

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE ODONTOLOGÍA

Departamento de Estomatología III (Medicina y Cirugía Bucofacial)



TESIS DOCTORAL

**Cambios bioquímicos del metabolismo óseo durante el movimiento
ortodóncico**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Germán Barbieri Petrelli

Directores

Concepción Martín Alvaro
Mariano Sanz Alonso

Madrid, 2016

Departamento de Estomatología III
Facultad de Odontología
Universidad Complutense de Madrid, España



Cambios bioquímicos del metabolismo óseo durante el movimiento ortodóncico

Germán Barbieri Petrelli

Tesis Doctoral

Madrid, a ... de ... de 2015

Dirigida por los profesores doctores Mariano Sanz Alonso y
Concepción Martín Álvaro

A Lucía y Cloe, mis cables a tierra

“Lo difícil se consigue. Lo imposible se intenta”

Napoleón Bonaparte

“El eterno misterio del mundo es comprenderlo”

Albert Einstein

Ayudas recibidas para la realización de esta tesis

Esta tesis ha sido posible gracias a la concesión de tres becas:

1/ Beca del 5% de Doctorado, concedida por la Universidad Complutense de Madrid. Año 2003.

2/ Beca de Formación de Personal Investigador, concedida por la Universidad Complutense de Madrid, con efectos económicos y administrativos de 1 de abril a 31 de diciembre de 2004.

Prórroga correspondiente a la Beca de Formación de Personal Investigador, concedida por la Universidad Complutense de Madrid, con efectos económicos y administrativos de 1 de enero a 31 de diciembre del año 2005.

Prórroga correspondiente a la Beca de Formación de Personal Investigador, concedida por la Universidad Complutense de Madrid, con efectos económicos y administrativos de 1 de enero a 31 de diciembre del año 2006.

Prórroga correspondiente a la Beca de Formación de Personal Investigador, concedida por la Universidad Complutense de Madrid, con efectos económicos y administrativos de 1 de enero a 31 de diciembre del año 2007.

3/ Ayuda a la Investigación de la Fundación Mutua Madrileña, concedida al Dr. Mariano Sanz Alonso el 4 de julio de 2008.

Agradecimientos

Cualquier persona que haya realizado un trabajo de este tipo sabe que resulta imposible llegar a su fin sin la ayuda de mucha gente. Por esta razón me gustaría empezar con un agradecimiento generalizado a todas las personas que han hecho posible la finalización de este trabajo, ya sea directa o indirectamente.

De forma particular comenzaré dándole las gracias a mis dos directores de tesis, Conchita y Mariano. En el caso de Conchita quiero decirle que me siento muy afortunado de haberla tenido a mi lado, siempre dispuesta a ayudarme con todo tipo de dudas. Esta tesis nos ha dejado una buena amistad. En el caso de Mariano resulta complicado encontrar las palabras adecuadas. Todos los que hemos estado “bajo su mando” sabemos que el trabajo duro siempre tiene su recompensa. Es una persona admirable y única. De las que hacen que el mundo gire de una forma especial.

La tercera persona a la que quiero agradecer y que sin ella hubiera sido completamente imposible realizar este trabajo es Patricia Solano. Colega, compañera y, sobre todo, amiga. Gracias por tu paciencia y por hacer que esas largas mañanas y tardes en el laboratorio sean hoy un recuerdo agradable.

A Jose Antonio Alarcón y Judith Ríos por su total disponibilidad desde el primer día y por transmitir tantas ganas de investigar y aprender.

A Tito Silva por ser una eminencia que disfruta tomándose un café con un simple becario. Gracias por enseñarme a investigar y abrirme las puertas de tu laboratorio desde el primer día.

A las chicas del laboratorio por tener siempre una sonrisa y la mayor paciencia del mundo.

A mis amigos del master de Periodoncia de la Universidad Complutense por hacer que mi etapa como magíster y doctorando fuera inolvidable (Alfonso, Dani, Dino, Leo; Ali, Francisco, Isa; Echeve, Jorge, Sergio; Ana, Ignacio, Ramón; Ana, Lucas, Miguel; Nacho, Nicola y Simone).

A mis chicas del "gallinero" (María, Paula, Marta y Xiana) por tantos buenos momentos.

A mis hermanos de master, Fabio y Juan, por la amistad sin límite.

A mis hermanos de sangre, Romina y Guido, por hacerme sentir parte de ellos.

A mis padres, Marta y Eduardo, por dárme todo sin esperar nunca nada a cambio. Ahora os entiendo.

Y a Lucía y Cloe, lo mejor que me ha pasado en la vida.

Cambios bioquímicos del metabolismo óseo durante el movimiento ortodóncico

Índice

1. [Abreviaturas](#) (pag.1)
2. [Resumen en castellano](#) (pag.5)
3. [Resumen en inglés](#) (pag.11)
4. [Introducción](#) (pag.17)
 - 4.1. Aparato de inserción dental (pag.19)
 - 4.2. Estructura del hueso alveolar (pag.19)
 - 4.2.1. Descripción macroscópica (pag.20)
 - 4.2.1.1. Hueso fascicular, hueso lamelar, hueso trabecular (pag.20)
 - 4.2.2. Descripción microscópica (pag.21)
 - 4.2.2.1. Células (pag.21)
 - 4.2.2.2. Matriz ósea (pag.22)
 - 4.3. Remodelado óseo (pag.24)
 - 4.4. Movimiento ortodóncico (pag.28)
 - 4.4.1. Cambios macroscópicos (pag.28)
 - 4.4.2. Cambios microscópicos (pag.29)
 - 4.4.2.1. Métodos para identificar mediadores bioquímicos en el fluido crevicular (pag.30)
5. [Justificación, hipótesis y objetivos](#) (pag.35)
6. [Material y métodos. Resultados](#) (pag.39)
 - 6.1. Estudio 1 (pag.41)
 - 6.2. Estudio 2 (pag.53)
 - 6.3. Estudio 3 (pag.63)
7. [Discusión](#) (pag.71)
8. [Conclusiones](#) (pag.83)
9. [Bibliografía](#) (pag.87)

1. Abreviaturas

1. Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ALP: fosfatasa alcalina

ARN: ácido ribonucleico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

COL-I: colágeno tipo I

CT: calcitonina

ELISA: ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima

FGC: fluido gingival crevicular

IL-1: interleuquina 1

IL-6: interleuquina 6

INF- γ : interferón γ

M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos

μ g: microgramo

μ L: microlitro

OCIF: factor inhibidor de la osteoclastogénesis

OCN: osteocalcina

OPG: osteoprotegerina

PBS: buffer fosfato salino o tampón fosfato salino

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

pg: picogramo

RANK: receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$

RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$

TGF- α : factor de crecimiento transformante α

TGF- β : factor de crecimiento transformante β

TNF- α : factor de necrosis tumoral α

Tris-HCl: tris hidroximetil aminometano hidrocloreuro

2. Resumen en castellano

2. Resumen en castellano

Desde la primera biopsia de un diente al que se le aplicó una fuerza allá por el año 1901 (Meikle, 2006; Wöstmann et al., 2008), la comunidad científica, en concreto la odontológica, siempre se preguntó cómo podía moverse un diente a través del hueso alveolar. Hoy, más de 100 años después, seguimos sin saber con exactitud todos los factores que influyen en este proceso pero hacemos un esfuerzo por conocerlo cada vez más a fondo.

El entendimiento de los factores más influyentes en este remodelado óseo podría acarrear múltiples ventajas. Entre ellas destacaríamos un mayor control del movimiento ortodóncico, modificaciones en la velocidad del mismo, disminución del dolor, ejecución de movimientos fuera del alcance de la ortodoncia actual e incluso poder comprender y diferenciar las distintas técnicas ortodóncicas desde un punto de vista molecular.

Partiendo del conocimiento de la biología ósea y en base a estudios previos en el campo de la ortodoncia y biología molecular, la utilización de diferentes métodos de inmunodiagnóstico (searchlight, westren blot y citometría de flujo con Luminex) nos permitirán detectar la presencia de varios mediadores bioquímicos mediante la toma de muestras de fluido crevicular con puntas de papel.

La investigación se dividió en tres estudios.

Estudio I:

Objetivo: Evaluar la expresión del receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK), osteoprotegerina (OPG), osteopontina (OPN), y factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) en fluido gingival crevicular (GCF) de dientes sujetos a la acción de fuerzas ortodóncicas.

Material y Métodos: Estudio piloto clínico randomizado sobre 10 voluntarios sanos con diseño de boca partida. Se colocaron gomas elásticas de separación entre segundo premolar y primer molar, con el cuadrante contralateral como control. Las muestras de

GCF se recogieron en lado de presión y tensión previo a la colocación de las gomas de separación, a las 24 horas y a los 7 días de la colocación de las mismas. Los volúmenes de las muestras de GCF se midieron con un Periotron 8000 y se determinaron las concentraciones totales de proteínas. También se analizaron los niveles de RANK, OPG, OPN y TGF- β 1 con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima múltiple (ELISA múltiple).

Resultados: Las localizaciones control permanecieron sin cambios a lo largo del estudio. Por el contrario, la concentración de OPG disminuyó significativamente en el lado de presión a las 24 horas, y la cantidad de concentración de RANK se diferenció significativamente entre localizaciones control, presión y tensión a los 7 días. Los niveles absolutos de TGF- β 1 también se vieron incrementados significativamente en el lado de presión a los 7 días al compararlos con el lado de tensión.

Conclusión: El metabolismo óseo se ve afectado por la aplicación de fuerzas sobre los dientes por medio de gomas de separación. Se produce un incremento de la expresión de mediadores de la reabsorción ósea (RANK y TGF- β 1) y disminución en la expresión de mediadores de la formación ósea (OPG) en el lado de presión.

Estudio II:

Objetivos: Investigar por primera vez los niveles de calcitonina (CT) en fluido gingival crevicular (GCF), sus variaciones durante el movimiento ortodóncico temprano tanto en el lado de presión como en el de tensión, y su posible asociación con el dolor experimentado con este tratamiento.

Material y Métodos: Quince jóvenes (edad media: 12.6 años) con requerimiento de cierre de diastema entre incisivos centrales superiores. Recogimos GCF de los lados de presión y tensión del incisivo central superior derecho (experimental) y primer premolar (control), antes y después (1h, 24h, 7d, 15d) del inicio del tratamiento. Los niveles de calcitonina fueron determinados mediante western blot. La intensidad del dolor se midió mediante una escala analógica visual.

Resultados: Los niveles de calcitonina fueron mayores en el lado de presión respecto al control a los 7 días ($p = 0.014$). Comparaciones intragrupo mostraron un incremento de

CT entre 1h y 7d (680.81 ± 1672.60 pg/30s, $p = 0.010$) en el lado de presión. No se encontraron cambios significativos en el lado de tensión y control. Los niveles de calcitonina y la intensidad del dolor se asociaron inversamente durante el período desde las 24h a los 15d ($r = -0.54$, $p = 0.05$).

Conclusiones: Los niveles de CT en GCF aumentaron significativamente en el lado de presión al poco tiempo de aplicar fuerzas ortodóncicas. Estos cambios se asociaron inversamente con el dolor dental percibido por los pacientes durante el período comprendido entre 24h y 15d.

Estudio III:

Objetivo: Someter a prueba dos soluciones tampón para obtener un análisis fiable y reproducible de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN, OC), en fluido gingival crevicular (GCF) mediante citometría de flujo.

Material y Métodos: Se recogieron muestras de GCF de voluntarios sanos con puntas de papel (perio-paper) y se diluyeron en una solución tampón fosfato salina (PBS) o en otra solución tampón tris hidrocloreuro (Tris-HCl), con o sin la adición de inhibidores de proteasas (PI). Se llevó a cabo un inmunoensayo para citoquinas mediante citometría de flujo (Luminex Xmap²⁰⁰) generando curvas estándares.

Resultados: Las curvas estándares generadas con el uso de PBS demostraron mejores ajustes para niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , al compararlas con las correspondientes al uso de Tris-HCl ($p < 0.05$).

Conclusiones: El uso de la solución tampón PBS con la adición de inhibidores de proteasas proporcionó mediciones fiables de biomarcadores inflamatorios en muestras de GCF de voluntarios sanos.

3. Resumen en inglés

3. Resumen en inglés

Since the first biopsy of a tooth to which a force was applied back in 1901 (Meikle, 2006; Wöstmann et al, 2008), scientific community, specifically the dental one, always wondered how a tooth could move through alveolar bone. Today, over one hundred years later, we still do not know exactly all the factors that influence this process but we make an effort to gain a deeper and comprehensive knowledge.

The understanding of the most influential factors in this bone remodelling could give rise to many advantages. Among these, we would highlight a greater control of orthodontic movement, changes in its speed, decreased pain, execution of movements away from current orthodontics and even being able to understand and distinguish the different orthodontic treatments from a molecular standpoint.

Based on the knowledge about bone biology and on previous studies in the field of orthodontics and molecular biology, using different immunodiagnostic methods (searchlight, western blot and Luminex flow cytometry) would allow us to detect the presence of various biochemical mediators by sampling crevicular fluid with paper points.

The research was divided into three studies.

Study I:

Objective: To evaluate the expression of an activator of nuclear factor-kappa (RANK), osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN), and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in gingival crevicular fluid (GCF) of teeth subjected to orthodontic forces.

Materials and Methods: A randomized, pilot clinical trial including 10 healthy volunteers was conducted using a split-mouth design. Orthodontic elastic separators were placed between the second premolar and first molar, with the contralateral quadrant serving as a control. The GCF samples were collected from the tension and compression sites at baseline, 24 hours, and 7 days after the placement of separators. The GCF sample volumes were measured using a Periotron 8000, and total protein concentrations were

determined. Levels of RANK, OPG, OPN, and TGF- β 1 were also analyzed using a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: The control sites remained unchanged throughout the study. In contrast, the concentration of OPG significantly decreased at the compression site by 24 hours, and the amount and concentration of RANK differed significantly between the control, compression, and tension sites after 7 days. A significant increase in absolute TGF- β 1 levels was also detected at the compression site versus the control and tension sites after 7 days.

Conclusion: Bone metabolism is affected by application of force to the teeth by elastic separators. Both increased expression of bone resorptive mediators (eg, RANK and TGF- β 1) and decreased expression of a bone-forming mediator (eg, OPG) on the compression side were detected.

Study II:

Objectives: To investigate the previously unreported presence of calcitonin (CT) levels in gingival crevicular fluid (GCF), its variations during initial orthodontic tooth movement in both tension and compression sites, and its possible association with the experienced dental pain.

Material and methods: Fifteen children (mean age: 12.6 years) requiring orthodontic closure of the upper midline diastema were included. We collected GCF from the compression and tension sites of the upper right central incisor (experimental) and first bicuspid (control), before and after (1 h, 24 h, 7 d, 15 d) beginning of treatment. Calcitonin levels were determined by Western blot. Pain intensity was assessed using a visual analogue scale.

Results: Calcitonin levels were higher in the compression site versus the control site at 7 d ($p = 0.014$). Intragroup comparisons showed an increment of CT between 1 h and 7 d (680.81 ± 1672.60 pg/30 s, $p = 0.010$) in the compression site. No significant changes were found in the tension and control sites. Calcitonin levels and pain intensity were negatively associated during the period from 24 h to 15 d ($r = -0.54$, $p = 0.05$).

Conclusions: CT levels in the GCF significantly increased in the compression site after the short term after application of orthodontic forces. These changes were negatively associated with the perceived patient's dental pain during the period from 24 h to 15 d.

Study III:

Objective: the aim of this study was to test two buffer solutions in order to attain a reliable and reproducible analysis of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN and OC), in gingival crevicular fluid (GCF) by flow cytometry.

Material and methods: GCF samples from healthy volunteers were collected with perio paper strips and diluted either in phosphate buffered saline (PBS) or Tris-HCl buffer, with and without protease inhibitors (PI). Cytokine immunoassays were carried out by flow cytometry (Luminex Xmap 200) generating standard curves.

Results: standards curves generated with the use of phosphate-buffered saline (PBS) demonstrated best adjustment for cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, when using Tris-HCl ($p < 0.05$).

Conclusions: The use of PBS buffer with the addition of PI provided reliable measurements of inflammatory biomarkers in GCF samples of healthy volunteers.

