren en ángulo recto respecto al eje mayor de la raíz, desde el cemento hasta el hueso. Su función es resistir las fuerzas laterales y horizontales del diente;

c) grupo oblicuo descendente: es el más abundante, se dispone en dirección descendente desde el hueso hacia el cemento. Son las fibras más potentes y tienen la función de mantener al diente en su alveolo, soportan el grueso de las fuerzas masticatorias y evitan los movimientos de intrusión;

d) grupo apical: van desde la zona de cemento que rodea el foramen apical hacia el fondo del alveolo. Por debajo del foramen apical se denomina espacio indiferenciado de Black, de trata de conectivo laxo que permite la introducción del paquete vasculonervioso hacia la pulpa dentaria. Su función es evitar los movimientos de lateralidad y extrusión y amortiguar los de intrusión.

e) grupo interradicular: existen sólo en dientes multiradicales, son fibras que van desde la cresta del tabique interradicular hacia el cemento en forma de abanico. Su función es evitar los movimientos de lateralidad y rotación.

Las porciones de las fibras principales que están incluidas en el hueso reciben el nombre de fibras de Sharpey, y las que se insertan en el cemento se denominan perforantes, retenidas o incluidas y corresponden a los haces de fibras extrínsecas del cemento.

### **2.2.2. Estructura del ligamento periodontal**

El tejido conectivo denso que forma el ligamento periodontal está constituido de células, fibras y sustancia fundamental amorfa además de vasos sanguíneos y nervios.

Los tipos celulares incluyen fibroblastos, osteoblastos, cementoblastos, osteoclastos y cementoclastos. Además es posible encontrar células con función inmunitaria o inflamatoria (macrófagos, mastocitos y eosinófilos), así como las denominadas células epiteliales de Malassez y células troncales ectomesenquimáticas. Los fibroblastos son las células más abundantes del ligamento periodontal y son los responsables de la producción de la mayor parte de los componentes de la matriz extracelular.

En cuanto a las fibras del ligamento periodontal se describen en él fibras colágenas, reticulares, elásticas, oxitalánicas y de elaunina. Las fibras se parecen a cuerdas retorcidas y siguen un recorrido ondulado, son flexibles aunque muy resistentes a la tracción. Esto permite cierto grado de movimiento del diente y a su vez, gracias a la gran resistencia a la tensión, oponen una firme resistencia a movimientos de mayor intensidad. Las fibras de oxitalán ocupan el 3% del ligamento periodontal humano, son más abundantes en la zona del ápice y se cree que podrían tener la función de sostener los vasos del ligamento y participar directa o indirectamente en el sistema mecanorreceptor del ligamento periodontal.

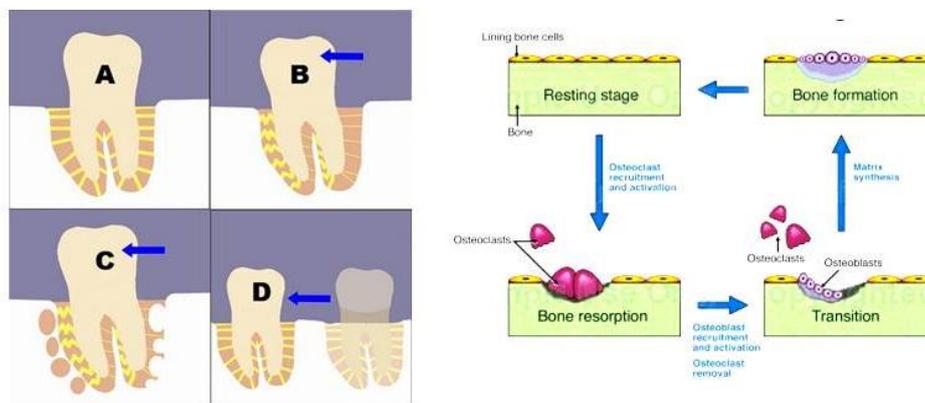
El ligamento periodontal además de fijar el diente al hueso alveolar tiene la función de soportar las fuerzas de la masticación y actuar como receptor sensorial propioceptivo, esto último es necesario para lograr el control posicional de la mandíbula y una correcta oclusión.

El tejido periodontal está en constante recambio, los haces de colágeno que lo forman son remodelados, removidos y reemplazados constantemente. Este hecho nos favorece en el movimiento dentario mediante ortodoncia, ya que se van a formar haces de colágeno en la nueva posición. La reacomodación de las fibras periodontales durante la etapa eruptiva prefuncional o en los movimientos ortodónticos del diente se debe al recambio metabólico a nivel macromolecular de las fibras (Gómez de Ferraris y Campos Muñoz, 2000).

### 2.3. MOVIMIENTO ORTODONCICO

La clave de la respuesta tras la aplicación de una fuerza ortodónica radica tanto en la remodelación del hueso alveolar como en la regeneración y reparación del ligamento periodontal. El colágeno del ligamento periodontal se remodela y se renueva constantemente durante su función normal y otro tanto sucede con el hueso alveolar que está continuamente formándose y destruyéndose debido a la actividad celular. Durante la remodelación ósea fisiológica, los osteoclastos reabsorben un volumen de hueso que es completamente reemplazado por los osteoblastos, proceso que se prolonga por varios meses, manteniéndose así la masa ósea.

Pero cuando se realizan un tratamiento de ortodoncia se rompe el equilibrio óseo y se movilizan los dientes produciéndose un proceso inflamatorio de tipo aséptico que afecta al ligamento periodontal originando una respuesta celular que estimula o inhibe la remodelación ósea (Bravo, 2003). No obstante, la plasticidad del hueso alveolar periodontal constituye la base del movimiento ortodónico. La respuesta histológica a las fuerzas es osteolisis en la zona de presión pero también en la zona de tensión ( ver para referencias de Carlos y Cols., 2007).