4. Introducción

4. Introducción

4.1. Aparato de inserción dental

El aparato de inserción, también llamado periodonto, se caracteriza fundamentalmente por ser el encargado de unir los dientes a los maxilares. Consta de cuatro tejidos bien diferenciados: 1/ encía, 2/ ligamento periodontal, 3/ cemento radicular, 4/ hueso alveolar. Este último, a su vez consta de dos componentes; el hueso alveolar propiamente dicho o hueso fascicular y la apófisis alveolar que a su vez se divide en dos tipos de hueso, el cortical y el trabecular.

4.2. Estructura del hueso alveolar

El hueso alveolar, junto con el cemento y el ligamento periodontal, es responsable del sustento de los dientes en la mandíbula y en el hueso maxilar. A pesar de ser un tejido con muchas características comunes al resto de tejido óseo del cuerpo humano, el hueso alveolar tiene cualidades únicas relacionadas con la presencia de los dientes, su erupción y adaptación a las fuerzas masticatorias.

Este tejido está compuesto por tres tipos de hueso (J. L. Saffar, Lasfargues, & Cherruau, 1997). Dos de ellos son comunes al resto del cuerpo y son el hueso cortical y el trabecular. El tercero de ellos es característico del hueso alveolar y es el conocido como hueso fascicular.

Una de las características fundamentales del hueso alveolar es su capacidad adaptativa y de remodelado frente a las fuerzas oclusales naturales o, de forma artificial, frente a fuerzas ortodóncicas. Esto permite la movilidad de los dientes dentro de las estructuras

del hueso alveolar gracias a su capacidad de formación y destrucción como parte de su adaptación al sistema oclusal que le rodea.

La organización ultraestructural del hueso alveolar es mucho más compleja que la que podemos encontrar en los huesos largos con sus sistemas Haversianos y osteonas. La complejidad geométrica de las raíces dentales en el hueso alveolar y la respuesta de los tejidos a la masticación dan lugar a un complejo sistema de remodelación ósea distinto del clásico remodelado Haversiano (Kurihara & Enlow, 1980).

4.2. Estructura del hueso alveolar

4.2.1. Descripción macroscópica

4.2.1.1. Hueso fascicular, lamelar y trabecular

El hueso alveolar se divide en hueso alveolar propiamente dicho y el hueso de la apófisis alveolar (Lindhe, Karring, & Araujo, 2009). El primero de ellos se conoce también como hueso fascicular, fasciculado o bundle bone (término anglosajón) y es el tejido óseo que se encuentra rodeando a las raíces dentales y que se une con el hueso lamelar o cortical a nivel de la cresta alveolar. Es un hueso diente-dependiente. Esto quiere decir que desaparece con la pérdida dental (Araújo & Lindhe, 2005). En él se insertan los haces de fibras colágenas del ligamento periodontal denominadas fibras de Sharpey (Cate, 1997). Al estar perforado por múltiples conductos, no solo los de las fibras de Sharpey sino también los pertenecientes a vasos sanguíneos, vasos linfáticos y fibras nerviosas conocidos como conductos de Volkman, adquiere el nombre de placa cribiforme (Cate, 1997).

El hueso de la apófisis alveolar se divide a su vez en dos tipos de hueso, el lamelar y el trabecular. El hueso lamelar recibe su nombre por su estructura en láminas. También se conoce como hueso cortical y se caracteriza por su alta densidad. Recubre la parte vestibular y lingual/palatina de los procesos alveolares. Todo lo contrario ocurre con el tercer y último tipo de hueso, el trabecular o esponjoso; con una estructura mucho menos

densa. Se encuentra entre el hueso fascicular y el lamelar, ocupando la mayor parte de los tabiques interdentes. Como su nombre indica, está lleno de trabéculas óseas con una disposición determinada no solo genéticamente sino también por las fuerzas a las cuales están expuestos los dientes (Lindhe et al., 2009); ya sean masticatorias o de otra índole como puede ser el tratamiento ortodóncico.

4.2. Estructura del hueso alveolar

4.2.2. Descripción microscópica

4.2.2.1. Células

Células osteogénicas

Los **osteoblastos** son las células con mayor capacidad secretora del hueso y son las responsables de la producción de la matriz ósea orgánica (Sodek & McKee, 2000).

Son células de origen mesenquimal y se consideran post-mitóticas cuando están completamente diferenciadas y con capacidad secretora.

La matriz orgánica principal que secretan estas células es colágeno tipo I; aunque también producen proteínas no colágenas y diferentes proteínas plasmáticas (Heinegård, Hulténby, Oldberg, Reinholt, & Wendel, 1989)

Los **osteocitos** son osteoblastos maduros que han quedado rodeados por la matriz ósea y que ocupan un espacio llamado laguna osteocítica. Este sistema puede mineralizarse o seguir formando parte de la estructura osteoide. Son células más pequeñas que los osteoblastos con menor cantidad de organelas secretoras (Martin, Romas, & Gillespie, 1998).

Existe una estructura canalicular entre los osteocitos con proyecciones citoplasmáticas de los mismos que permite la interacción entre ellos y la presencia de gran cantidad de procesos celulares. Además favorece la comunicación entre osteoblastos y células óseas superficiales o de revestimiento (Palumbo, 1986; Palumbo, Palazzini, & Marotti, 1990).

Las **células óseas superficiales o de revestimiento** son osteoblastos maduros que no quedaron rodeados por la matriz ósea sino que se posicionaron en la superficie y que sufrieron un cambio morfológico y funcional con la disminución de la secreción de proteínas (Menton, Simmons, Chang, & Orr, 1984; Miller, Bowman, Smith, & Jee, 1980).

Un gran porcentaje de la superficie ósea está cubierta por este tipo de células que forman una lámina continua y aplanada que juega un papel importante en la compartimentación de la matriz ósea, en el metabolismo del calcio y fosfato, y en los inicios de eventos que favorecen el remodelado óseo (Matthews, Wiel, & Talmage, 1978; Miller & Jee, 1987).

Células osteoclásticas

La capacidad de adaptación del hueso a las demandas funcionales viene dada tanto por la formación ósea como por la reabsorción del mismo. De esto último se encargan unas células gigantes multinucleadas denominadas **osteoclastos**. Son capaces de degradar la matriz ósea mineralizada por medio de la liberación de sustancias ácidas que disuelven las sales minerales. Las sustancias orgánicas remanentes son eliminadas por enzimas y la fagocitosis osteoclástica.

4.2. Estructura del hueso alveolar

4.2.2. Descripción microscópica

4.2.2.2. Matriz ósea

La matriz extracelular del hueso alveolar parece ser similar a la de otros tejidos óseos desde un punto de vista inmunohistoquímico, a pesar de las características especiales que presenta el hueso alveolar respecto al resto de tejido óseo de nuestro cuerpo (Sodek & McKee, 2000).

La matriz ósea está formada básicamente por un entrelazado de fibras colágenas entre pequeños cristales uniformes de hidroxapatita y diferentes proteínas no colágenas. El

componente inorgánico representa las dos terceras partes de la matriz ósea (Sodek & McKee, 2000). Actúa como andamiaje para el depósito de cristales de apatita y el acúmulo de proteoglicanos, proteínas plasmáticas y demás proteínas no colágenas (Sodek & McKee, 2000).

Colágeno:

Representa la mayor parte del componente orgánico del hueso mineralizado (80-90%). El colágeno tipo I es el mayoritario (>95%) y, junto con el tipo V (<5%), proporcionan la integridad estructural del tejido conectivo (Sodek & McKee, 2000).

En el hueso inmaduro o de reparación, las fibras colágenas están más separadas permitiendo la existencia de un considerable espacio interfibrilar ocupado por cristales minerales y proteínas ácidas asociadas.

En el caso de encontrarnos ante un hueso maduro, las fibras colágenas están más organizadas en capas perpendiculares entre unas y otras con muy poco espacio interfibrilar (Sodek & McKee, 2000).

Proteínas no colágenas:

Entre las proteínas existentes hay algunas típicas de tejidos mineralizados, como la osteocalcina y sialoproteína ósea; mientras que otras tienen una distribución más general, como la osteonectina y osteopontina (Sodek & McKee, 2000).

Hay otras proteínas que se encuentran en formas específicamente modificadas como es el caso de ciertos proteoglicanos, fundamentalmente condroitín sulfato (Fisher, McBride, Termine, & Young, 1990). Estos proteoglicanos están generalmente asociados a la matriz colágena.

También podemos encontrar proteínas derivadas de la sangre debido a la afinidad por los cristales minerales. Entre ellas destacan la albúmina, glicoproteínas e inmunoglobulinas (Sodek & McKee, 2000).

4.3. Remodelado óseo

El hueso alveolar sufre un constante remodelado fisiológico. Con la dentición primaria se reabsorbe por completo junto a las raíces de los dientes deciduos. Acto seguido se volverá a formar nuevo hueso alveolar para albergar las raíces de los dientes definitivos. Durante este proceso no solo se forma y destruye hueso sino que también se remodela para adaptarse a la posición de los dientes y a la respuesta a las fuerzas masticatorias (Sodek, 1977).

Estos procesos requieren, a grandes rasgos, la coordinación de dos tipos de linajes celulares, los osteoblastos y osteoclastos, encargados de formar y destruir el tejido conectivo del hueso mineralizado.

Existe un amplio conocimiento de la cinética del remodelado óseo a nivel celular. Sin embargo, la regulación de este proceso a nivel molecular sigue sin estar totalmente claro. Existen infinidad de mediadores bioquímicos que influyen en una y otra dirección del remodelado óseo (Tabla 1); incluso hay moléculas que influyen en ambas direcciones. Descifrar toda la cascada de eventos que ocurren antes de la formación y/o destrucción ósea resulta tremendamente complejo.

La **formación ósea** está directamente relacionada con la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales en osteoblastos. Este proceso de diferenciación celular está controlado por varias hormonas y citoquinas que no solo favorecen la proliferación y diferenciación de osteoblastos sino también su activación. Es importante tener en cuenta que muchos de estos factores intervienen también en la reabsorción ósea, directa o indirectamente (Sodek & McKee, 2000).

Las citoquinas son proteínas de bajo peso molecular producidas por células que regulan o modifican la acción de otras células de manera autocrina (actuando sobre la célula de origen) o paracrina (actuando sobre células adyacentes) (Meikle, 2006). En el grupo de citoquinas podemos encontrar interleuquinas, factores de necrosis tumoral, interferones, factores de crecimiento y factores de estimulación de colonias. Las citoquinas pueden favorecer la formación ósea induciendo la diferenciación de osteoblastos a partir de

células mesenquimales precursoras (Hughes, Turner, Belibasakis, & Martuscelli, 2006; Masella & Meister, 2006; Meikle, 2006; Takayanagi, 2005; Wise & King, 2008). Una vez diferenciados, los osteoblastos producen proteínas como el colágeno tipo I (COL-I), osteocalcina (OCN) y fosfatasa alcalina (ALP); normalmente interpretados como marcadores de la formación ósea (Hannon & Eastell, 2006). COL-I es el principal colágeno en el hueso mineralizado (>95%), mientras que la OCN es la proteína no colágena más abundante en la matriz ósea. Se expresa casi exclusivamente por osteoblastos altamente diferenciados. En algunas ocasiones, al contrario de lo dicho anteriormente, se ha identificado como marcador de destrucción ósea al haberse aislado en urea, entendiéndose como producto de la degradación de la matriz ósea (Ivaska et al., 2004). Por tanto es mejor pensar en OCN como un factor de remodelado óseo más que como un marcador de formación ósea (Hannon & Eastell, 2006). ALP es una enzima osteoblástica. Su función no es bien conocida pero se piensa que participa en la mineralización ósea, por lo que se puede interpretar como un marcador de formación ósea (McKee et al., 2013).

La formación ósea no solo se favorece por medio de la proliferación y diferenciación de células madre mesenquimales en osteoblastos, sino también por medio del control y limitación de la reabsorción ósea. La calcitonina (CT) es un ejemplo de ello. Esta hormona es un péptido de 32 aminoácidos secretada principalmente por las células C del tiroides. Entre las principales acciones reconocidas de la CT están la inhibición de la reabsorción ósea, disminución de la reabsorción tubular del calcio y regulación de la producción de 1,25-dihidroxitamina D₃ en el riñón (de Paula & Rosen, 2010; Qin & Yang, 2008; A. G. Turner et al., 2011). Otra característica de la CT que la hace interesante es su efecto analgésico a nivel óseo, descrito en diferentes estudios (Karsdal, Henriksen, Arnold, & Christiansen, 2008; Ofluoglu, Akyuz, Unay, & Kayhan, 2007). El mecanismo por el que se produce este efecto no se conoce pero entre las hipótesis destacan fundamentalmente tres: 1/ inhibición de la síntesis de prostaglandina E₂ y tromboxano (Ofluoglu et al., 2007; Qin, Cai, Xu, & Gong, 2009); 2/ estimulación de la liberación de β -endorfinas al plasma, que reducen el dolor óseo durante un periodo corto de tiempo (Knopp-Sihota, Newburn-Cook, Homik, Cummings, & Voaklander, 2012; Ofluoglu et al., 2007; Qin et al., 2009); 3/

acción directa de la CT a nivel del sistema nervioso central (Karsdal et al., 2008; Knopp-Sihota et al., 2012; Visser & Kwei, 2006).

En el caso de la **reabsorción ósea**, son los osteoclastos las células responsables. En este caso son formadas por el linaje monocito/macrófago de células hematopoyéticas derivadas de la médula ósea. Esta reabsorción ósea por medio de osteoclastos puede verse estimulada por la hormona paratiroidea, interleuquina 1 (IL-1), interleuquina 6 (IL-6), factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y factor de crecimiento transformante α (TGF- α); mientras que la calcitonina (CT), factor de crecimiento transformante β (TGF- β), estrógeno e interferón γ (INF- γ) inhiben la reabsorción osteoclástica (Reddy & Roodman, 1998; Sodek & McKee, 2000).

Todo tiene que estar en perfecto equilibrio para que el hueso alveolar se mantenga en correctas condiciones.

Entre la multitud de investigaciones relacionadas con el remodelado óseo (formación y destrucción ósea), es el sistema OPG/RANK/RANKL el que mayor interés ha demostrado tener en los últimos años entre los investigadores.

La osteoprotegerina (OPG), también conocida como factor inhibidor de la osteoclastogénesis (OCIF: osteoclastogenesis inhibitory factor), es una molécula secretada por los osteoblastos y funciona bloqueando la formación de osteoclastos y reabsorción ósea (Khosla, 2001; Masella & Meister, 2006; Meikle, 2006). De hecho, se demostró el desarrollo de osteoporosis severa en ratones manipulados genéticamente bloqueando el gen de la OPG (ratón knockout para OPG o ratón KO para OPG) (Bucay et al., 1998; Mizuno et al., 1998).

El ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), es una proteína que puede encontrarse en dos formas; unida a la membrana de pre-osteoblastos o de forma soluble. Su principal función es la diferenciación y activación de osteoclastos; aunque también está relacionada con su apoptosis (Khosla, 2001). En un estudio con ratones knockout para RANKL, se demostró el desarrollo de una osteopetrosis severa y ausencia completa de osteoclastos (Kong et al., 1999).

El receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK) es expresado fundamentalmente por células del linaje macrófago/monocito, incluyendo células pre-osteoclásticas, células

B y T, células dendríticas y fibroblastos (Khosla, 2001). Una vez más, un estudio con ratones knockout para RANK demostró el desarrollo de osteopetrosis severa en los especímenes analizados (Li et al., 2000).

RANKL, expresado en la superficie de células pre-osteoblásticas o en su forma soluble, se une a RANK, presente en la superficie de células pre-osteoclasticas, favoreciendo el desarrollo, diferenciación y activación de osteoclastos. En resumen, favoreciendo la reabsorción ósea (Hannon & Eastell, 2006; Khosla, 2001; Masella & Meister, 2006; Meikle, 2006; Takayanagi, 2005; Wise & King, 2008). Diferentes citoquinas, como TNF- α e IL-1, modulan este sistema básicamente estimulando la producción del factor estimulador de colonias de macrófagos (M-CSF: macrophage-colony stimulating factor) que aumenta la cantidad de células pre-osteoclasticas (Hofbauer et al., 1999). Además hay otras hormonas y citoquinas que juegan un importante papel en la modulación de este sistema, como el factor de crecimiento transformante β (TGF- β : transforming growth factor β) y la osteopontina (OPN). El TGF- β aumenta la producción de OPG (Takai et al., 1998), pero también se ha postulado la posibilidad de estimular la expresión de RANKL a través de células pre-osteoclasticas, aumentando la sensibilidad de los osteoclastos a RANKL (Yan, Riggs, Boyle, & Khosla, 2001). TGF- β normalmente se describe como un factor que inhibe el reclutamiento de precursores de osteoclastos y promueve la supresión de la actividad de los osteoclastos (Brady et al., 1998; K. Janssens, Dijke, Janssens, & Van Hul, 2005; R. A. Kanaan & Kanaan, 2006). Pero algunos autores sugieren que también puede estar relacionado con la reabsorción ósea (Itonaga et al., 2004; Pilkington, Sims, & Dixon, 2001). La osteopontina está relacionada con la reabsorción ósea por medio del incremento en la adhesión de los osteoclastos a la matriz ósea (Reinholt, Hultenby, Oldberg, & Heinegård, 1990). Para confirmar su papel, en ratones knockout para OPN se demostró una disminución en la reabsorción ósea (Ishijima et al., 2002).

Fig. 1: Resumen de los mediadores bioquímicos relacionados con la formación y destrucción ósea

relacionado con formación ósea	relacionado con destrucción ósea	relacionado con ambos procesos
ALP	IL-1	OC (+)
CT	IL-6	TGF- β
estrógeno	TNF- α	
INF- γ	TGF- α	
OPG	RANK	
	RANKL	
	M-CSF	
	OPN	

(+): generalmente asociado con formación ósea; ALP: fosfatasa alcalina; CT: calcitonina; INF- γ : interferón γ ; OPG: osteoprotegerina; IL-1: interleuquina 1; IL-6: interleuquina 6; TNF- α : factor de necrosis tumoral α ; TGF- α : factor de necrosis transformante α ; RANK: receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$; RANKL: ligando de receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$; M-CSF: factor estimulador de colonias de macrófagos; OPN: osteopontina; TGF- β : factor de crecimiento transformante β .

4.4. Movimiento ortodóncico

4.4.1. Cambios macroscópicos

El movimiento ortodóncico se basa en el remodelado del hueso alveolar como respuesta a la aplicación de fuerzas mecánicas sobre los dientes y, como consecuencia, sobre el ligamento periodontal (Masella & Meister, 2006; Meikle, 2006; Wise & King, 2008). El primer estudio histológico que sentó las bases de nuestro entendimiento actual sobre el movimiento dental ortodóncico fue llevado a cabo por el odontólogo sueco Carl Sandstedt, en Estocolmo. Sus resultados se publicaron en 1901 en sueco por lo que tardaron en hacerse visibles para el resto del mundo (Wöstmann, Rehmann, Trost, & Balkenhol, 2008). En el lado de presión los osteoclastos lideran la reabsorción del hueso

alveolar mientras que en el lado de tensión son los osteoblastos los principales encargados de la regeneración ósea.

El movimiento ortodóncico se divide en tres etapas o estadios (Wise & King, 2008): el primero es un movimiento prácticamente instantáneo (van Driel, van Leeuwen, den Hoff, Maltha, & Kuijpers-Jagtman, 2000); el segundo es un estadio en el que prácticamente no se produce movimiento pero en el que se están dando lugar todos los procesos bioquímicos que favorecen el tercer estadio; por último se produce el movimiento lineal del diente.

La aplicación de fuerzas ortodóncicas crea de forma inmediata dos áreas totalmente opuestas en el ligamento periodontal, el área de compresión y el área de tensión. La transmisión de estas fuerzas a las células produce una reacción biológica clasificada por muchos autores como una respuesta inflamatoria aséptica, basada en la presencia de diferentes citoquinas inflamatorias en ausencia de patología (Meikle, 2006).

4.4. Movimiento ortodóncico

4.4.2. Cambios microscópicos

Este proceso biológico acontece con respuestas opuestas a cada lado del diente, produciéndose reabsorción ósea en el lado de compresión y aposición ósea en el lado de tensión (Masella & Meister, 2006; Meikle, 2006; Wise & King, 2008). Esto parece muy simple pero se vuelve tremendamente complicado a nivel molecular dado el número tan elevado de factores que influyen; algunos conocidos y otros muchos aún por descubrir. Desde el primer estudio en ratones hace ya casi 40 años (Hong, Polsky-Cynkin, & Levine, 1976), muchas investigaciones intentaron aumentar el conocimiento de los patrones moleculares involucrados en el movimiento ortodóncico; no solo en animales (Alhashimi, Frithiof, Brudvik, & Bakhiet, 2001; Dunn, Park, Kostenuik, Kapila, & Giannobile, 2007; Fujihara et al., 2006; Kim, Handa, Iida, & Yoshida, 2007; Kuroda, Balam, Sakai, Tamamura, & Takano-Yamamoto, 2005; Morinobu et al., 2003; Terai et al., 1999) sino también en

seres humanos, tanto en estudios *in vitro* (Kanzaki, Chiba, Sato, et al., 2006b; Lee, Park, Yu, Choi, & Yoo, 2004; Maeda et al., 2007; Nakao et al., 2007; Nishijima et al., 2006) como *in vivo* (Bister & Meikle, 2013; Dudic, Kiliaridis, Mombelli, & Giannopoulou, 2006; T. P. Garlet, Coelho, Silva, & Garlet, 2007; Griffiths, Moulson, Petrie, & James, 1998; Isik, Sayinsu, Arun, & Unlüçerçi, 2005; Kawasaki, Takahashi, Yamaguchi, & Kasai, 2006; Lee et al., 2004; Perinetti et al., 2003; 2002; 2005; Ren & Vissink, 2008; Ren, Hazemeijer, de Haan, Qu, & de Vos, 2007; Ren et al., 2002; Toygar, Kircelli, Bulut, Sezgin, & Tasdelen, 2008; Tzannetou, Efstratiadis, Nicolay, Grbic, & Lamster, 1999; Uematsu, Mogi, & Deguchi, 1996; Yamaguchi, Yoshii, & Kasai, 2006).

4.4. Movimiento ortodónico

4.4.2. Cambios microscópicos

4.4.2.1. Métodos para identificar mediadores bioquímicos en el fluido crevicular

Una de las posibilidades que existen a la hora de evaluar los cambios bioquímicos que se producen durante el movimiento ortodónico es mediante el análisis del fluido gingival crevicular (FGC). Entre sus ventajas destacan la simplicidad y lo poco cruenta que resulta ser su recogida. Otro factor a favor de su análisis es el hecho de haberse utilizado en muchos estudios previos (Ren & Vissink, 2008) por lo que la técnica de sustracción, medición y análisis está cada vez más depurada.

El estudio del FGC nos permite evaluar no solo el lado de compresión donde se destruye hueso mediante terapia ortodónica (Griffiths et al., 1998; Kawasaki et al., 2006; Lee et al., 2004; Ren et al., 2007; Toygar et al., 2008; Uematsu et al., 1996) sino también los dos lados, compresión y tensión, al mismo tiempo (Cantarella et al., 2006; Dudic et al., 2006; Isik et al., 2005; Perinetti et al., 2002; 2005; Tzannetou et al., 1999). Incluso nos permite medir la misma localización en diferentes momentos del movimiento ortodónico, cosa imposible de hacer en estudios donde el análisis que se hace es por medio de biopsias.

Esta otra opción tiene la ventaja de poder medir marcadores moleculares a nivel genético, normalmente el ARNm (ácido ribonucleico mensajero) (T. P. Garlet et al., 2007). Por el contrario, las desventajas son importantes; fundamentalmente la dificultad técnica y el hecho de ser un procedimiento cruento.

Existen multitud de métodos para la identificación de mediadores bioquímicos. Básicamente se podrían dividir en dos grandes grupos. El primero de ellos englobaría a los análisis de cadenas de aminoácidos, fundamentalmente proteínas, enzimas, citoquinas, hormonas, etcétera. El segundo grupo sería el de análisis de ácidos nucleicos, entre los que destacan las sondas (sondas de ADN, sondas de ARN, sondas de oligonucleótidos) y la PCR (reacción en cadena de la polimerasa). Este tipo de análisis pretende encontrar marcadores a nivel de un determinado gen, ya sea por medio del ácido desoxiribonucleico (ADN) o por el ácido ribonucleico (ARN). Por tanto, con este tipo de análisis no estaríamos midiendo el resultado de la expresión de un gen, como podría ser una determinada proteína, sino la posibilidad de una hipotética expresión.

En resumen, si se pretende medir el resultado de la expresión de un determinado gen entendido como mediador bioquímico, necesitaremos utilizar métodos que permitan la detección de cadenas de aminoácidos, es decir, péptidos o proteínas. Para ello tenemos los métodos de inmunodiagnóstico como la inmunofluorescencia directa, inmunofluorescencia indirecta, western blot, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima), citometría de flujo, entre otros.

En nuestra serie de artículos hemos utilizado tres métodos diagnósticos, uno diferente para cada estudio. En dos de ellos, el primero y el tercero, nos decantamos por métodos más innovadores y revolucionarios pero con el inconveniente de estar menos testados. Estos son el Searchlight y la citometría de flujo con Luminex. Dos métodos similares en cierto modo al ELISA pero que permiten medir varias moléculas al mismo tiempo pertenecientes a una única muestra. El tercer método diagnóstico utilizado fue el western blot. Una tecnología muy testada, con largo recorrido y exquisitamente depurada en la actualidad pero con la que nunca se había medido antes calcitonina perteneciente a fluido gingival crevicular.

La tecnología Searchlight es un array de proteínas en fase sólida que se basa en el principio del ELISA sandwich en el que se pueden llegar a analizar hasta 16 proteínas distintas en una placa de 96 pocillos. Es una técnica sencilla donde las muestras y los estándares son añadidos en los pocillos y las proteínas que hay en la muestra se unen al anticuerpo apropiado. Seguidamente se realiza un lavado y luego se añade un cóctel de anticuerpos biotinilados, los cuales reconocen las proteínas de interés. Después de una incubación se lava nuevamente y se añade un conjugado de streptavidina (streptavidin-horseradish peroxidase, SA-HRP). Finalmente se añade un sustrato (SuperSignal ELISA Femto Chemiluminescent Substrate) y se lee la placa en un lector específico (CCD Instrument). El resultado de la lectura es una imagen en la que se obtienen varios spots los cuales emiten una intensidad de luz (quimioluminiscencia). Los valores para cada proteína son identificados basándose en la posición de los spots (viene dado por el protocolo) de cada anticuerpo dentro del pocillo (Bastarache et al., 2011; Moskowitz et al., 2012).

El sistema Luminex también es un array de proteínas, pero en fase líquida ya que se trabaja en un medio líquido donde los anticuerpos están unidos a unas microesferas. Se basa también en el principio del ELISA sandwich pero en vez de detectar quimioluminiscencia se detecta fluorescencia (duPont, Wang, Wadhwa, Culhane, & Nelson, 2005; Elshal & McCoy, 2006; Nolan & Mandy, 2006). Principalmente se fundamenta en tres puntos:

- Utiliza microesferas que tienen un color específico interno, que va desde el verde al rojo. Se han definido 100 colores para permitir la detección de diferentes analitos.
- Después de que el analito presente en la muestra es capturado por la microesfera específica, se introduce un anticuerpo marcado con biotina. La reacción se incuba con Streptavidina- ficoeritrina (L-SAPE) para completar la reacción en la superficie de cada microesfera.
- Por último, las microesferas pasan rápidamente a través de un láser, el cuál excita el color interno, identificando así la microesfera. Un Segundo láser excita la ficoeritrina, obteniendo así la fluorescencia media. Ésta es convertida en concentración utilizando los resultados de la curva estándar de cada analito.

Las ventajas de usar sistemas de detección múltiple son claros: ahorro de tiempo y esfuerzo, menor cantidad de muestra necesaria, menor cantidad de material de detección necesario con el consecuente ahorro económico (Bastarache et al., 2011; duPont et al., 2005; Elshal & McCoy, 2006; Moskowitz et al., 2012). Pero no todo son ventajas. Se han dado casos de reacciones cruzadas o diferencias en los niveles de detección al compararlos con el ELISA que es el "gold standard" (Bastarache et al., 2011; Moskowitz et al., 2012). Son métodos basados en kits de un número determinado de moléculas a estudiar. La razón de estos kits es que no se pueden combinar las moléculas objeto de estudio a nuestro gusto sino que tienen que hacerse múltiples comprobaciones y puestas a punto para poder englobar varios diagnósticos dentro de un mismo kit.

El tercer y último método utilizado en esta serie de estudios fue el western blot. Se utiliza en investigación para separar y detectar proteínas. Esto se basa en una primera separación de las proteínas en base a su peso molecular por medio de un gel de electroforesis. Estos resultados se transfieren a una membrana produciendo una banda para cada proteína. La membrana se incuba con anticuerpos marcados y específicos para la proteína de interés. Los anticuerpos que no se han unido a nada se lavan y eliminan dejando solo aquellos unidos a las proteínas de interés. Como los anticuerpos se unen únicamente a la proteína de interés, entonces se verá únicamente una banda. El grosor de la banda corresponde a la cantidad de proteínas presentes; así, gracias a un estándar protocolizado podemos saber la cantidad de proteína presente (Mahmood & Yang, 2012).

5. Justificación, hipótesis y objetivos

5. Justificación, hipótesis y objetivos

5.1. Justificación

Es necesario conocer los mediadores bioquímicos que hacen posible el movimiento del diente a través del hueso alveolar gracias a las fuerzas ortodóncicas. Desde la primera biopsia de un diente al que se le aplicó una fuerza allá por el año 1901 (Meikle, 2006; Wöstmann et al., 2008), la comunidad científica, en concreto la odontológica, siempre se preguntó cómo podía moverse un diente a través del hueso alveolar. Hoy, más de 100 años después, seguimos sin saber con exactitud todos los factores que influyen en este proceso pero hacemos un esfuerzo por conocerlo cada vez más a fondo.

El entendimiento de los factores más influyentes en este remodelado óseo podría acarrear múltiples ventajas. Entre ellas destacaríamos un mayor control del movimiento ortodóncico, modificaciones en la velocidad del mismo, disminución del dolor, ejecución de movimientos fuera del alcance de la ortodoncia actual e incluso poder comprender y diferenciar las distintas técnicas ortodóncicas desde un punto de vista molecular.

5.2. Hipótesis

Partiendo del conocimiento de la biología ósea y en base a estudios previos en el campo de la ortodoncia y biología molecular, la utilización de diferentes métodos de inmunodiagnóstico (searchlight, westren blot y citometría de flujo con Luminex) nos permitirán detectar la presencia de varios mediadores bioquímicos mediante la toma de muestras de fluido crevicular con puntas de papel.

5.3. Objetivos

Los objetivos del presente trabajo fueron:

1/Evaluar la expresión de ciertos marcadores bioquímicos en el fluido crevicular: RANK, OPG, OPN, TGF- β 1, TNF- α , CT, IL-1 β , IL-6, OC.

2/ Evaluar la expresión de RANK, OPG, OPN y TGF- β 1 en el fluido crevicular del lado de presión y de tensión durante el movimiento ortodóncico inicial.

3/ Validar una técnica no utilizada hasta el momento en ortodoncia para medir varios mediadores bioquímicos al mismo tiempo pertenecientes a una misma muestra (Searchlight).

4/ Evaluar la presencia de calcitonina en el fluido crevicular del lado de presión y de tensión durante el movimiento ortodóncico inicial.

5/ Evaluar la relación entre los niveles de calcitonina detectados en el FGC y la percepción de dolor por parte del paciente durante el movimiento ortodóncico.

6/ Evaluar la utilización de dos soluciones buffer diferentes para la detección de varias citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN, OC) al mismo tiempo en fluido crevicular mediante técnica de citometría de flujo con Luminex.