**Figura 4.-** Esquema de los procesos biológicos y celulares que se producen durante el movimiento dentario

<http://www.dentalorg.com/biology-of-tooth-movement.html>

En las primeras fases del movimiento ortodónico siempre se produce una inflamación aguda, vasodilatación periodontal, incomodidad e incluso dolor que esta relacionado con las terminaciones nerviosas periodontales (Sari y Cols., 2004) si bien la respuesta

varía mucho de un individuo a otro (Ren y Cols., 2002). Durante la respuesta inflamatoria se producen diferentes sustancias como por ejemplo prostaglandinas que son mediadores en la respuesta osteoclástica. La forma en que lo hace no está totalmente clara (Wong y Cols., 1992). A partir de ese momento se subsiguen una serie de respuestas en el hueso y el resto de los elementos del periodonto que son bien conocidos.

A los fines de nuestro trabajo lo que importa es cómo las células mecanosensitivas del ligamento periodontal, y del hueso alveolar, convierten la carga ortodóncica en señales intracelulares que a su vez son capaces de modificar la biología de otras células no-mecanosensitivas y de esa forma producir una respuesta coordinada ante el estímulo ortodóncico.

Para que esto ocurra debe suceder lo siguiente:

- a) las fuerzas ortodóncicas tienen que convertirse en una señal detectable por las células (mecanismo de transducción);
- b) el ligamento periodontal y el hueso alveolar han de poseer las células capaces de detectar carga mecánica y desencadenar una señal (células mecanosensitivas);
- c) las células mecanosensitivas tienen que tener un mecanismo para recibir la señal (mecanoreceptor);
- d) el mecanoreceptor debe de ser capaz de transformar el estímulo de la carga en señales intracelulares; y
- e) las señales intracelulares generadas en las células mecanosensitivas han de provocar la producción de mediadores para transmitir la información de carga mecánica a las otras células.

Todo este proceso se traduce en la formación de mediadores celulares como el óxido nítrico (NO) y prostaglandinas E2 (PGE2) que están relacionadas con la formación y reabsorción de hueso. Nuestra hipótesis de trabajo es que los sensores específicos en el movimiento ortodóncico podrían ser los canales iónicos mecanosensibles, y particularmente los canales TRPV4.

Existen diversas teorías sobre cómo las células responden en un primer momento a la presión. Al aplicar compresión o tensión en el ligamento periodontal (carga mecánica) se ha comprobado una “upregulation” de varios genes (Yamashiro y Cols., 2007; De Araujo y Cols., 2007), entre los que se encuentran el gen de la interleukina 8 (Maeda y Cols., 2007), óxido nítrico o prostaglandina (Van der Pauw y Cols., 2000). Se cree que todas estas moléculas y las metaloproteasas (Bildt y Cols., 2009) tienen un papel importante en la respuesta del hueso a la presión mecánica. La gran tensión que se necesita para estimular a los osteocitos y los osteoblastos no puede venir solo de la deformación de la matriz ya que eso causaría la fractura del hueso (You y Cols., 2001). Es interesante destacar que algunas metaloproteasas han sido implicadas directamente en la mecanotransducción durante los movimientos ortodónticos (Ziegler y Cols., 2010).

Pero además de las células del ligamento periodontal, las células óseas también responden a la tensión. Tal es el caso de los osteocitos (Klein-Nulend y Cols., 1995), J, Van der Plas A, Semeins CM, et al 1995), los pre-osteoclastos, los osteoblastos y los osteoclastos (Matsumoto y Cols., 1998; McAllister y Cols., 2000; Kim y Cols., 2006).

Respecto a los mecanismos celulares y moleculares de transducción y señalización mediante los cuales las tensiones ejercen sus funciones biológicas, se han postulado diferentes teorías que incluyen a

a) las integrinas y el modelo de integridad tensional. Las integrinas son los principales receptores que utiliza la célula para relacionarse con la matriz extracelular que la rodea, constan de subunidades alfa y beta que combinadas de diferentes formas pueden producir más de 20 tipos distintos de receptores. Mantienen el medio extracelular comunicado con el interior de la célula por proteínas intermediarias como talina, vinculina, paxilina y alfa-actinina (Ingber, 1991). Al señalar desde la superficie celular hacia el núcleo y el citosol, las integrinas gobiernan procesos fisiológicos clave como la migración celular, la expresión de genes, la multiplicación celular, la supervivencia, la regeneración tisular y cicatrización de heridas, el desarrollo embrionario, la respuesta inmune y la formación de vasos sanguíneos. Se ha demostrado que las integrinas están relacionadas con la expresión génica en células osteoblasticas (Carvalho y Cols., 1998; Pavalko y Cols., 1998).

b) receptores acoplados a proteína G. Las proteínas G tienen un receptor en la membrana con siete dominios transmembrana asociados a subunidades alfa, beta o

gama que se encuentran en el citosol. Las subunidades alfa están unidas a guanosina difosfato (GDP) cuando están pasivas y a guanosin trifosfato (GTP) cuando están activas (se une un ligando al receptor).

Al unirse el receptor extracelular a un ligando la proteína sufre un cambio en su estructura y la subunidad alfa-GTP se disocia de las subunidades beta y gama. Se activan de esa manera los segundos mensajeros, enzimas y canales iónicos. En la mayor parte de los casos es la subunidad alfa separada la que lleva a cabo los efectos biológicos. Las unidades beta y gamma no se separan una de la otra, pero también pueden activar efectores.