6. Material y métodos. Resultados

Estudio I

6.1. Estudio I

“Marcadores bioquímicos del metabolismo óseo en fluido gingival crevicular durante el movimiento ortodóncico temprano”

Resumen

Objetivo: Evaluar la expresión del receptor activador para el factor nuclear $\kappa\beta$ (RANK), osteoprotegerina (OPG), osteopontina (OPN), y factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) en fluido gingival crevicular (GCF) de dientes sujetos a la acción de fuerzas ortodóncicas.

Material y Métodos: Estudio piloto clínico randomizado sobre 10 voluntarios sanos con diseño de boca partida. Se colocaron gomas elásticas de separación entre segundo premolar y primer molar, con el cuadrante contralateral como control. Las muestras de GCF se recogieron en lado de presión y tensión previo a la colocación de las gomas de separación, a las 24 horas y a los 7 días de la colocación de las mismas. Los volúmenes de las muestras de GCF se midieron con un Periotron 8000 y se determinaron las concentraciones totales de proteínas. También se analizaron los niveles de RANK, OPG, OPN y TGF- $\beta 1$ con un ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima múltiple (ELISA múltiple).

Resultados: Las localizaciones control permanecieron sin cambios a lo largo del estudio. Por el contrario, la concentración de OPG disminuyó significativamente en el lado de presión a las 24 horas, y la cantidad de concentración de RANK se diferenció significativamente entre localizaciones control, presión y tensión a los 7 días. Los niveles absolutos de TGF- $\beta 1$ también se vieron incrementados significativamente en el lado de presión a los 7 días al compararlos con el lado de tensión.

Conclusión: El metabolismo óseo se ve afectado por la aplicación de fuerzas sobre los dientes por medio de gomas de separación. Se produce un incremento de la expresión de mediadores de la reabsorción ósea (RANK y TGF- $\beta 1$) y disminución en la expresión de

mediadores de la formación ósea (OPG) en el lado de presión.

Biochemical markers of bone metabolism in gingival crevicular fluid during early orthodontic tooth movement

German Barbieri^a; Patricia Solano^b; Jose Antonio Alarcón^c; Rolando Vernal^{d,e}; Judith Rios-Lugo^e; Mariano Sanz^f; Conchita Martín^g

ABSTRACT

Objective: To evaluate the expression of an activator of nuclear factor-kappa (RANK), osteoprotegerin (OPG), osteopontin (OPN), and transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) in gingival crevicular fluid (GCF) of teeth subjected to orthodontic forces.

Materials and Methods: A randomized, pilot clinical trial including 10 healthy volunteers was conducted using a split-mouth design. Orthodontic elastic separators were placed between the second premolar and first molar, with the contralateral quadrant serving as a control. The GCF samples were collected from the tension and compression sites at baseline, 24 hours, and 7 days after the placement of separators. The GCF sample volumes were measured using a Periotron 8000, and total protein concentrations were determined. Levels of RANK, OPG, OPN, and TGF- β 1 were also analyzed using a multiplex enzyme-linked immunosorbent assay.

Results: The control sites remained unchanged throughout the study. In contrast, the concentration of OPG significantly decreased at the compression site by 24 hours, and the amount and concentration of RANK differed significantly between the control, compression, and tension sites after 7 days. A significant increase in absolute TGF- β 1 levels was also detected at the compression site versus the control and tension sites after 7 days.

Conclusion: Bone metabolism is affected by application of force to the teeth by elastic separators. Both increased expression of bone resorptive mediators (eg, RANK and TGF- β 1) and decreased expression of a bone-forming mediator (eg, OPG) on the compression side were detected. (*Angle Orthod.* 2013;83:63–69.)

KEY WORDS: Bone metabolism marker; Orthodontic movement; Gingival crevicular fluid

^a Instructor, Department of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain.

^b Research Fellow, Department of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain.

^c Associate Professor, Department of Orthodontics, Faculty of Odontology, University of Granada.

^d Associate Professor, Periodontal Biology Laboratory, Faculty of Odontology, University of Chile, Santiago, Chile.

^e Research Scientist, Department of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense, Madrid, Spain.

^f Professor, Department of Surgery and Oral Medicine, Faculty of Odontology, University Complutense, ETEP Research Group, Madrid, Spain.

^g Associate Professor, Department of Orthodontics, Faculty of Odontology, University Complutense, ETEP Research Group, Madrid, Spain.

Corresponding author: Dr Conchita Martín, Department of Orthodontics, Facultad de Odontología, University Complutense, Madrid, Spain
(e-mail: conchitamartin@odon.ucm.es)

Accepted: April 2012. Submitted: February 2012.

Published Online: June 18, 2012

© 2013 by The EH Angle Education and Research Foundation, Inc.

INTRODUCTION

It has been hypothesized that periodontal ligament (PDL) cells that are stimulated by orthodontic forces produce local factors that participate in the maintenance and remodeling of the ligament and that affect the metabolism of the adjacent alveolar bone.¹ Using both in vivo^{2–5} and in vitro^{6,7} studies, investigators have tried to elucidate the molecular patterns associated with orthodontic tooth movements in animals and humans. As a result, signaling pathways responsible for bone resorption and bone formation have recently been elucidated. Three novel members of the tumor necrosis factor (TNF) ligand and receptor superfamilies, including the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), the receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK), and osteoprotegerin (OPG), have been found to play key roles in the modulation of bone resorptive processes. These processes involve differentiation, activation, and function of osteoclasts, with interactions between RANKL

Table 1. Mean Values for Receptor Activator of Nuclear Factor-kB (RANK) of the Control Sites and Tension/Compression Sites at Different Time Points: Intragroup and Control versus Tension/Compression Site Comparisons^a

	RANK															
	CG Buccal Baseline (1)		CG Lingual Baseline (2)		TG Tension 24 h (3)		TG Compression 24 h (4)		CG Buccal 7 d (5)		CG Lingual 7 d (6)		TG Tension 7 d (7)		TG Compression 7 d (8)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
pg	3.32	3.74	1.66	3.52	2.7	4.02	3.72	4.35	1.44	2.36	2.58	3.55	6.02	7.78	3.6	6.07
pg/μl	9.94	13.95	5.46	12.11	7.06	10.46	6.58	7.22	6.87	16.31	6.6	9.42	15.17	17.45	4.75	7.65
pg/μg	4.52	5.58	0.52	1.64	3.13	4.61	1.28	2.78	0.32	1.02	0.26	0.82	8.73	17.42	1.14	2.71

^a CG indicates control group; TG, test group; RANK, receptor activator of nuclear factor-kappa.

* $P \leq .05$.

and RANK (a receptor on the cell surface of osteoclasts and osteoclast precursors) leading to stimulation of proliferation and inhibition of apoptosis. Moreover, OPG is another receptor produced by osteoblasts that can inhibit RANKL/RANK interactions and modify the effects of RANKL.

Various cytokines, such as transforming growth factor- β (TGF- β) and interleukin-1 (IL-1), can also modulate bone metabolism by stimulating macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) production. As a result, the number of pre-osteoclastic cells increases and RANKL expression is enhanced.⁸ TGF- β has been shown to increase the production of OPG⁹ and to stimulate the expression of RANK through pre-osteoclastic cells, thus increasing osteoclastic sensibility to RANK-L.¹⁰ However, contributions by TGF- β are controversial. Despite being characterized as an inhibitor of osteoclast precursor recruitment and a mediator of suppressed osteoclast activity,¹¹⁻¹³ other authors have suggested that TGF- β may contribute to the induction of bone resorption.^{14,15} Osteopontin (OPN) is another molecule that has been linked to bone resorption via promotion of osteoclast adhesion to the osseous matrix.¹⁶ Correspondingly, bone resorption is inhibited in OPN knockout mice.¹⁷

Gingival crevicular fluid (GCF) is an osmotically mediated inflammatory exudate present in the gingival sulcus. When inflamed, this region tends to increase in volume and exhibit increased capillary permeability. It is hypothesized that mechanisms of bone resorption

are related to the release of inflammatory mediators present in GCF. Accordingly, various studies have attempted to clarify the molecular mechanisms affected by orthodontic tooth movement by performing biochemical analyses of GCF and markers related to bone resorption, including interleukin-1 β , interleukin-6, interleukin-8, prostaglandin E2, tumor necrosis factor- α , substance P, and β -glucuronidase.¹⁸⁻²⁰ However, these results have been inconclusive. In some studies, only one side of a tooth¹⁹⁻²³ versus two sides (eg, compression and tension)^{18,24,25} were evaluated, or only one time point²⁶ was analyzed, or consecutive sampling at only one site was used to obtain larger GCF samples.²⁰ All of these factors have limited the overall understanding of the biology of bone resorption and apposition during orthodontic movements.

Therefore, the objective of this pilot study was to evaluate the expression of RANK, OPG, OPN, and TGF- β 1 in GCF volumes obtained from teeth subjected to early orthodontic forces and to compare the expression of these markers between tension and compression sides, as well as between buccal and lingual sides, at different time points.

MATERIALS AND METHODS

Study Sample

Subjects between 20 and 50 years old who were in overall good health and had contact points on both sides of test and control molars were eligible for this

Table 2. Mean Values for Osteoprotegerin (OPG) of the Control Sites and Tension/Compression Sites at Different Time points: Intragroup and Control versus Tension/Compression Site Comparisons^a

	OPG															
	CG Buccal Baseline (1)		CG Lingual Baseline (2)		TG Tension 24h (3)		TG Compression 24 h (4)		CG Buccal 7 d (5)		CG Lingual 7 d (6)		TG Tension 7 d (7)		TG Compression 7 d (8)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
pg	1.76	1.64	2.1	1.78	1.46	1.17	1.18	0.85	1.3	1.15	2.36	1.64	1.62	1.51	1.22	0.77
pg/μl	6.2	5.19	6.73	4.47	4.05	3.35	2.42	2.15	6.11	7.97	6.72	4.12	4.22	4.67	2.42	2.11
pg/μg	2.7	3.63	1.7	2.16	1.25	0.88	0.81	1.33	0.94	1.35	1.66	2	1.91	2.69	0.82	0.97

^a CG indicates control group; TG, test group.

* $P \leq .05$.

Table 1. Extended

Statistics			
Control Sites/Time Comparisons (1) vs (2) vs (5) vs (6)	24 h Control/Test Comparisons (1) vs (3) vs (4)	7 d Control/Test Comparisons (5) vs (7) vs (8)	Test Sites/Time Comparisons (3) vs (4) vs (7) vs (8)
P Value			
.631	.902	.037*	.426
.609	.902	.210	.551
.076	.228	.023*	.160

study. Subjects were excluded if they were smokers, had gingivitis, had probing pocket depths ≥ 4 mm, had loss of clinical attachment ≥ 2 mm in the selected or adjacent teeth, or had taken anti-inflammatory or antibiotic medications within the previous 6 months. A total of 10 healthy, adult volunteers (five men, five women) were selected to participate in this pilot study, and they ranged in age from 22 to 29 years. For each volunteer, one first molar was randomly selected as a test tooth, and the contralateral molar served as control.

Study Design

Two weeks before the beginning of the study, the selected volunteers were informed of the objectives of the study, and they indicated their agreement to participate by signing an informed consent form that had been approved by the Ethical Committee of our institution. The volunteers were then subjected to a supragingival prophylaxis and were given oral hygiene instructions to follow at home for procedures to eliminate inflammation. The study lasted for 7 days and involved three visits. At the first visit (baseline), the Silness and Løe Plaque (PI) Index, Lobene Modified Gingival Index (GI), and Bleeding on Probing (BOP) Index were recorded for the control molar and for adjacent teeth at six sites per tooth. The BOP Index was evaluated after GCF sampling to avoid possible variations. GCF samples were subsequently obtained at mesiobuccal and mesiolingual sites of control

molars. An orthodontic elastic separator was then placed at the mesial site of test molars.

At 24 hours and 7 days later, same clinical measurements were recorded for the control molar, test molar, and adjacent teeth. GCF samples were obtained from mesiobuccal and distobuccal sites of test molars at each visit. At the latter visit, the orthodontic elastic separators were removed.

GCF Sampling

GCF samples were collected using periopaper strips (Harco, Tustin, Calif). Samples were collected at the mesiobuccal and mesiolingual sites of control molars at baseline and at 7 days, and the test molar samples were obtained 24 hours and 7 days after placement of elastic separators at the mesiobuccal (tension side) and distobuccal (compression side) sites. Teeth were isolated with cotton rolls, cleaned of plaque deposits, and dried gently with air before paper strips were applied 1 mm subgingivally for 30 seconds. The volume of the sample on the paper strips was measured using a calibrated Periotron 8000 (Harco). The readings from the Periotron were converted to an actual volume (microliters) by reference to the standard curve calibrated with human serum.^{27,28}

Biochemical Analysis

Each GCF sample was diluted in 100 μ L 1% Triton X-100/50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (Sigma-Aldrich Chemie

Table 2. Extended

Statistics			
Control Sites/Time Comparisons (1) vs (2) vs (5) vs (6)	24 h Control/Test Comparisons (1) vs (3) vs (4)	7 d Control/Test Comparisons (5) vs (7) vs (8)	Test Sites/Time Comparisons (3) vs (4) vs (7) vs (8)
P Value			
.112	.590	.607	.450
.516	.018*	.710	.076
.105	.092	.387	.297

Table 3. Mean Values for Osteopontin (OPN) of the Control Sites and Tension/Compression Sites at Different Time points: Intragroup and Control versus Tension/Compression site Comparisons

	OPN															
	CG Buccal Baseline (1)		CG Lingual Baseline (2)		TG Tension 24 h (3)		TG Compression 24 h (4)		CG Buccal 7 d (5)		CG Lingual 7 d (6)		TG Tension 7 d (7)		TG Compression 7 d (8)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
pg	13.12	23.04	7.1	16.12	31.1	30.07	22.92	24.5	20.78	30.46	6.4	14.86	73.5	138.56	34.64	65.19
pg/ μ l	26.86	45.89	30.73	72.82	107.06	126.4	51.63	58.9	65.84	92.47	14.96	33.69	154.88	237.1	48.09	82.02
pg/ μ g	22.17	37.07	8.09	17.43	33.16	39.16	16.91	33.84	10.72	21.41	2.2	6.96	126.04	313.6	14.77	24.22

^a CG indicates control group; TG, test group; OPN, osteopontin.

* $P \leq .05$

GmbH, Buchs, Switzerland) and centrifuged at 12,500 rpm for 5 minutes. This procedure was repeated after the addition of another 100 μ L of buffer, resulting in a total volume of 200 μ L. From these samples, 135 μ L was used to analyze protein levels of RANK, OPG, OPN, and TGF- β 1 using the Searchlight System (Endogen, Pierce Biotechnology, Rockford, Ill); 5 μ L was used to quantify the total amount of protein present using a spectrophotometer (NanoDrop ND-1000, NanoDrop Technology, Wilmington, Del); and 65 μ L was stored at -80° C.

The amount of each biomarker was determined in picograms (pg). Cytokine concentration (pg/ μ L) was calculated from the volume of GCF according to the following formula: Cytokine concentration (pg/ μ L) = Total amount cytokine (pg)/Volume GCF (μ L). Concentrations were also normalized for the protein content of the samples and given as pg/ μ g protein, according to the following formula: Cytokine concentration (pg/ μ g) = Total amount cytokine (pg)/Protein concentration in GCF (μ g).

Data Analysis

The Friedman test (nonparametric repeated measures analysis of variance) and Dunn's multiple comparisons test as post hoc were used to evaluate the statistical significance ($P < .05$) between measurements for the control sites at the different time

points as well as differences between and within measurements for the control and test sites (tension and compression) for the three time points.

RESULTS

The volume of GCF samples ranged from 0.1 to 0.9 μ L. The mean value was 0.4 μ L (SD = 0.3 μ L).

Clinical gingival condition was evaluated at the baseline and during the experimental period. All patients maintained good oral hygiene throughout the study. No significant changes in the PI, GI, or BOP indexes were found.

GCF values recorded for control and test sites at various time points are listed in Tables 1 through 4. At the control sites, there were no differences between the values recorded for buccal and palatal/lingual sites, or between values recorded at different visits, for any of the four markers investigated. Therefore, although control sites were not assessed at 24 hours, control baseline values were used to test for differences between the control and test sites at 24 hours.

RANK levels (Table 1) at the control (baseline values) and test sites detected 24 hours after insertion of an orthodontic elastic separator were not statistically significant. However, after 7 days, statistically significant differences ($P = .037$) were identified between tension, compression, and control sites in regard to total cytokine levels (measured in picograms) and in

Table 4. Mean Values for Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) of the Control Sites and Tension/Compression Sites at Different Time Points: Intragroup and Control versus Tension/Compression Site Comparisons

	TGF- β															
	CG Buccal Baseline (1)		CG Lingual Baseline (2)		TG Tension 24 h (3)		TG Compression 24 h (4)		CG Buccal 7 d (5)		CG Lingual 7 d (6)		TG Tension 7 d (7)		TG Compression 7 d (8)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
pg	40.94	19.67	28.66	18.72	29.8	8.85	36.56	16.25	29.97	15.01	50.58	69.21	30.74	18.62	49.56	21.52
pg/ μ l	173.43	155	99.29	71.69	91.49	51.31	74.83	45.81	149.49	230.9	144.69	192.4	83.6	55.43	99.37	61.33
pg/ μ g	52.37	40.57	24.36	29.47	26.48	13.78	23.12	28.64	31.71	30.97	19.94	23.54	29.46	24.32	39.85	50.01

^a CG indicates control group; TG, test group; TGF- β 1, TGF- β 1 Transforming Growth Factor - β 1.

* $P \leq .05$; ** $P \leq .01$.

Table 3. Extended

Statistics			
Control Sites/Time Comparisons (1) vs (2) vs (5) vs (6)	24 h Control/Test Comparisons (1) vs (3) vs (4)	7 d Control/Test Comparisons (5) vs (7) vs (8)	Test Sites/Time Comparisons (3) vs (4) vs (7) vs (8)
P Value			
.642	.307	.469	.959
.166	.086	.529	.603
.260	.562	.417	.661

regard to the ratio of RANK levels relative to total protein levels (pg/μg) ($P = .023$). However, post hoc tests did not identify significant two-by-two differences. No differences were found between compression and tension sites at 24 hours or 7 days.

For OPG (Table 2), a statistically significant difference ($P = .018$) in GCF values recorded at 24 hours for tension, compression, and control (baseline values) sites was observed when results were expressed as pg/mL. Moreover, a post hoc test identified concentrations of OPG that were statistically significantly higher ($P < .05$) in control sites versus compression sites at the 24-hour point. Regarding the test molar, there were no differences between compression and tension sites at any time. In contrast, values recorded for OPN (Table 3) showed no significant differences between any of the values recorded at any of the time points evaluated.

For TGF-β1 (Table 4), no differences were found between the GCF values recorded at the baseline 24-hour time point. However, after 7 days, statistically significant differences ($P = .006$) between the tension, compression, and control sites were detected when the results were expressed as total amount of TGF-β1 (pg). Moreover, protein levels were significantly higher at the compression test site than at the tension test site ($P < .05$) or the control site ($P < .05$) according to Dunn's multiple comparisons test.

In regard to the test sites, GCF TGFβ1 values for tension and compression sites at the time points

evaluated showed statistically significant ($P = .04$) differences in total cytokine levels (measured in picograms), although the post-test for multiple comparisons did not identify any statistically significant differences in the two-by-two analyses performed.

DISCUSSION

Recently, RANKL, RANK, OPG, and other signaling pathways have been shown to have important roles in bone metabolism. However, because these molecules are expressed at low levels, sensitive methods of detection are needed. In this study, multiplex sandwich enzyme-linked immunosorbent assay technology was used and provided a sensitivity of <1 pg/μL. Furthermore, to provide an accurate evaluation of the biochemical profile obtained from these assays, the total amount of a given cytokine in each sample (measured in picograms), the amount of marker relative to the total amount of protein (pg/μg), and the marker concentration relative to the volume of GCF (pg/μL)²⁹ were determined. A reason to show our results in these three ways is the lack of an internal method error analysis for the GCF sampling and quantification, which could make it unclear how much of these variations are due to biological processes or to random error. In an attempt to reduce this bias, the Periotron was always calibrated before GCF sampling.^{27,28}

As a pilot experiment for detecting GCF components after the application of force to the teeth by means of

Table 4. Extended

Statistics			
Control Sites/Time Comparisons (1) vs (2) vs (5) vs (6)	24 h Control/Test Comparisons (1) vs (3) vs (4)	7 d Control/Test Comparisons (5) vs (7) vs (8)	Test Sites/Time Comparisons (3) vs (4) vs (7) vs (8)
P Value			
.392	.910	.006**	.041*
.669	.120	.974	.753
.060	.114	.974	.643

elastic separators, this study included a small sample size, measurements of both tension and compression sides, one sampling per site, and a very simple initial tooth displacement (eg, insertion of an elastic separator). In addition, only two time intervals were evaluated—baseline and 7 days for the control sites, and 24 hours and 7 days for the test sites—because these time points were used in similar studies and provided the most significant changes for other biochemical factors.^{2,5,6} Although this is a limitation of the study, the fact that the control-site values remained stable during the study, considering both time and tooth aspects (buccal and lingual), could reduce this shortcoming.

Although no clinical differences in gingival inflammation could be detected during the study, the insertion of elastic separators may induce an undetectable subclinical inflammation.³⁰ This fact points out the need for control sites to be used as reference, especially after the 7-day period. Another factor that could have prevented us from finding gingival changes could be the type of the patients that participated in the study (healthy young volunteers).

For the control sites, no significant changes were observed for any of the markers studied, including the comparison of buccal and lingual sites and the buccal and lingual sites at various time points. These results suggest that these markers are only expressed when significant alterations in bone metabolism occur.

Statistically higher concentrations of OPG were detected in control sites versus compression sites at 24 hours, yet these changes were not maintained at 7 days. These results, and those of other studies,^{6,22,23} suggest that a lower concentration of OPG, a marker associated with bone apposition, is present at sites where bone resorption appears (eg, compression sites). Similarly, RANK results also demonstrated significant differences between test and control sites at the 24-hour time point, which were not maintained through the 7-day time point. These results indicate that RANK may have a short-term role in bone changes that occur when orthodontic forces are applied.

The observation that TGF- β 1 was present at statistically higher concentrations in compression sites versus tension sites at the 7-day time point suggests that TGF- β 1 plays a role in bone destruction, a finding reported by other authors.^{14,15} However, these results are in contrast with those of Garlet and colleagues,²⁶ who reported increased levels of this marker in compression and tension sites versus control sites, but not between tension and compression sites.

CONCLUSIONS

- Changes in bone metabolism after insertion of an elastic separator included higher levels of bone

resorptive mediators (eg, RANK and TGF- β 1) and lower levels of bone forming mediators (OPG). Moreover, the dynamics of these changes occurred over the short term (24 hours) and long term (7 day).

- Further studies are needed to elucidate additional dynamics and signaling pathways of biological processes that occur during orthodontic movements.

ACKNOWLEDGMENT

This study was supported by Fundación Médica Mutua Madrileña.

REFERENCES

1. Yamaguchi M. RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res.* 2009;12:113–119.
2. Kim T, Handa A, Iida J, Yoshida S. RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. *Arch Oral Biol.* 2007;52:244–250.
3. Dunn MD, Park CH, Kostenuik PJ, Kapila S, Giannobile WV. Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. *Bone.* 2007;41:446–455.
4. Fujihara S, Yokozeki M, Oba Y, Higashibata Y, Nomura S, Moriyama K. Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress. *J Bone Miner Res.* 2006;21:956–964.
5. Kuroda S, Balam TA, Sakai Y, Tamamura N, Takano-Yamamoto T. Expression of osteopontin mRNA in odontoclasts revealed by in situ hybridization during experimental tooth movement in mice. *J Bone Miner Metab.* 2005;23:110–113.
6. Nishijima Y, Yamaguchi M, Kojima T, Aihara N, Nakajima R, Kasai K. Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthod Craniofac Res.* 2006;9:63–70.
7. Kanzaki H, Chiba M, Sato A, et al. Cyclical tensile force on periodontal ligament cells inhibits osteoclastogenesis through OPG induction. *J Dent Res.* 2006;85:457–462.
8. Hofbauer LC, Lacey DL, Dunstan CR, Spelsberg TC, Riggs BL, Khosla S. Interleukin-1 β and tumor necrosis factor- α , but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone.* 1999;25:255–259.
9. Takai H, Kanematsu M, Yano K, et al. Transforming growth factor- β stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *J Biol Chem.* 1998;273:27091–27096.
10. Yan T, Riggs BL, Boyle WJ, Khosla S. Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF- β 1. *J Cell Biochem.* 2001;83:320–325.
11. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor- β 1 to the bone. *Endocr Rev.* 2005;26:743–774.
12. Kanaan RA, Kanaan LA. Transforming growth factor β 1, bone connection. *Med Sci Monit.* 2006;12:RA164–RA169.
13. Brady TA, Piesco NP, Buckley MJ, Langkamp HH, Bowen LL, Agarwal S. Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor- β 1. *J Dent Res.* 1998;77:1779–1790.

14. Itonaga I, Sabokbar A, Sun SG, et al. Transforming growth factor-beta induces osteoclast formation in the absence of RANKL. *Bone*. 2004;34:57-64.
15. Pilkington MF, Sims SM, Dixon SJ. Transforming growth factor-beta induces osteoclast ruffling and chemotaxis: potential role in osteoclast recruitment. *J Bone Miner Res*. 2001;16:1237-1247.
16. Reinholt FP, Hultenby K, Oldberg A, Heinegard D. Osteopontin—a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990;87:4473-4475.
17. Ishijima M, Tsuji K, Rittling SR, et al. Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in osteopontin-deficient mice. *J Bone Miner Res*. 2002;17:661-667.
18. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *Eur J Oral Sci*. 2006;114:416-422.
19. Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *J Periodontol*. 2007;78:453-458.
20. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 1996;75:562-567.
21. Griffiths GS, Moulson AM, Petrie A, James IT. Evaluation of osteocalcin and pyridinium crosslinks of bone collagen as markers of bone turnover in gingival crevicular fluid during different stages of orthodontic treatment. *J Clin Periodontol*. 1998;25:492-498.
22. Kawasaki K, Takahashi T, Yamaguchi M, Kasai K. Effects of aging on RANKL and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofac Res*. 2006;9:137-142.
23. Toygar HU, Kircelli BH, Bulut S, Sezgin N, Tasdelen B. Osteoprotegerin in gingival crevicular fluid under long-term continuous orthodontic force application. *Angle Orthod*. 2008;78:988-993.
24. Perinetti G, Paolantonio M, D'Attilio M, et al. Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2002;122:548-556.
25. Perinetti G, Serra E, Paolantonio M, et al. Lactate dehydrogenase activity in human gingival crevicular fluid during orthodontic treatment: a controlled, short-term longitudinal study. *J Periodontol*. 2005;76:411-417.
26. Garlet TP, Coelho U, Silva JS, Garlet GP. Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during orthodontic tooth movement in humans. *Eur J Oral Sci*. 2007;115:355-362.
27. Chapple IL, Landini G, Griffiths GS, Patel NC, Ward RS. Calibration of the Periotron 8000 and 6000 by polynomial regression. *J Periodontol Res*. 1999;34:79-86.
28. Tozum TF, Hatipoglu H, Yamalik N, et al. Critical steps in electronic volume quantification of gingival crevicular fluid: the potential impact of evaporation, fluid retention, local conditions and repeated measurements. *J Periodontol Res*. 2004;39:344-357.
29. Vernal R, Dutzan N, Chaparro A, Puente J, Antonieta Valenzuela M, Gamonal J. Levels of interleukin-17 in gingival crevicular fluid and in supernatants of cellular cultures of gingival tissue from patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol*. 2005;32:383-389.
30. Perinetti G, Paolantonio M, Serra E, et al. Longitudinal monitoring of subgingival colonization by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, and crevicular alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase activities around orthodontically treated teeth. *J Clin Periodontol*. 2004;31:60-67.

Estudio II

6.2. Estudio II

“Niveles de calcitonina en fluido gingival crevicular y evaluación del discomfort durante el movimiento ortodóncico temprano en pacientes jóvenes”

Resumen

Objetivos: Investigar por primera vez los niveles de calcitonina (CT) en fluido gingival crevicular (GCF), sus variaciones durante el movimiento ortodóncico temprano tanto en el lado de presión como en el de tensión, y su posible asociación con el dolor experimentado con este tratamiento.

Diseño: Quince jóvenes (edad media: 12.6 años) con requerimiento de cierre de diastema entre incisivos centrales superiores. Recogimos GCF de los lados de presión y tensión del incisivo central superior derecho (experimental) y primer premolar (control), antes y después (1h, 24h, 7d, 15d) del inicio del tratamiento. Los niveles de calcitonina fueron determinados mediante western blot. La intensidad del dolor se midió mediante una escala analógica visual.

Resultados: Los niveles de calcitonina fueron mayores en el lado de presión respecto al control a los 7 días ($p = 0.014$). Comparaciones intragrupo mostraron un incremento de CT entre 1h y 7d (680.81 ± 1672.60 pg/30s, $p = 0.010$) en el lado de presión. No se encontraron cambios significativos en el lado de tensión y control. Los niveles de calcitonina y la intensidad del dolor se asociaron inversamente durante el período desde las 24h a los 15d ($r = -0.54$, $p = 0.05$).

Conclusiones: Los niveles de CT en GCF aumentaron significativamente en el lado de presión al poco tiempo de aplicar fuerzas ortodóncicas. Estos cambios se asociaron inversamente con el dolor dental percibido por los pacientes durante el período comprendido entre 24h y 15d.

Available online at www.sciencedirect.com

SciVerse ScienceDirect

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/aob>

Calcitonin gingival crevicular fluid levels and pain discomfort during early orthodontic tooth movement in young patients

José Antonio Alarcón^{a,*}, Dolores Linde^a, Germán Barbieri^b, Patricia Solano^b, Octavio Caba^c,
María Judith Rios-Lugo^b, Mariano Sanz^b, Conchita Martin^d

^a Department of Stomatology, Section of Orthodontics, Faculty of Odontology, University of Granada, Granada, Spain

^b Department of Stomatology III, Section of Periodontology, Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

^c Department of Health Sciences, University of Jaén, Jaén, Spain

^d Department of Stomatology IV, Section of Orthodontics, Faculty of Odontology, University Complutense of Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Accepted 1 October 2012

Keywords:

Calcitonin
Gingival crevicular fluid
Orthodontic movement
Dental pain
Western blot

ABSTRACT

Objectives: To investigate the previously unreported presence of calcitonin (CT) levels in gingival crevicular fluid (GCF), its variations during initial orthodontic tooth movement in both tension and compression sites, and its possible association with the experienced dental pain.

Design: Fifteen children (mean age: 12.6 years) requiring orthodontic closure of the upper midline diastema were included. We collected GCF from the compression and tension sites of the upper right central incisor (experimental) and first bicuspid (control), before and after (1 h, 24 h, 7 d, 15 d) beginning of treatment. Calcitonin levels were determined by Western blot. Pain intensity was assessed using a visual analogue scale.

Results: Calcitonin levels were higher in the compression site versus the control site at 7 d ($p = 0.014$). Intragroup comparisons showed an increment of CT between 1 h and 7 d (680.81 ± 1672.60 pg/30 s, $p = 0.010$) in the compression site. No significant changes were found in the tension and control sites. Calcitonin levels and pain intensity were negatively associated during the period from 24 h to 15 d ($r = -0.54$, $p = 0.05$).

Conclusions: CT levels in the GCF significantly increased in the compression site after the short term after application of orthodontic forces. These changes were negatively associated with the perceived patient's dental pain during the period from 24 h to 15 d.

© 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Calcitonin (CT), a 32-amino acid polypeptide hormone produced by C-cells of the thyroid gland, is involved in bone homeostasis. Calcitonin binds to a 7-membrane-spanning array G protein-coupled receptor with calcium acting as

secondary messenger. This receptor is frequently located in osteoclasts, renal tubular, and neural cells. In response to a rise in blood calcium levels, CT is released and decreases these levels, mainly through the inhibition of osteoclast-mediated bone resorption,¹ the decrease of calcium tubular reabsorption,² and the regulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 production in the kidney.³ In vitro and in vivo studies have shown

* Corresponding author at: Department of Stomatology, Faculty of Odontology, University of Granada, Campus Universitario de Cartuja, s/n 18071, Granada, Spain. Tel.: +34 958201480; fax: +34 958201480.