Algunos autores afirman que los receptores de la proteína G se pueden activar indirectamente en ausencia de ligando (Haidekker y Cols., 2000; Butler y Cols., 2001).

### **c) canales iónicos**

Independientemente del mecanismo al final de la señalización se activan segundos mensajeros y sistemas kinasa que activan factores de transcripción y se activan nuevos genes.

Para responder a la carga ortodónica, las células mecanoreceptoras han de comunicar al resto de las células lo que está pasando extracelularmente. Esta comunicación puede ser directa de célula-célula o a través de mediadores solubles. De cualquier forma conviene tener siempre en cuenta que las mecanoproteínas no son receptores y las fuerzas mecánicas no son ligandos, son más bien antiligandos, porque pueden interrumpir interacciones intra o intermoleculares que desencadenen una transmisión conformacional (Sukharev y Anishkin, 2004).

### **3. OBJETIVOS**

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

Los **objetivos específicos** son estudiar la expresión de la mecanoproteína TRPV4 en las células del ligamento periodontal de rata sometidas a movimientos ortodónticos experimentales.

## **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).

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 CO<sub>2</sub> 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, Copenhagen, 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

<b>Antígeno</b>	<b>Origen</b>	<b>Dilución</b>	<b>Distribuidor</b>
PGP 9.5	Conejo	1:1000	Biogenesis <sup>1</sup>
Protein S100	Conejo	1:1000	Dako <sup>2</sup>
TRPV4*	Conejo	1:200	Abcam <sup>3</sup>

TRPV4: anticuerpo contra un peptide sintético derivado del dominio citoplasmático del dominio N-terminal conjugado con una proteína transportadora inmunogénica.

PGP 9.5: Protein gene product 9.5

<sup>1</sup>Poole, England, UK

<sup>2</sup>Copenhage, Dinamarca

<sup>3</sup>Cambridge, UK

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

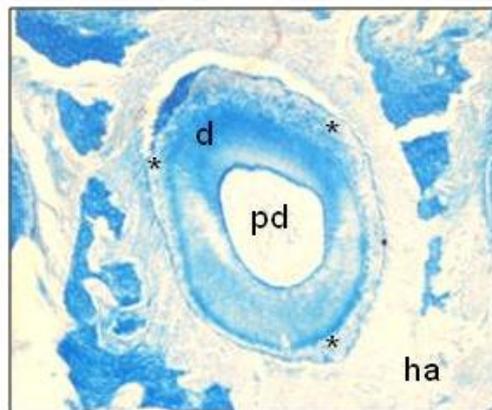
anticuerpo primario. En estas condiciones no se observó en ningún caso inmunomarcaje específico.

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 de los odontoblastos

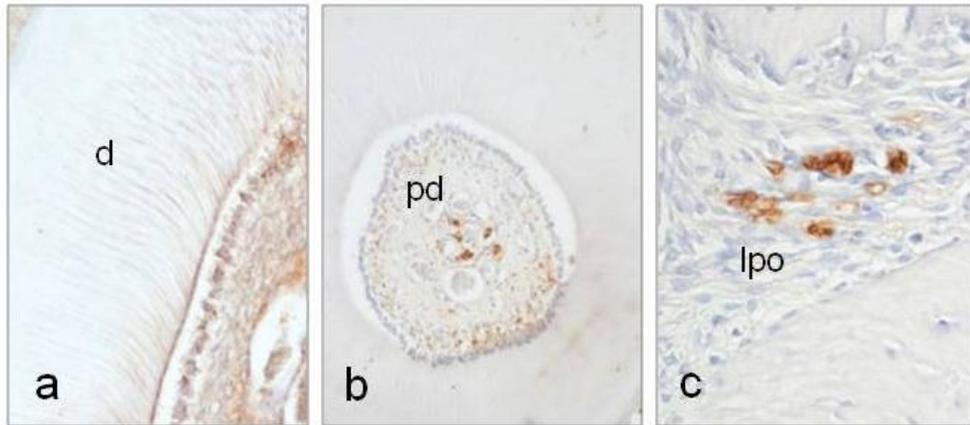
En todas las secciones histológicas estudiadas se pudieron identificar con claridad las raíces del primer molar superior, tanto control como experimental. Las imágenes que se aprecian permiten observar la pulpa dentaria en el centro, la unión pulpa-dentina y los ameloblastos y sus expansiones intradentinarias, el ligamento periodontal y el hueso alveolar (Figura 5). Las descripciones pertinentes a la localización de la inmunorreacción para TRPV4 se realizan en base a esta organización.



**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.

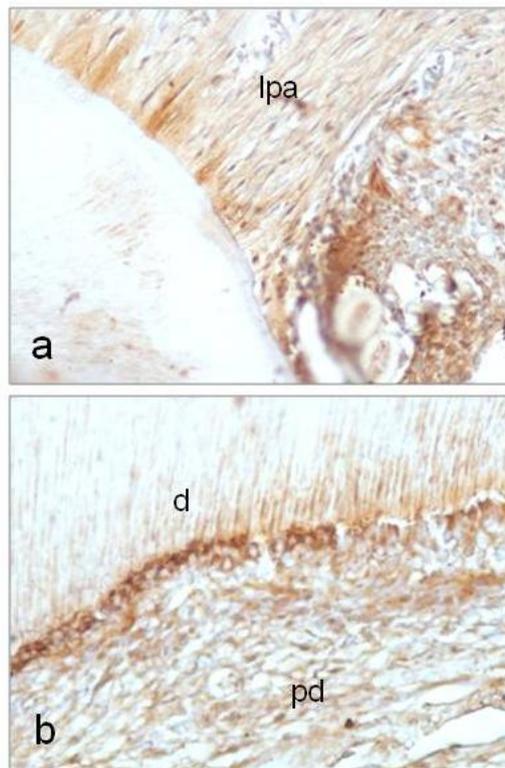
Para identificar algunos elementos dentarios o del ligamento periodontal en los que *a priori* se puede esperar la presencia de TRPV se han utilizado marcadores neuronales y gliales. Como era de esperar en base a los conocimientos previos, se ha detectado inmunorreacción para PGP 9.5 en los odontoblastos y en los nervios de pulpa dentaria (Figuras 6a y 6b).

En cuanto a la proteína S100, se detectó inmunorreacción positiva para ella en los troncos nerviosos (datos no mostrados), en muy escasas fibras nerviosas de la pulpa dentaria y en el ligamento periodontal (Figura 6c). En ningún caso se han observado formaciones anatómicas cuya morfología se asemeje a los mecanorreceptores de tipo Riffini que se encuentran habitualmente en esta localización. Es probable que alguno de los cúmulos proteína S100 positivos correspondan con estas formaciones sensitivas pero son necesarios estudios de doble inmunomarcaje para poder identificarlos con certeza.



**Figura 6.-** Localización inmunohistoquímica de la proteína PGP 9,5 (a,b) y de la proteína S100 en dontoblastos, fibras nerviosas pulpaes 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 del canal TRPV4 en el ligamento periodontal



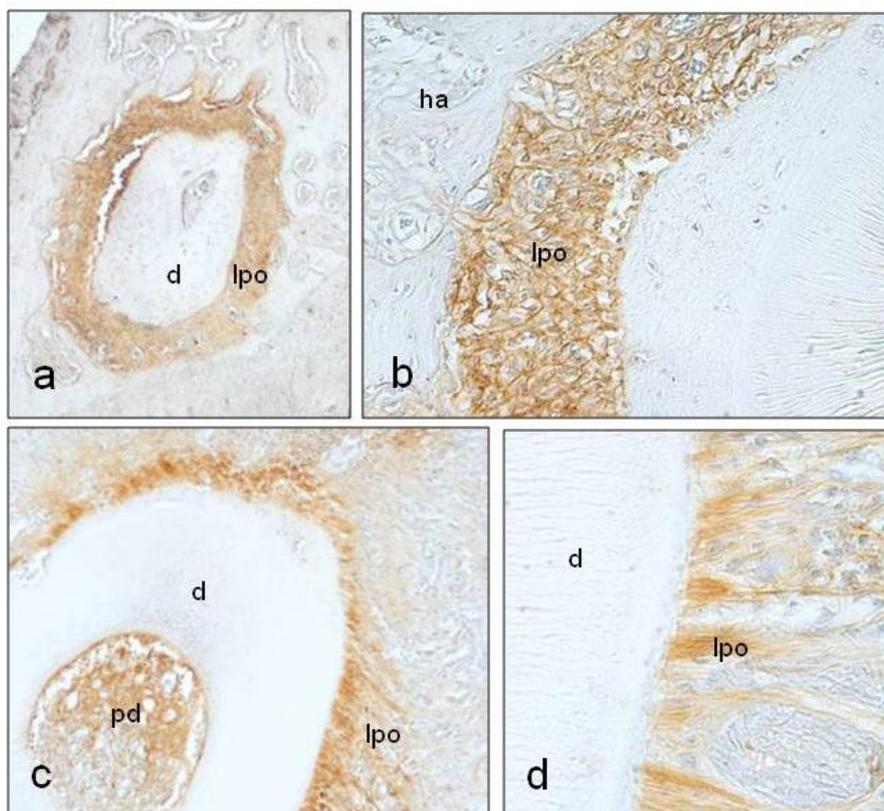
**Figura 7.-** Localización inmunohistoquímica de TRPV4 en logamento periodontal (a) y dontoblastos (b), en condiciones de normalidad. Magnificación original x10 (b) y x40 (a).

En el ligamento periodontal normal la inmunorreacción para el TRPV4 es muy escasa y casi inexistente aunque ocasionalmente pueden observarse pequeños grupos de células

con reacción positiva (Figura 7a). Por el contrario, la presencia de TRPV4 es intensa en los odontoblastos y en sus prolongaciones (Figura 7b).

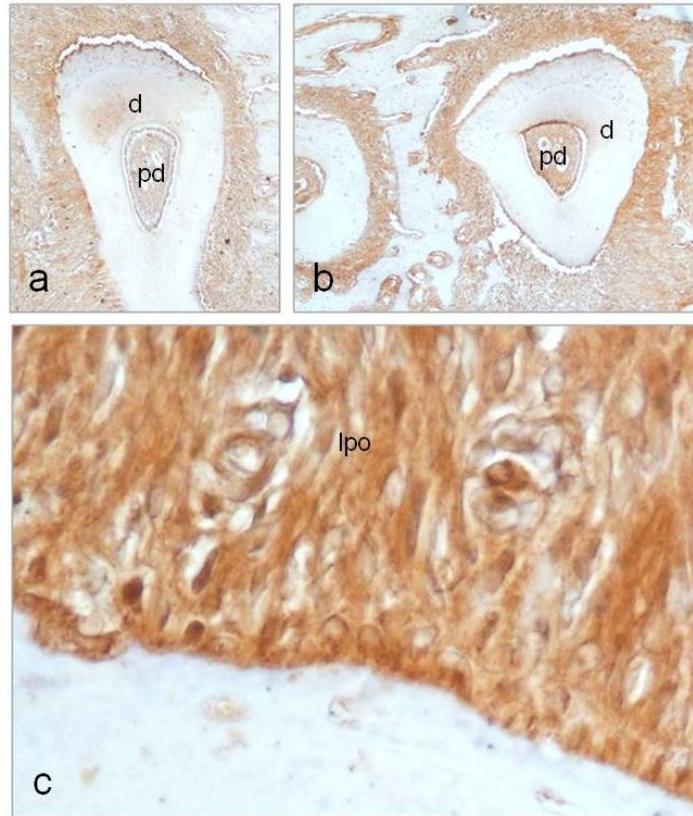
### 5.3. Localización del canal TRPV4 en el ligamento periodontal sometido a tracción

En el ligamento periodontal de los animales sometidos a la tracción ortodóntica y con carácter general se produce un incremento en la intensidad de inmunorreacción para TRPV4, pero en ningún caso se pudieron encontrar diferencias regionales evidentes en la distribución del mismo; es decir, aparentemente la reacción es la misma en las zona de ligamento sujetas a tensión o a presión (Figuras 8 y 9).