E-mail address: jalarcon@ugr.es (J.A. Alarcón).

0003-9969/\$ – see front matter © 2012 Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.10.002>

that CT has a potent inhibitory effect on osteoclasts, where it inhibits cell motility, actin ring formation, and bone resorptive mechanisms.^{4,5}

Calcitonin also has analgesic properties, especially on bone-related pain,^{6–8} although its mechanism of action remains unclear. Three hypotheses have been proposed to explain this powerful analgesic effect: a direct central nervous system action involving calcitonin-binding receptors,^{9,10} a peripheral mechanism inhibiting the synthesis of PGE₂ and thromboxane,^{11,12} and an increase in plasma β -endorphin levels.^{7,11,13}

Orthodontic tooth movement takes place by a combination of bone apposition in the tension side and bone resorption in the compression side after the application of mechanical forces on teeth.^{14,15} During this biological process, many biochemical markers, either related with bone resorption (e.g. IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α , substance P, NTx, and β -glucuronidase) or with bone formation (e.g. osteocalcin and leptin) can be found in the gingival crevicular fluid (GCF).^{16–20} Analysis of the GCF can also reveal information on the cellular response of the surrounding periodontal ligament and bone metabolic changes that occur during orthodontic treatment.

Although CT actively intervenes in bone metabolism and is secreted under conditions of increasing bone resorption,¹ to our knowledge, the CT levels in GCF during orthodontic tooth movement have not been investigated. It is, therefore, the aim of this investigation: (1) to assess whether CT can be detected in the GCF of both the tension and compression sides of teeth under orthodontic movement; (2) to measure CT levels during the early phase of orthodontic movement; and (3) to find possible associations between the CT levels in GCF and the patient's perceived intensity of pain during orthodontic tooth movement.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

Fifteen young patients (8 female and 7 male; mean age: 12.6 years) presenting an upper midline diastema and requiring orthodontic treatment participated in this study. All of the patients met the following criteria: aged 10–15 years; presence of an upper midline diastema ≥ 1.5 mm; in good general and oral health; without evidence of periodontal or gingival disease, as demonstrated by presence of probing depths ≤ 3 mm, and no radiographic evidence of bone loss; and without a record of antibiotic therapy within the last 6 months, or chronic anti-inflammatory drug medication in the month preceding the study. The parents of all patients were informed on the characteristics of the study and agreed for their children to participate by signing an EC-approved informed consent form.

The sample size was estimated from data obtained in a similar clinical study evaluating the biomarkers IL-1 β , substance P and PGE₂.¹⁸ Under the assumption of a mean difference of 0.10 pg at the 20 s sample and an expected pooled standard deviation of 0.05, a sample size of 12 patients provided a power of 0.8.

2.2. Study design

Two weeks before the beginning of this prospective longitudinal case series study, each participant received prophylaxis and oral hygiene instructions. All participants indicated their willingness to adhere strictly to these instructions. Patients were instructed not to take any medications, including non-steroidal anti-inflammatory drugs, during the study period. Plaque control and motivation were performed during the whole study.

Brackets (0.022 \times 0.028 in. Mini Master, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA) were placed on the buccal surface of the upper central incisors. The upper midline diastema was closed orthodontically by applying a force of 100 g with a pre-stretched elastomeric chain (Memory chain, American Orthodontics, Sheboygan, WI, USA). The elastomeric chain was activated and tied at one of the two braces using a 0.008-in. ligature wire once the 100 g force activation was achieved. The magnitude was adjusted to produce equivalent compressive stresses between subjects using an orthodontic dynamometer (YS-31D Push pull gauge. YDM CORPORATION, Saitama 355-0042, Japan). To reduce the occurrence of vertical aligning movements, no arch-wire was inserted in the bracket slot during this experiment.

The GCF was collected from the mesial (compression) and distal (tension) sites of the upper right central incisor (experimental) and from the mesial site of the right or left upper first bicuspid (control), just before (0 h, baseline) and after (1 h, 24 h, 7 d, and 15 d) from the start of the orthodontic treatment. At each appointment, the plaque index (PI),²¹ modified gingival index (GI)²² and bleeding on probing index (BOP)²³ were assessed in experimental, control, and adjacent teeth, just after GCF sampling.

Discomfort or pain was estimated by a visual analogue scale (VAS) at each moment of the study, previous to GCF sampling and assessment of periodontal indices.

2.3. GCF sampling

The GCF samples were taken with periopaper strips (Harco, Tustin, CA, USA). Selected teeth were isolated with cotton rolls, cleaned of plaque deposits, and dried gently with air. The paper strips were gently introduced subgingivally at 1 mm for 30 s. Each sample was placed in a centrifuge tube (Millipore Ultrafree-MC) and stored at -80°C until analysis. The volume of the sample on the paper strips was measured using a calibrated Periotron 8000 (Harco). The readings from the Periotron were converted to an actual volume (microliters) by reference to the standard curve calibrated with human serum.

2.4. Calcitonin determination

The CT level in GCF from experimental and control teeth was analyzed by Western blot analysis with specific antibodies for CT. On the day of analysis, the periopaper was diluted in 100 μl of 1% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Switzerland) and centrifuged at 12,500 rpm for 5 min. Proteins were separated by 10% sodium dodecylsulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in a Mini Protean II cell (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)

at 80 V for 2 h at room temperature and transferred to a nitrocellulose membrane (15 V at room temperature for 20 min). Blots were treated with blocking solution (PBS, 5% nonfat milk) for 1 h at room temperature and then reacted with a CT mouse monoclonal IgG1 antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) at 1:100 dilution overnight at 4 °C. Membranes were washed (10 min in 5% PBS) 3 times and incubated for 1 h with a horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse IgG (Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA) diluted at 1:200.

Protein–antibody complexes were visualized by enhanced chemiluminescence (ECL, Bonus, Amersham, Little Chalfont, UK). Relative amounts of CT were determined by densitometric analysis with Quantity One 1-D analysis software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). All of the GCF samples were run in duplicate. The levels of CT were reported as the total amount (in pg) per 30 s sample.

2.5. Evaluation of discomfort or pain

A baseline questionnaire-based interview was established to evaluate the previous experience of each patient with general and dental pain. Previous experience of general pain was evaluated with a 100-mm VAS, with two end-points, labelled “no pain” on the left and “worst pain” on the right.²⁴ The same scale was used to assess dental pain relative to previously experienced situations.

Discomfort or pain during the study period also was evaluated with VAS. Patients indicated their current level of spontaneous pain intensity and experienced pain while clenching with cotton rolls for the experimental and control teeth.

2.6. Statistical analysis

Longitudinal changes of GCF CT levels were expressed as percentages of baseline values (0 h). After testing for normality, repeated measures ANOVA with post hoc tests were used to compare differences between sites (tension, compression, and control) and to analyze intragroup differences between time points (1–24 h, 7 d, or 15 d; 24 h to 7 d or 15 d; and 7–15 d). Multiple linear regression analysis was performed to reveal correlations between the GCF CT level and pain intensity, and between pain intensity and previously experienced general and dental pain. SPSS 19.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used for statistical analysis.

3. Results

All patients maintained good oral hygiene throughout the study. No significant changes in PI, GI, or BOP were found at any time point at any site.

Patients showed a central diastema that ranged from 1.5 to 2.4 mm (mean value: 1.86 mm, SD: 0.27 mm).

3.1. Longitudinal GCF CT changes

Table 1 shows descriptive statistics of CT levels, expressed as the total amount per 30-s sample, in the tension and compression sites of experimental teeth and in the mesial site of control teeth. A pronounced increase in percent CT levels was found from 1 h to 7 d in the compression site; these levels remained fairly stable in the tension and control sites (Fig. 1). Differences in longitudinal CT changes between sites, expressed as the percentage of the respective baseline values (0%), are shown in Table 2. A pronounced increment in the percent CT level in the compression site compared to the control site was detected at 7 d ($p = 0.014$). Intragroup comparisons also showed an increment of the percent CT levels between 1 h and 7 d (680.81 ± 1672.60 pg/30 s, $p = 0.010$) in the compression site. No significant percent differences were found between the tension and control sites over time (Table 3).

The volume of GCF samples ranged from 0.1 to 0.9 μ l. Differences between sites and time points were tested. No significant differences were found, although the pooled mean values at baseline (mean = 0.4 μ l; SD = 0.32 μ l) were slightly lower than during the study (mean = 0.67 μ l; SD = 0.48 μ l).

3.2. Evaluation of discomfort or pain

A questionnaire-based interview revealed that the strongest previously experienced general pain was associated with “spraining one’s ankle”, followed by “cutting one’s finger”. The strongest previously experienced dental pain was associated with “injection” and “drilling”. Substantial inter-subject variation was observed for previously experienced general and dental pain.

Fig. 2 shows the evolution of mean VAS pain scores for experimental and control teeth throughout the study. In experimental teeth, spontaneous pain intensity increased from 1 h to 24 h, whereas pain intensity when clenching cotton rolls increased substantially from the application of orthodontic forces to 24 h. Pain intensity scores returned to

Table 1 – Descriptive statistics of calcitonin levels (pg per 30 s sample) at tension, compression and control sites throughout the study.

	Tension			Compression			Control		
	pg/30 s			pg/30 s			pg/30 s		
	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median	Mean	SD	Median
Baseline	23.0	34.4	13.5	5.7	4.4	6.0	25.9	25.9	18.0
1 h	29.9	24.7	21.0	6.7	6.9	4.8	33.8	45.1	17.3
24 h	36.3	44.4	18.9	11.2	17.0	2.9	25.8	27.5	13.8
7 d	43.7	64.4	14.3	38.2	32.0	26.0	21.8	23.6	12.9
15 d	31.7	31.8	16.8	27.7	22.6	22.1	27.8	23.7	19.8

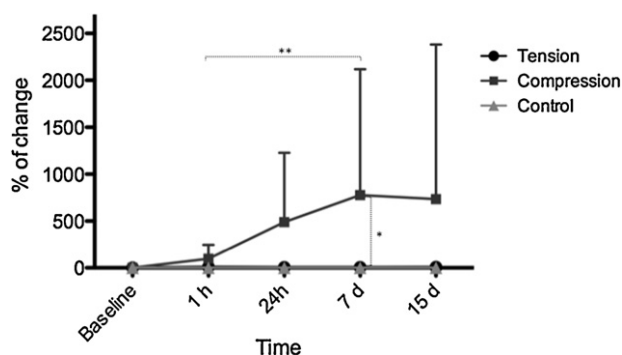


Fig. 1 – Evolution of mean calcitonin values at tension, compression, and control sites throughout the study ($p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

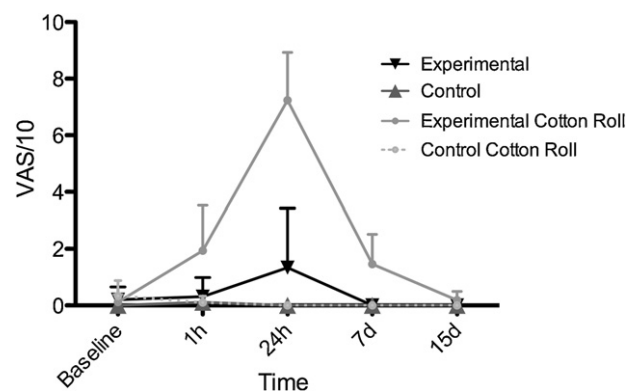


Fig. 2 – Evolution of mean VAS scores and standard error for each of the tested teeth.

initial values after 7 and 15 d, respectively. In contrast, VAS pain scores for control teeth did not change over time. No correlation between pain intensity during the study and previously experienced general and dental pain was found.

A negative association was found between the percent CT level increment and VAS scores of pain intensity changes during clenching with a cotton roll in the experimental tooth over the 24 h to 15 d period ($r = -0.54$, $p = 0.05$).

4. Discussion

This study aimed to investigate the previously unreported presence of CT levels in GCF, its variations during initial orthodontic tooth movement in both tension and compression sites, and its possible association with the experienced dental pain. This prospective case series has clearly shown that CT levels in the GCF can be measured using western blot biochemical analysis. Significant increases in percent CT

levels were found in the compression site from 1 h to 7 d after application of orthodontic forces. These changes in CT levels were negatively associated with the perceived dental pain change during clenching with a cotton roll in the experimental tooth during the period from 24 h to 15 d. In contrast, no significant changes in CT levels were found in the tension and control sites.

The CT levels were reported as the total amount (pg) per 30-s sample, which is consistent with previous similar investigations that have used total amounts rather than concentrations of biomarkers, due to the inherent problem of the accurate determination of GCF volume.^{25,26} Nevertheless, we cannot rule out the possibility that the increased percent CT levels found could be influenced by a potential increase in GCF volume associated with orthodontic treatment.^{27,28} However, in our study no differences in GCF were found between sites and time points.

Although CT values in the compression group were lower at baseline relative to the other sites, the fact of expressing the

Table 2 – Differences between sites for calcitonin levels expressed as percentage of the baseline values at tension, compression and control sites.

	Tension-compression			Tension-control			Compression-control		
	Mean diff.	SD	p value	Mean diff.	SD	p Value	Mean diff.	SD	p value
1 h	-87.98	213.97	0.643	7.35	18.68	0.160	95.33	209.82	0.770
24 h	-484.80	1032.43	0.492	3.67	7.46	0.059	488.50	1031.29	0.770
7 d	-772.40	1876.70	0.131	4.26	9.92	0.123	776.70	1874.87	0.014*
15 d	-727.50	2305.60	0.770	4.98	12.02	0.432	732.50	2301.16	0.160

* $p < 0.05$.

Table 3 – Intragroup differences for levels expressed as percentage of the baseline values.

	Tension			Compression			Control		
	Mean	SD	p value	Mean	SD	p value	Mean	SD	p value
1-24 h	4.08	15.79	0.322	-392.74	828.93	0.547	0.401	0.99	0.160
1 h-7 d	3.652	8.9	0.492	-680.81	1672.6	0.010**	5.89	2.78	0.375
1 h-15 d	1.87	8.75	0.557	-637.7	2129.69	0.131	-0.505	1.89	1
24 h-7 d	-0.428	9.25	1	-288.07	1081.17	0.193	0.158	0.47	0.275
24 h-15 d	-2.21	9.28	0.846	-244.96	1756.6	0.160	-0.906	2.52	0.846
7-15 d	-1.782	3.41	0.129	43.11	782.79	0.695	-1.06	2.7	0.426

** $p = 0.01$.

results as the % of change relative to these basal values overcomes these differences, which could be due to the biological variability associated to GCF determination.

In this study, we attempted to assess the reported anti-resorptive and analgesic activities of CT^{1,6,7} during orthodontic teeth movement through the analysis of GCF CT levels. The observed rapid increase in percent CT levels at the compression site of the experimental teeth was probably due to changes in the bone calcium homeostasis induced by the orthodontic forces. In other words, the increment in calcium levels at the compression site during active bone resorption may have elicited the immediate increase in CT release.

Reported biological activities of CT include lowering serum calcium concentrations in pathological states of increasing bone resorption, mainly by inhibition of osteoclast activity.^{1,4,5} It is, therefore conceivable that a short-term stress exerted on the periodontium by the orthodontic forces induced an increase in the GCF CT levels, which intervened in the bone remodelling during the early stages of orthodontic tooth movement. GCF CT levels may thus be considered a biomarker of bone remodelling during early orthodontic tooth movement. Since no differences in PI, GI, and BOP were found throughout the study, the periodontal conditions did not influence the GCF CT levels.

The highest intensity of dental pain was reached at 24 h after the beginning of orthodontic treatment, which is similar to the results of previous studies.^{25,29,30} As a novelty, we introduced a functional task in the evaluation of perceived dental pain: that of clenching with a cotton roll. In this study, a negative association was found between the percent CT levels and VAS pain score changes in the experimental tooth over the period from 24 h to 15 d. These results showed that, as CT levels increase, dental pain decreases, what may indicate an analgesic effect of CT in orthodontics-induced dental pain, although the mechanism remains unclear. Several hypotheses have been proposed to explain this powerful analgesic effect of CT: a central action,^{9,10} inhibition of PGE₂ and thromboxane synthesis,^{11,12} and stimulation of β -endorphin release.^{7,11,13} In other studies assessing orthodontic-related dental pain, the initial intensity of pain (at 1 h) was associated with increased GCF PGE₂ and IL-1 β levels.^{25,29} It will be therefore interesting to determine whether the increase in CT levels reported in this investigation would correlate with the β -endorphin and PGE₂ levels in GCF.

This prospective clinical investigation has shown that CT levels in the GCF significantly increased in the compression site after the short term after application of orthodontic forces and these changes were negatively associated with the perceived patient's dental pain during the period from 24 h to 15 d after the application of orthodontic forces.

Funding

This study was funded by an investigation grant from The "Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña".

Competing interests

All authors state that they have no conflicts of interest.

Ethical approval

The parents of all patients were informed on the characteristics of the study and agreed for their children to participate by signing an EC-approved informed consent form.

Acknowledgement

This study was funded by an investigation grant from The Fundación Investigación Médica Mutua Madrileña.

REFERENCES

1. Turner AG, Tjahjono F, Chiu WS, Skinner J, Sawyer R, Moore AJ, et al. The role of the calcitonin receptor in protecting against induced hypercalcemia is mediated via its actions on osteoclasts to inhibit bone resorption. *Bone* 2011;**48**:354–61.
2. Sexton PM, Findlay DM, Martin TJ. Calcitonin. *Current Medicinal Chemistry* 1999;**6**:1067–93.
3. Shinki T, Ueno Y, DeLuca HF, Suda T. Calcitonin is a major regulator for the expression of renal 25-hydroxyvitamin D3-1 α -hydroxylase gene in normocalcemic rats. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;**96**:8253–8.
4. Nakamura H, Nagaoka N, Hirata A, Inoue M, Ozawa H, Yamamoto T. Distribution of actin filaments, non-muscle myosin, M-Ras, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in osteoclasts after calcitonin administration. *Archives of Histology and Cytology* 2005;**68**:143–50.
5. Marzia M, Chiusaroli R, Neff L, Kim NY, Chishti AH, Baron R, et al. Calpain is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin. *Journal of Biological Chemistry* 2006;**281**:9745–54.
6. Knopp-Sihota JA, Newburn-Cook CV, Homik J, Cummings GG, Voaklander D. Calcitonin for treating acute and chronic pain of recent and remote osteoporotic vertebral compression fractures: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International* 2012;**23**:17–38.
7. Ofluoglu D, Akyuz G, Unay O, Kayhan O. The effect of calcitonin on beta-endorphin levels in postmenopausal osteoporotic patients with back pain. *Clinical Rheumatology* 2007;**26**:44–9.
8. Blau LA, Hoehns JD. Analgesic efficacy of calcitonin for vertebral fracture pain. *Annals of Pharmacotherapy* 2003;**37**:564–70.
9. Azria M. Possible mechanisms of the analgesic action of calcitonin. *Bone* 2002;**30**:80S–3S.
10. Nakamoto H, Soeda Y, Takami S, Minami M, Satoh M. Localization of calcitonin receptor mRNA in the mouse brain: coexistence with serotonin transporter mRNA. *Brain Research Molecular Brain Research* 2000;**76**:93–102.
11. Pecile A. Calcitonin and relief of pain. *Bone and Mineral* 1992;**16**:187–9.
12. Ceserani R, Colombo M, Olgiati VR, Pecile A. Calcitonin and prostaglandin system. *Life Sciences* 1979;**25**:1851–5.
13. Franceschini R, Cataldi A, Barreca T, Salvemini M, Rolandi E. Plasma beta-endorphin, ACTH and cortisol secretion in man after nasal spray administration of calcitonin. *European Journal of Clinical Pharmacology* 1989;**37**:341–3.
14. Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 2008;**87**:414–34.

15. Krishnan V, Davidovitch Z. On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 2009;**88**:597–608.
16. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research* 1996;**75**:562–7.
17. Alfaqeeh SA, Anil S. Osteocalcin and N-telopeptides of type I collagen marker levels in gingival crevicular fluid during different stages of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics* 2011;**139**:e553–9.
18. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *European Journal of Oral Sciences* 2006;**114**:416–22.
19. Dilsiz A, Kilic N, Aydin T, Ates FN, Zihni M, Bulut C. Leptin levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Angle Orthodontist* 2010;**80**:504–8.
20. Ren Y, Vissink A. Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *European Journal of Oral Sciences* 2008;**116**:89–97.
21. Silness J, Loe H. Periodontal disease in pregnancy. II. Correlation between oral hygiene and periodontal condition. *Acta Odontologica Scandinavica* 1964;**22**:121–35.
22. Lobene RR, Weatherford T, Ross NM, Lamm RA, Menaker L. A modified gingival index for use in clinical trials. *Clinical Preventive Dentistry* 1986;**8**:3–6.
23. Muhlemann HR, Son S. Gingival sulcus bleeding—a leading symptom in initial gingivitis. *Helvetica Odontologica Acta* 1971;**15**:107–13.
24. Dixon JS, Bird HA. Reproducibility along a 10 cm vertical visual analogue scale. *Annals of the Rheumatic Diseases* 1981;**40**:87–9.
25. Giannopoulou C, Dudic A, Kiliaridis S. Pain discomfort and crevicular fluid changes induced by orthodontic elastic separators in children. *Journal of Pain* 2006;**7**:367–76.
26. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol* 2003;**2000**(31):32–42.
27. Samuels RH, Pender N, Last KS. The effects of orthodontic tooth movement on the glycosaminoglycan components of gingival crevicular fluid. *Journal of Clinical Periodontology* 1993;**20**:371–7.
28. Baldwin PD, Pender N, Last KS. Effects on tooth movement of force delivery from nickel–titanium archwires. *European Journal of Orthodontics* 1999;**21**:481–9.
29. Luppapornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *European Journal of Orthodontics* 2010;**32**:596–601.
30. Polat O, Karaman AI. Pain control during fixed orthodontic appliance therapy. *Angle Orthodontist* 2005;**75**:214–9.

Estudio III

6.3. Estudio III

“Optimización de soluciones tampón para el análisis de citoquinas inflamatorias en fluido gingival crevicular mediante citometría de flujo para análisis múltiple”

Resumen

Objetivo: Someter a prueba dos soluciones tampón para obtener un análisis fiable y reproducible de citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN, OC), en fluido gingival crevicular (GCF) mediante citometría de flujo.

Material y Métodos: Se recogieron muestras de GCF de voluntarios sanos con puntas de papel (perio-paper) y se diluyeron en una solución tampón fosfato salina (PBS) o en otra solución tampón tris hidrocloreuro (Tris-HCl), con o sin la adición de inhibidores de proteasas (PI). Se llevó a cabo un inmunoensayo para citoquinas mediante citometría de flujo (Luminex Xmap²⁰⁰) generando curvas estándares.

Resultados: Las curvas estándares generadas con el uso de PBS demostraron mejores ajustes para niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , al compararlas con las correspondientes al uso de Tris-HCl ($p < 0.05$).

Conclusiones: El uso de la solución tampón PBS con la adición de inhibidores de proteasas proporcionó mediciones fiables de biomarcadores inflamatorios en muestras de GCF de voluntarios sanos.

Journal section: Oral Medicine and Pathology
Publication Types: Research

doi:10.4317/medoral.19852
<http://dx.doi.org/doi:10.4317/medoral.19852>

Optimization of buffer solutions to analyze inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid by multiplex flow cytometry

María-Judith Ríos-Lugo ¹, Conchita Martín ², José-Antonio Alarcón ³, Ana Esquifino ⁴, Germán Barbieri ¹, Patricia Solano ¹, Mariano Sanz ¹

¹ Department of Stomatology III, Area of Periodontics, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

² Department of Stomatology IV, Area of Orthodontics, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

³ Department of Stomatology, Area of Orthodontics, School of Dentistry, University of Granada, Granada, Spain

⁴ Department of Biochemistry and Molecular biology III, Medicine School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain

Correspondence:

Rosalía de Castro 1, 1^o izquierda,
A Coruña, Spain,
germanbarbieri@gmail.com

Please cite this article in press as: Ríos-Lugo MJ, Martín C, Alarcón JA, Esquifino A, Barbieri G, Solano P, Sanz M. Optimization of buffer solutions to analyze inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid by multiplex flow cytometry. Med Oral Patol Oral Cir Bucal. (2014), doi:10.4317/medoral.19852

Received: 28/01/2014

Accepted: 09/03/2014

Abstract

Objective: the aim of this study was to test two buffer solutions in order to attain a reliable and reproducible analysis of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN and OC), in gingival crevicular fluid (GCF) by flow cytometry.

Material and methods: GCF samples from healthy volunteers were collected with perio-paper strips and diluted either in phosphate buffered saline (PBS) or Tris-HCl buffer, with and without protease inhibitors (PI). Cytokine immunoassays were carried out by flow cytometry (Luminex Xmap ²⁰⁰) generating standard curves.

Results: standards curves generated with the use of phosphate-buffered saline (PBS) demonstrated best adjustment for cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α levels, when using Tris-HCl ($p < 0.05$).

Conclusions: The use of PBS buffer with the addition of PI provided reliable measurements of inflammatory biomarkers in GCF samples of healthy volunteers.

Key words: Curve fitting, flow cytometer, immunoassay buffer, crevicular fluid, cytokines.

Introduction

The analysis of immunological biomarkers in GCF has been mostly used for research purposes, although it has also been considered appropriate for a periodontal disease diagnosis and the evaluation of the patient's

response to therapy (1). Among biomarkers, cytokines involved in the cellular inflammatory response (2) have been recognized as potentially useful diagnostic or prognostic biomarkers of periodontal destruction (3). In the quantification of these cytokines in GCF, differ-

ent analytical methods have been used providing very heterogeneous results (4). Different factors have been attributed to justify this heterogeneity including: the sampling method, the contamination of the sample with oral fluids, the buffer solution used to sample dilution and maintenance condition, degradation of GCF proteases, and the different cytokine identification methods (4,5). Although most studies have used the filter paper strips to collect GCF, this technique requires the selection of the appropriate sites, the careful placement of the perio-paper strips, the avoidance of any fluid contamination and the suitable calibration of the fluid volume measuring device (Periotron®) (6,7). Moreover, since the amount of fluid collected is usually very small, mostly in sites without a clear inflammatory status (1-2 µL), the assay sensitivity used for the cytokine detection may be compromised (8). It is, therefore, important, to find out the proper buffer to dilute the samples (usually in volumes of 100-150 µL) that does not interfere with the cytokine detection. Buffer solutions, due to their chemical properties, may interact with the biochemical components present in samples, or they may interfere with non-protein substances, thus altering the results, mainly with the use of immunoassay techniques (9). Some important considerations when choosing a buffer solution are the pH, the salts and detergents. The pH of buffers; can affect protease activity solubility can be increased with a moderate amount of salts; and the use of any charged detergents will interfere with the analysis. PBS buffer may help to minimize these variations and give protein uniformity, maintaining a constant pH and presenting the osmolality levels and ion concentrations of the solution which usually match those of the human body (isotonic) (10). On the other hand, Tris-HCl, because of its nature, possibly causes important variability and interactions between proteins and different amine groups resulting in high background and false signals. Proteins from GCF samples need to be extracted efficiently and without degradation to make the best use of a limited resource. However, protein extraction inevitably compromises preservation. In order to avoid proteolytic degradation, protease inhibitors are added to ensure protein preservation (5), although they regulate different enzymatic reactions, such as proteolysis of proteins, proteolysis of phosphatases converted into proteolytic substrates, which may have catalytic responses and probably result in high degradation of samples. In research, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and the ELISpot® have been the most commonly used analytical methods, based on the analysis of each cytokine individually. This demands arduous work and requires enough fluid volume in the sample to provide aliquots for each analyte (11). Recently, the introduction of bioassays allowing the simultaneous assessment of multiple analytes, such as by multiplex-

ing, have solved many of these drawbacks, although research findings require the appropriate validation and standardization, especially when used with clinical samples (12). The FDA guidelines state the importance of the adequate validation of the tests assessing biomarkers used in a patient's diagnosis in order to ensure their possible clinical benefit (13,14). The Luminex Xmap²⁰⁰ (flow cytometer technique) is a new diagnostic method, which has been used in laboratory assessment of cytokines and hormones (15), allowing up to 20 cytokine targets to be measured from one single sample. The aim of this study is to validate the reliability of a 7-analyte multiplex assay (Luminex Xmap²⁰⁰) by comparing two different common buffers used for diluting GCF samples, with or without the addition of protease inhibitors.

Material and Methods

- Subjects

11 healthy volunteers were selected from the Faculty of Dentistry of the Complutense University of Madrid, Spain. Subjects were informed about the objectives of this study and they agreed to take part in it by providing written informed consent prior to the sampling collection process.

- Sampling

Three GCF samples were collected from each subject from the disto-buccal site of tooth 11 and the mesio-buccal site of teeth 21 and 22. These samples were randomly assigned to the three following dilution buffer assignments: Tris, Tris+PI and PBS+PI. Another 5 samples of a healthy volunteer were collected from disto-buccal (teeth 12 and 42) and mesio-buccal (teeth 21, 31 and 32) sites to make up the fourth group, the PBS group. Upper and lower anterior teeth were selected in order to avoid sample contamination with oral fluids such as saliva or blood.

Perio® paper strips (Oral Flow Inc., #593520) were used to collect GCF samples using the following technique: once the sites were isolated with cotton rolls and gently air-dried, the Perio® paper strips were inserted in the gingival sulcus for 30 seconds. The paper strips were then inserted in the Periotron 8000® device (Harco, Tustin, CA, USA), previously calibrated to each individual sample to obtain the fluid volume. Following the randomization pattern described before, the strips were placed in the vials containing the studied buffer solutions (Tris, Tris+PI, PBS+PI and PBS) and were centrifuged at 12,500 rpm for 5 minutes at 4°C. The supernatants obtained were stored frozen at -80°C until assayed.

- Immunoassay procedure

Before starting the bioassay, the samples were thawed on ice and once ready for use, they were spun for 10 seconds and centrifuged at 1500 rpm for 15 seconds.

Cytokine profiles were obtained using the X map²⁰⁰ device and processed through the commercial human Luminex[®] kits (Millipore, Watford, UK) following the manufacturer's protocol. In summary, the wells of a 1.2 µm filter bottom 96-well microtiter plates were pre-wetted with assay buffer, then 25µL of the sample and 25 µL of the selected buffer (PBS or Tris-HCl with or without PI) were added to appropriate background, standards and control wells according to the bioassay standard curve. Plates were then incubated in 25 µL of pre-mixed microbeads overnight on an orbital shaker at 4°C, washed twice with wash buffer and then, 25 µL of biotinylated detector antibody was added to each well, and incubated for 1 h at room temperature. Without further washing, 25 µL of streptavidin–phycoerythrin solution was added to each well, and the plates were incubated for 30 minutes at room temperature on a plate shaker, protected from direct light. Before the analysis, microbeads were washed twice in wash buffer and suspended in 100 µL/well of Luminex sheath fluid.

- Standard curve preparation

To prepare the antibody-immobilized beads, the bead diluent (provided in the Millipore kit) was pre-warmed to room temperature, sonicated and shaken for 1 minute. This bead diluent together with 150 µL of analyte beads were added to the Bead Mixing Vial until obtaining 3.0 mL of diluted beads. Serial dilutions of standards in deionized water were performed (0- Background). The levels (pg/mL) of the obtained standard curve are shown in table 1. Before use, quality controls for each cytokine were reconstituted with 250 µL of deionized water, transferred to polypropylene tubes and allowed to settle for 5-10 min.

Table 1. Standard curves of biomarkers for Luminex Xmap²⁰⁰.