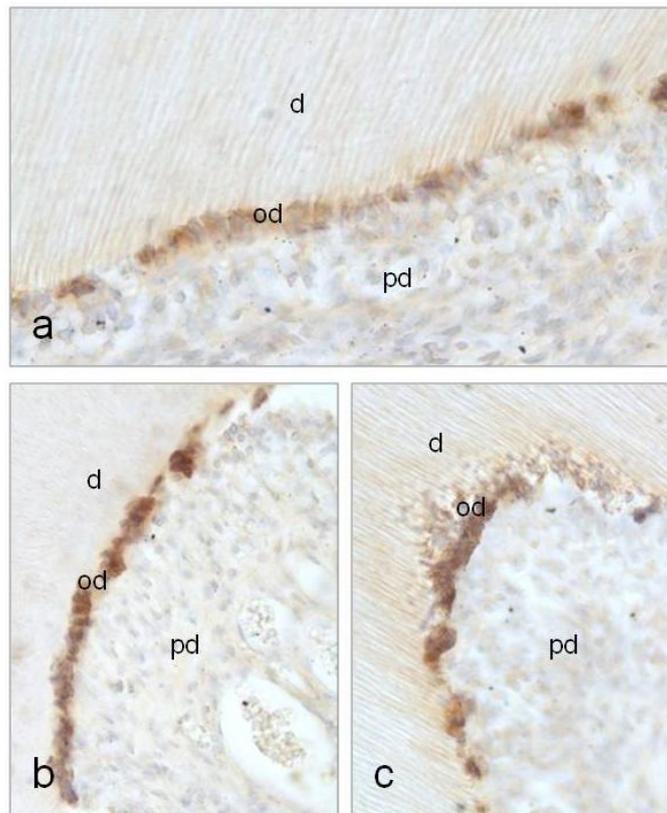


**Figura 8.-** Localización inmunohistoquímica de TRPV4 en ligamento periodontal (a) y odontoblastos (b), en animales experimentales. Magnificación original x10 (a), x20 (c) y x40 (b,d).

Donde sí se aprecian diferencias en la expresión de TRPV4 es en los odontoblastos. En estas células el patrón de inmunorreacción es diferente al de los controles apreciándose mayor marcaje en la zona sometida a tensión que en la sometida a presión (Figura 9b). Además, llama la atención el hecho de que los perfiles de los somas de los odontoblastos sean precisos y no haya reacción positiva en los procesos celulares (Figura 10).

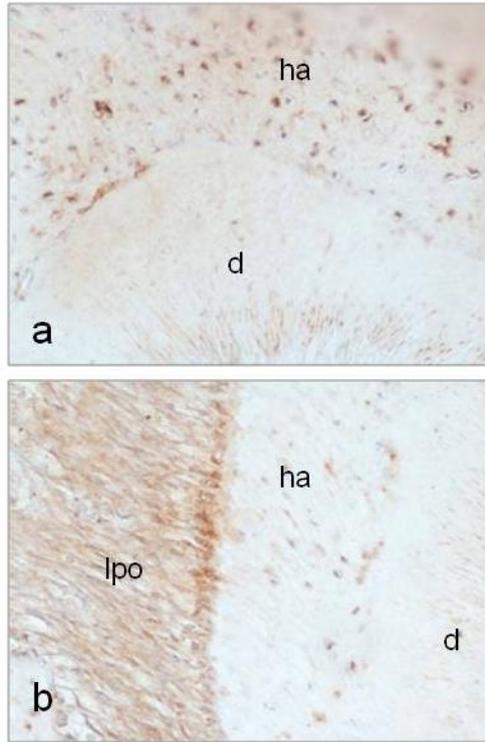


**Figura 9.-** Localización inmunohistoquímica de TRPV4 en ligamento periodontal (a) y dentoblastos (b), en animales experimentales. Magnificación original x10 (b) y x40 (a).



**Figura 10.-** Localización inmunohistoquímica de TRPV4 en dentoblastos en animales experimentales. Magnificación original x40.

Finalmente, en el hueso alveolar de los animales del grupo experimental se ha observado reacción positiva para TRPV4, algo que no sucede nunca en las piezas dentarias del lado control (Figura 11).



**Figura 11.-** Localización inmunohistoquímica de TRPV4 en el hueso alveolar en animales experimentales. Magnificación original x40.

## 6. DISCUSION

El presente trabajo de investigación se diseñó para establecer el patrón de distribución de la mecanoproteína TRPV4 en el ligamento peridontal de la rata en condiciones de normalidad y tras ser sometidos a movimientos ortodóncicos, utilizando técnicas de inmunohistoquímica asociadas a un anticuerpo específico contra aminoácidos de, canal iónico TRPV4. El modelo experimental ya ha sido validado previamente por investigadores del Instituto Asturiano de Odontología (ver De Carlos y Cols., 2006, 2007). El objetivo general del trabajo ver si en base de los movimientos dentarios se encuentran canales iónicos de la familia TRP, ya que podrían mediar la señalización de los factores mecánicos sobre el diente y el aparato periodontal.

Durante las dos últimas décadas se ha ido demostrando porgresivamente que los canales iónicos de la superfamilia TRP se encuentran implicados en mecanismo de sensación que trascienden la fisiología clásica ya que puede ser acticados o bloqueados por la temperatura, factores mecánicos, la osmolaridad y una amplia gama de otros factores químicos y físicos. El TRPV4 parece estar implicado en la mecanosensibilidad y osmolaridad de la mayoría de los tejidos músculo-esqueléticos. Por ejmplo, en el cartílago articular tiene sensibilidad osmótica; además s eexpresa en ostoblastos y osteoclastos y su ausencia produce perdida difusa de hueso y mutaciones en el gen son la causa de graves y raras enfermedades que afectan a huesos y músculos. Por ello Gailak y Cols. (2010) has calificado el TRPV4 como el sexto sentido para el aparato locomotor. Habida cuenta de que hay diferentes tejidos esqueléticos implicados en la fijación del diente al hueso y que estos se modifican en los movimientos ortodóncicos, la elección del tema para la realización de este trabajo fin de master quedaría justificada. Por otro lado, se ha descubierto recientemente que mutaciones en el gen que codifica para TRPV4 son las responsables de patologías del sistema músculo-esquelético (Firillo y Cols., 2012).

En consonancia con el único estudio disponible sobre la presencia de TRPV4 el diente (Solé-Magdalena y Cols., 2011) hemos observado la presencia de este canal iónico en los odontoblastos. Por otra parte, nuestros resultados demuestran claramente que las células del ligamento periodontal, salvo pequeños grupos, no expresan esta proteína. Por tanto, en condiciones de normalidad y en la rata, TRPV4 podría tener un papel preponderante en odontoblastos y escaso en el ligamento periodontal. Por otro lado, y

como era de esperar, nuestros hallazgos con el marcador general de odontoblastos PGP 9.5 coinciden con los datos en la literatura (ver Solé-Magdalena y Cols., 2011).

Por otro lado, cuando se somete el primer molar superior a una fuerza de características semejantes a las que se usa en los tratamientos de ortodoncia se produce un aumento generalizado en el inmunomarcaje para TRPV en el ligamento periodontal indicando que hay un aumento en la expresión de este canal iónico como consecuencia de la situación experimental creada. Además, hay un aumento en la inmunorreacción para TRPV4 en los odontoblastos. Sin embargo, este aumento tiene características especiales en cada uno de los casos. En el primero, el aumento es general sin diferencias aparentes entre la zona que está sometida a tracción y la que soporta presión. Por el contrario, en el caso de los odontoblastos el aumento en TRPV4 es especialmente evidente en los situados en la vertiente de la tensión. Se desconoce hasta el momento el porqué de este comportamiento diferente entre ambos tejidos.

Un detalle interesante a destacar es la presencia en el hueso de la zona de tensión de los animales experimentales, de inmunorreacción para TRPV4. No hemos analiado en detalle de qué células óseas se trata, pero existen datos en la bibliografía que demuestran la existencia de TRPV4 en los osteoblastos durante el periodo de diferenciación (Abed y Cols., 2009), y que TRPV4 regula la diferenciación terminal de los osteoclastos (Masuyama y Cols., 2008) y es el responsable de la pérdida de hueso por falta de uso (Mizoguchi et al., 2008). TRPV4 se ha relacionado con el control de la diferenciación de osteoclastos en el hueso (Vicent y Duncton, 2011). Debido al proceso inflamatorio que se produce como consecuencia del movimiento ortodóncico creado, se produce acidosis en la zona y se sabe que existe sinergismo entre acidosis y activación de TRPV4 (Kato y Morita, 2011). Por ello algunos autores han sugerido la utilización de antagonistas de TRPV4 para el tratamiento del dolor inflamatorio.

Este trabajo es el primero en demostrar la existencia de TRPV4 en las células del ligamento peridotal y su regulación por factores mecánicos y supone una nueva línea de trabajo dentro del amplio contexto de la mecanobiología, especialmente en el ámbito de la ortodoncia. Quedan por aclarar la mayor parte de los aspectos del tema ya que el trabajo realizado es exclusivamente morfológico y descriptivo. No obstante, en apoyo de la hipótesis de partida creemos que TRPV4 puede funcionar como mecanorreceptor y es controlado por factores mecánicos. Pero estas aseveraciones deben de ser tomadas

con precaución ya que el papel de TRPV4 como mecanosensor ha sido puesto en entredicho por el hecho de que algunas células son capaces de mantener la mecanosensibilidad aun en ausencia de TRPV4 (Loukin y Cols., 2010).

## **7. CONCLUSIONES**

Del análisis detallado de los resultados, tras la oportuna discusión de los mismos, se llega a las siguientes conclusiones:

1.- Las células del ligamento periodontal y los odontoblastos de la rata expresan el canal iónico TRPV4.

2.- La expresión de TRPV4 es regulada por factores mecánicos ya que la producción de movimientos ortodóncicos aumenta su expresión en las localizaciones habituales.

3.- Por la localización celular y comportamiento ante factores mecánicos TRPV4 cumple los requisitos para ser considerado una mecanoproteína.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abed E, Labelle D, Martineau C, Loghin A, Moreau R. 2009. Expression of transient receptor potential (TRP) channels in human and murine osteoblast-like cells. *Mol Membr Biol* 26: 146-158.
- Adam P. Christensen and David P. Corey 2007 TRP channels in mechanosensation: direct or indirect activation? *Nature Reviews* 8: 510-521.
- Amato V, Viña E, Calavia MG, Guerrera MC, Laurà R, Navarro M, De Carlos F, Cobo J, Germanà A, **Vega JA**. 2012. **TRPV4** in the sensory organs of adult zebrafish. *Microsc Res Tech* 75:89-96
- Arnadóttir J, Chalfie M 2010 Eukaryotic mechanosensitive channels. *Annu Rev Biophys* 39: 111-137.
- Auer-Grumbach M, Olschewski A, Papić L, Kremer H, McEntagart ME, Uhrig S, Fischer C, Fröhlich E, Bálint Z, Tang B, Strohmaier H, Lochmüller H, Schlotter-Weigel B, Senderek J, Krebs A, Dick KJ, Petty R, Longman C, Anderson NE, Padberg GW, Schelhaas HJ, van Ravenswaaij-Arts CM, Pieber TR, Crosby AH, Guelly C. 2010. Alterations in the ankyrin domain of **TRPV4** cause congenital distal SMA, scapuloperoneal SMA and HMSN2C. *Nat Genet* 42:160-164
- Belmonte C, Viana F. 2008. Molecular and cellular limits to somatosensory specificity. *Mol Pain* 4, 14 doi: 10.1186/1744-8069-4-14.
- Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM, Von den Hoff JW. 2009. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic **tooth movement**. *Eur J Orthod* 31: 529-535.
- Bravo LA, 2003. Manual de Ortodoncia. Editorial Síntesis. Capítulo 7, 233-244.
- Clapham DE, Julius D, Montell C, Schultz G, 2005. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol. Rev* 57: 427-450.
- Butler PJ, Norwich G, Weinbaum S, Chien S ,2001. Shear stress induces a time- and position- dependent increase in endothelial cell membrane fluidity, *Am J Physiol. cell Physiol.* 280:C962-C969.

- Canut Brusola, 2000. Ortodoncia clínica y terapéutica. Editorial Masson 2ª Edición. Capítulo 15, 255-274.
- Carvalho RS, Schaffer JL, Gerstenfeld LC, 1998. Osteoblasts induce osteopontin expression in response to attachment on fibronectin: demonstration of a common role for integrin receptors in the signal transduction processes of cell attachment and mechanical stimulation, *J Cell Biochem* 70:376-390.
- De Araujo RM, Oba Y, Moriyama K, 2007. Identification of genes related to mechanical stress in human periodontal ligament cells using microarray analysis, *J Periodont Res* 42:15-22.
- De Carlos F, Juan Cobo, Belen Diaz-Esnal, Juan Argüelles, Manuel Vijande, and Marina Costales, 2006. Orthodontic tooth movement after inhibition of cyclooxygenase-2. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*, 129: 402-6.
- De Carlos F, Juan Cobo, Carmen Perillan, Miguel A. Garcia, Juan Argüelles, Manuel Vijande and Marina Costales, 2007. Orthodontic tooth movement after different coxib therapies. *European Journal of Orthodontics* 29 : 596–599 doi:10.1093/ejo/cjm072
- Eid SR, Cortright DN, 2009. Transient receptor potential channels on sensory nerves. *Handb Exp Pharmacol* 194: 261-281
- Fiorillo C, Moro F, Brisca G, Astrea G, Nesti C, Bálint Z, Olschewski A, Meschini MC, Guelly C, Auer-Grumbach M, Battini R, Pedemonte M, Romano A, Menchise V, Biancheri R, Santorelli FM, Bruno C. 2012. TRPV4 mutations in children with congenital distal spinal muscular atrophy. *Neurogenetics*. 2012 Apr 25. PMID: 22526352
- Galler KM, D'Souza RN. 2011. Tissue engineering approaches for regenerative dentistry. *Regen Med* 6:111-124.
- Gillespie G, Walker RG. 2001. Molecular basis of mechanosensory transduction. *Nature* 413: 194-202.
- Gomez De Ferraris M. E, Campos Muñoz A. *Histología y Embriología bucodental*. Editorial Panamericana. Capitulo 12, 354-367. 2000.

- Guilak F, Leddy HA, Liedtke W. 2010. Transient receptor potential vanilloid 4: The sixth sense of the musculoskeletal system? *Ann N Y Acad Sci* 1192: 404-409.
- Haidekker MA, L'Heureux N, Frangos JA, 2000. Fluid shear stress increases membrane fluidity in endothelial cells: a study with DCVJ fluorescence, *Am J physiol Heart Circ Physiol* 278:H1401-H1406.
- Ingber D, 1991. Integrins as mechanochemical transducers, *Curr Opin Cell Biol* 3:841-848.
- Kato K, Morita I. 2011. Acidosis environment promotes osteoclast formation by acting on the last phase of preosteoclast differentiation: a study to elucidate the action points of acidosis and search for putative target molecules. *Eur J Pharmacol* 63: 27-39.
- Kim CH, You L, Yellowley CE, et al, 2006. Oscillatory fluid flow- induced shear stress decreases osteoclastogenesis through RANKL and OPG signaling, *Bone* 39:1043-1047.
- Klein-Nulend J, Van der Plas A, Semeins CM, et al, 1995. Sensitivity of osteocytes to biomechanical stress in vitro, *Faseb J* 9:441-445.
- Liedtke, 2005. TRPV4 as osmosensor: a transgenic approach. *Eur J Physiol* (2005) 451: 176-180
- Loukin S, Zhou X, Su Z, Saimi Y, Kung C. 2010. Wild-type and brachyolmia-causing mutant TRPV4 channels respond directly to stretch force. *J Biol Chem* 285: 27176-27181.
- Lumpkin EA, Caterina MJ. 2007. Mechanisms of sensory transduction in the skin. *Nature* 445:858-865.
- Maeda A, Soejima K, Bandow K, et al, 2007. Force-induced IL-1beta, *J Dent Res* 86:629-634.
- Magloire H, Coble M-L, Thivichon-Prince B, Maurin J-C, Bleicher F, 2009. Odontoblast : A mechano-sensory cells. *J Exp. Zool B (Mol. Del. Evol)* 312: 416-424. Citado en Solé- Magdalena et al, 2010. Human Odontoblasts express

Transient Receptor Protein and Acid-Sensing Ion Channel Mechanosensor Proteins.

Masuyama R, Vriens J, Voets T, Karashima Y, Owsianik G, Vennekens R, Lieben L, Torrekens S, Moermans K, Vanden Bosch A, Bouillon R, Nilius B, Carmeliet G. 2008. TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. *Cell Metab* 8: 257-65.

Matsumoto T, Nakayama K, Kodama Y, et al, 1998. Effect of mechanical unloading and reloading on periosteal bone formation and gene expression in tail-suspended rapidly growing rats, *Bone* 22 ( Suppl 5 ): 89S-93S.

McAllister TN, Du T, Frangos JA, 2000. Fluid shear stress stimulates prostaglandin and nitric oxide release in bone marrow-derived preosteoclast-like cells, *Biochem Biophys Res Commun* 270:643-648.

Minke and Cook, 2002. TRP Channel Proteins and Signal Transduction. *Physiol Rev* 82: 429-472.

Mizoguchi F, Mizuno A, Hayata T, Nakashima K, Heller S, Ushida T, Sokabe M, Miyasaka N, Suzuki M, Ezura Y, Noda M. 2008. Transient receptor potential vanilloid 4 deficiency suppresses unloading-induced bone loss. *J Cell Physiol* 216: 47-53.

Montell C. 2005. The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* 22;2005(272):re3.

Nilius B, Owsianik G, Voets T, Peters JA. 2007. Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* 87:165-217.

Patel AJ, Lazdunski M, Honore E, 2001. Lipid and mechano-gated 2P domain K (+) channels. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 422-428.

Pavalko FM, Chen NX, Turner CH, et al, 1998. Fluid shear-induced mechanical signaling in MC3T3-E1 osteoblasts requires cytoskeleton-integrin interactions, *Am J Physiol* 275 (6Pt 1):C1591-C1601.

Plant, R. Strotmann, 2007, Chapter 9 TRPV4: A Multifunctional Nonselective Cation Channel with Complex Regulation. Bookshelf ID: NBK5242 PMID: 21204492

- Ren Y , Maltha J C , Van't Hof M A , Von Den Hoff J W , Kuijpers-Jagtman A M , Zhang D 2002 Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles . *Journal of Clinical Periodontology* 29 : 757 – 762
- Sach F , 2010. Stretch-Activated Ion Channels: What Are They? *Physiology (Bethesda)*, 25: 50–56
- Sari E , Olmez H , Gurton U 2004 Comparison of some effects of acetylsalicylic acid and Rofecoxib during orthodontic tooth movement .*American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 125 :310 – 315
- Smalt R, F. T. Mitchell, R. L. Howard, and T. J. Chambers, 1997: Induction of NO and prostaglandin E2 in osteoblasts by wall-shear stress but not mechanical strain, *Am J Physiol* 273 (4 Pt 1): E 751-E758.
- Solé-Magdalena A, Revuelta EG, Menéñez-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.
- Son A.R., Y.M. Yang, J.H. Hong, S.I. Lee, Y. Shibukawa, and D.M. Shin , 2009. Odontoblast TRP Channels and Thermo/Mechanical Transmission. *J Dent Res* 88(11):1014-1019.
- Sukharev and Anishkin, 2004 Mechanosensitive channels: what can we learn from 'simple' model systems?. *TRENDS in Neurosciences* Vol.27 No.6 June 2004.
- Valle ME, Cobo T, Cobo JL, Vega JA. 2012. Mechanosensory Neurons, Cutaneous Mechanoreceptors, and Putative Mechanoproteins. *Microsc Res Tech* doi: 10.1002/jemt.22028
- Van der Pauw MT, Klein-Nulend J, Van den Bos T, et al, 2000. Response of periodontal ligament fibroblasts and gingival fibroblasts to pulsating fluid flow: nitric oxide and prostaglandin E2 release and expression of tissue non-specific alkaline phosphatase activity, *J Periodont Res* 35:335-343.

- Vincent F, Duncton MA. 2011. TRPV4 agonists and antagonists. *Curr Top Med Chem* 11: 2216-2226.
- Wong A, Reynolds E C , West V C 1992 The effect of acetylsalicylic acid on orthodontic tooth movement in the guinea pig . *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 102 : 360 – 365
- Yamashiro K, Myokai F, Hiratsuka K, et al,2007. Oligonucleotide array análisis of cyclic tensión-responsive genes in human periodontal ligament fibroblasts, *Int J Biochem Cell Biol.* 39:910-921.
- Yin y Kuebler, 2010 Mechanotransduction by TRP Channels: General Concepts and Specific Role in the Vasculature. *Cell Biochem Biophys* (2010) 56:1–18
- You L, Cowin SC, Schaffler MB, et al, 2001. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix, *J Biomech* 34:1375-1386.
- Ziegler N, Alonso A, Steinberg T, Woodnutt D, Kohl A, Müssig E, Schulz S, Tomakidi P. 2010. Mechano-transduction in periodontal ligament cells identifies activated states of MAP-kinases p42/44 and p38-stress kinase as a mechanism for **MMP-13** expression. *BMC Cell Biol.* 2010 11:10.