Standard	IL-1β/IL-6 (pg/mL)	OPG (pg/mL)	OC (pg/mL)	OPN (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
1	0.49	2.08	17	61	0.4
2	2.00	8.30	68	244	1.5
3	7.80	33.20	273	977	5.9
4	31	132.81	1094	3906	23
5	125	531.25	4375	15625	94
6	500	2125	17500	62500	375
7	2000	8500	70000	250000	1500

- Statistical Analysis

The analysis included assessment of the buffer effect (i.e. differences in mean levels of IL-1β, IL-6, TNF-α, OPG, OPN and OC between PBS and Tris-HCl) and differences in the mean levels of same biomarkers (pg/mL) with the same buffers with or without PI. These comparisons were analyzed using the Mann-Whitney-Wilcoxon test (non-parametric test applied to two inde-

pendent samples) and Dunn's Multiple Comparison test as post-hoc analysis.

Results

Curve adjustment. Table 2 shows the R² cytokines curve fitting for the different buffers analyzed (PBS and Tris-HCl with and without PI). All standard curves of biomarkers attained higher values of R² when using PBS compared to Tris-HCl. When using Tris-HCl, curve adjustment was often low, except for IL-6 and TNF-α, (R²= 0.9178 and 0.9351 respectively), adjustment curve of the other cytokines did not reach up to R²=0.9 value. All data showed that the use of PBS with PI rendered the best adjustment for IL-6; OPG; OC and TNF-α.

Cytokines Analysis. Cytokines IL-1β, IL-6 and TNF-α were more often detected when perio -paper strips were diluted with PBS and PI, compared to those diluted with Tris-HCl buffer (*P*= 0.0099; *P*= 0.0371 and *P*= 0.0284, respectively).

In the group treated with PBS buffer, significantly higher levels of IL-6 (*P*< 0.05) were observed when PI was added. For the rest of the cytokines (IL-1β, OC, OPG and TNF-α), there were also higher levels when adding PI, but differences were not statistically significant (*p*>0.05).

Table 2. Results obtained of R² in calibration curves of cytokines using Tris-HCl and PBS with and without PI.

Cytokines	Tris-HCl		PBS	
	Without PI	With PI	Without PI	With PI
IL-1β	0.8424	0.9955	0.9982	0.9979
IL-6	0.9178	0.9856	0.9992	0.9996
OPG	0.8811	0.9797	0.9972	0.9976
OC	0.8673	0.9924	0.9407	0.9674
OPN	0.8814	0.9981	0.9999	0.9993
TNF-α	0.9351	0.9971	0.9936	0.9942

Discussion

This study shows how positive it is to combine PBS buffer with PI and flow cytometry (Luminex[®]) techniques to obtain a standard curve and detection/quantification of GCF cytokines. We have tried to achieve high accuracy, and our range (biomarkers into GCF) spans low orders of magnitude, so one way to set up the standard curve was comparing two different buffers adding or not PI into the buffer. During the optimization process, several experimental parameters of importance for the method were detected. The affinity and specificity of the antibody–receptor interactions can be significantly altered because proteins present unwanted

ed interactions depending on buffer chemical properties. Simultaneously, low signal strength provides poor quantitative information, which can be compared when using (or not) protease inhibitors into the buffer. To improve this, PI were added to control unwanted catalytic responses and thus improving the results of the assay. When using Tris-HCL buffer, very low or non-detectable positive signals from IL-1 β , OPG, OC and OPN were observed. Analysis of IL-6 and TNF- α rendered variable results with high background and false signals. This result may be due to buffer solubility. On the whole, buffer solubility should be compatible with the soluble protein of interest, coupling receptor chains in unwanted protein-protein interactions and protein-non protein interactions could lead to false signals. As it has been proved, obtaining an optimum curve adjustment by using PBS with PI added (IL-1 β , OPG, OPN, IL-6 and TNF- α) also showed high sensitivity leading to better cytokine sample detection. PBS buffer improved the antigen-antibody binding, which was achieved via reactions involving amino groups on the protein and the carboxyl functional groups on the bead surface. Adding PI to PBS rendered the best results detecting specifically IL-1 β , IL-6 and TNF- α versus using PBS without PI. This is probably due to the control of unwanted catalytic responses, improving the amount of proteins and coupling reactions protein, obtaining best coupling conditions showing low background and obtaining reliable simultaneous detection of cytokines. In conclusion, this study has shown that GCF analysis is strongly influenced by the composition of the buffer solution. Using PBS as a buffer with PI added not only increases sensitivity compared to Tris-HCl buffer, but also provides optimal conditions of protein conjugation. PBS buffer and PI can be used to investigate a broad range of cytokines in inflammatory processes.

References

1. Dutzan N, Vernal R, Hernandez M, Dezerega A, Rivera O, Silva N et al. Levels of interferon-gamma and transcription factor T-bet in progressive periodontal lesions in patients with chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):290-6.
2. Garlet GP, Martins W Jr, Ferreira BR, Milanezi CM, Silva JS. Patterns of chemokines and chemokine receptors expression in different forms of human periodontal disease. *J Periodontol Res*. 2003 Apr;38(2):210-7.
3. Shaddox LM, Wiedey J, Calderon NL, Magnusson I, Bimstein E, Bidwell JA et al. Local inflammatory markers and systemic endotoxin in aggressive periodontitis. *J Dent Res*. 2011 Sep;90(9):1140-4.
4. Wöstmann B, Rehmann P, Balkenhol M. Influence of different retraction techniques on crevicular fluid flow. *Int J Prosthodont*. 2008 May-Jun; 21(3):215-6.
5. Turk B, Turk D, Salvesen GS. Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Curr Pharm Des*. 2002;8(18):1623-37.
6. Guentsch A, Kramesberger M, Sroka A, Pfister W, Potempa J, Eick S. Comparison of gingival crevicular fluid sampling methods in patients with severe chronic periodontitis. *J Periodontol*. 2011 Jul;82(7):1051-60.
7. Ciantar M, Caruana DJ. Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *J Periodontol Res*. 1998 Jul;33(5):259-64.
8. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontol*. 2003;31:32-42.
9. Doble P, Macka M, Haddad PR. Factors influencing the choice of buffer in background electrolytes for indirect detection of fast anions by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998 Sep;19(12):2257-61.
10. Gómez G, Pikal MJ, Rodríguez-Hornedo N. Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions. *Pharm Res*. 2001 Jan;18(1):90-7.
11. Wadhwa M, Thorpe R. Cytokine immunoassays: recommendations for standardisation, calibration and validation. *J Immunol Methods*. 1998 Oct 1;219(1-2):1-5.
12. Mire-Sluis AR, Gaines-Das R, Thorpe R. Immunoassays for detecting cytokines: what are they really measuring? *J Immunol Methods*. 1995 Oct 26;186(2):157-60.
13. Findlay JW, Smith WC, Lee JW, Nordblom GD, Das I, DeSilva BS et al. Validation of immunoassays for bioanalysis: a pharmaceutical industry perspective. *J Pharm Biomed Anal*. 2000 Jan;21(6):1249-73.
14. Mire-Sluis AR, Barrett YC, Devanarayan V, Koren E, Liu H, Maia M, et al. Recommendations for the design and optimization of immunoassays used in the detection of host antibodies against biotechnology products. *J Immunol Methods*. 2004 Jun;289(1-2):1-16.
15. Dupont NC, Wang K, Wadhwa PD, Culhane JF, Nelson EL. Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *J Reprod Immunol*. 2005 Aug;66(2):175-91.

7. Discusión

7. Discusión

El proceso biológico por el que un diente se mueve a través del hueso alveolar sigue siendo una incógnita desde el punto de vista molecular. Cada día esta incógnita se hace más pequeña gracias al esfuerzo de muchos investigadores por descubrir nuevos marcadores biológicos y la puesta a punto de los diferentes métodos diagnósticos que existen para aplicar en este campo. Desde el primer estudio experimental que evidenció el papel de las citoquinas en el movimiento ortodóncico, publicado por Davidovich y colaboradores en 1988 (Davidovitch, Nicolay, Ngan, & Shanfeld, 1988), se han realizado cientos de investigaciones con el objetivo de dilucidar las incógnitas que siguen existiendo detrás del entramado de mediadores bioquímicos que favorecen la formación y destrucción del hueso alveolar o, también denominado, remodelado óseo que se produce durante el movimiento ortodóncico.

Esta serie de tres artículos pretende sentar las bases de una línea de investigación que ayude a descifrar todo este entramado de factores bioquímicos que intervienen en el remodelado óseo, ya sea hacia la formación o la destrucción ósea, durante el movimiento ortodóncico.

Para conseguir este objetivo hay que centrar los esfuerzos en dos puntos bien diferenciados; qué y cómo. Por un lado necesitamos saber qué queremos medir; qué estamos buscando. Para ello nos tenemos que apoyar en la literatura publicada hasta la fecha. Esta literatura la podemos dividir en tres bloques: estudios sobre biomarcadores de formación y destrucción ósea a nivel general, estudios sobre factores bioquímicos relacionados con el remodelado del hueso alveolar, y estudios que analizan este remodelado alveolar bajo la aplicación de fuerzas ortodóncicas. El segundo punto en el que tenemos que centrar nuestros esfuerzos es en el cómo lo vamos a medir. Una vez decidida la lista de moléculas que queremos estudiar tenemos que averiguar y tomar la decisión sobre qué métodos diagnósticos pueden ser los más adecuados para el estudio de estos factores bioquímicos que estamos buscando.

El primer artículo es un estudio piloto en el que pretendemos evaluar la presencia de varios biomarcadores mediante una única toma de muestra y la utilización de una técnica de medición denominada Searchlight, que no deja de ser un ELISA para análisis múltiple. Entre sus ventajas destacan la menor cantidad de muestra necesaria, menor tiempo de procesado y mayor facilidad de ejecución (Bastarache et al., 2011). El inconveniente es que si no se utiliza un kit estándar, la cantidad de muestra necesaria es un poco mayor para permitir hacer comprobaciones de ausencia de interacciones entre los diferentes antígenos y anticuerpos. Esta es la razón por la que utilizamos 135 μ l en lugar de la cantidad mínima recomendada por la casa comercial (Endogen, Pierce Biotechnology, Rockford) que era de 50 μ l. Aún así, sigue siendo una cantidad claramente inferior a la que se utilizaría en 4 kits de ELISA convencionales que rondarían los 100 μ l por cada molécula a estudiar. La razón de dar los resultados de tres formas diferentes viene dada por la falta de uniformidad en la literatura. Por esta razón decidimos hacer la estadística en base a: cantidad total de la proteína a estudiar en la muestra (picogramos: pg), concentración de la molécula a estudiar en relación al volumen de muestra adquirido (pg/ μ L), y cantidad del biomarcador en relación al número total de proteínas en la muestra (pg/ μ g). Así, el estudio simultáneo de RANK, OPG, OPN y TGF- β 1 en el lado de presión, tensión y control permitió obtener resultados estadísticamente significativos para todos excepto OPN. La presencia de RANK demostró diferencias a los 7 días entre los lados de presión, tensión y control en relación a los niveles totales de citoquinas (picogramos) y también al expresar los valores de citoquinas en relación al número total de proteínas (pg/ μ g). Estas diferencias no se evidenciaron al hacer el análisis estadístico *post hoc* dos a dos. Las variaciones en los niveles de esta molécula afecta en general al sistema OPG/RANKL/RANK cuya relación con el remodelado óseo lleva investigándose desde 1997 (Simonet et al., 1997). En el caso de OPG, las diferencias entre las tres localizaciones (tensión, presión, control) ocurrieron a las 24 horas al expresar los resultados en pg/ μ L. El estudio *post hoc* demostró mayores niveles en el lado control que en el de presión. Este resultado y el de estudios similares (Flórez-Moreno, Isaza-Guzmán, & Tobón-Arroyave, 2013; Kawasaki et al., 2006; Nishijima et al., 2006; Toygar et al., 2008) sugieren una menor concentración de OPG, marcador asociado con aposición ósea, en localizaciones

donde se produce reabsorción ósea. Incluso estos valores coinciden con una revisión sistemática publicada recientemente (Kapoor, Kharbanda, Monga, Miglani, & Kapila, 2014) en la que se puede observar que en la mayoría de los estudios en los que se investiga la presencia de OPG, esta disminuye sus valores a las 24 horas.

Por último, TGF- β 1 evidenció diferencias a los 7 días entre las tres localizaciones al expresar los resultados en picogramos. Además, estos valores fueron mayores en el lado de presión al compararlos dos a dos con el lado de tensión y control. Estos resultados coinciden con aquellos estudios que consideran esta molécula relacionada con la destrucción ósea (Itonaga et al., 2004; Pilkington et al., 2001).

Somos conscientes de que el diseño del estudio es complejo. Los controles se miden a las 0 horas y 7 días, mientras que los test (presión y tensión) a las 24 horas y 7 días. La razón fundamental que justifica la ausencia de controles a las 24 horas y de test a las 0 horas es simplemente el intento de ubicar todas las mediciones en una única placa de 96 pocillos para obtener la mayor cantidad posible de datos. Al ser un estudio piloto, asumimos la ausencia de diferencias entre control y test antes de la aplicación de las fuerzas (0 horas) en base a la literatura publicada hasta el momento (Dudic et al., 2006; Kawasaki et al., 2006; Nishijima et al., 2006; Uematsu et al., 1996). De igual forma consideramos la ausencia de cambios en las localizaciones control a lo largo del estudio por lo que se omite la medición a las 24 horas (Kawasaki et al., 2006; Nishijima et al., 2006; Uematsu et al., 1996). También hay que decir que en este estudio no se evidenciaron diferencias en los controles entre las 0 horas y los 7 días, ni tampoco entre las mediciones realizadas en vestibular y lingual para ninguna de las moléculas estudiadas. Esto podría significar que estos marcadores se ven modificados únicamente cuando se producen alteraciones significativas en el metabolismo óseo. En todo caso, de no tratarse de un estudio piloto lo ideal sería medir todas las localizaciones en cada momento. Para completar esta información es interesante ver que de los 39 estudios seleccionados en la revisión sistemática de Kapoor (Kapoor et al., 2014), en 12 de ellos utilizan los valores iniciales como controles.

El segundo estudio centró nuestros esfuerzos en averiguar la presencia de calcitonina en el fluido crevicular y valorar la posibilidad de la existencia de alguna diferencia entre el

lado de presión, tensión y control al aplicar una fuerza ortodónica. Al mismo tiempo evaluamos la posibilidad de la existencia de relación entre los niveles de calcitonina y la percepción de dolor por parte del paciente. En este caso el método de diagnóstico escogido fue el western blot, fundamentalmente por tratarse de un análisis muy testado y fiable ya que la molécula en cuestión no había sido medida previamente en estudios de este tipo. Al contrario de lo que se esperaba, los valores iniciales no fueron similares entre las diferentes localizaciones por lo que decidimos hacer el análisis estadístico en función al porcentaje de cambios producidos en relación a los valores obtenidos al inicio del estudio. Esto pone aun más en duda el diseño del primer estudio al no tomar muestras de todas las localizaciones en baseline pero hay que reconocer que en ningún momento pensábamos encontrar estas diferencias. Incluso podría deberse exclusivamente a esta molécula, la calcitonina, ya que en estudios previos los valores en baseline eran más parecidos entre las diferentes localizaciones para el estudio de diferentes citoquinas (Dudic et al., 2006). De hecho, como se mencionó previamente, en un tercio de los estudios analizados en la última revisión sistemática realizada hasta la fecha (Kapoor et al., 2014), utilizan como controles los valores obtenidos en *baseline*.

Los resultados evidenciaron el mayor incremento de niveles de calcitonina en el intervalo entre 1 hora y 7 días en el lado de presión. También se detectaron diferencias estadísticamente significativas a favor del lado de presión respecto al de tensión a los 7 días. Estos incrementos en el lado de presión concuerdan con estudios que reportan actividad de calcitonina en situaciones de disminución de la concentración de calcio en estados patológicos de incremento de reabsorción ósea, fundamentalmente por medio de la inhibición de la actividad osteoclástica (Marzia et al., 2006; Nakamura et al., 2005; A. G. Turner et al., 2011). Todo esto hace pensar que la calcitonina participa en el remodelado óseo y en su equilibrio, ya que se considera una hormona relacionada con la disminución de la destrucción ósea y pudimos detectar su aumento en el lado de presión, justamente la zona donde se produce la destrucción ósea.

Respecto a la evaluación del dolor experimentado por los pacientes y los niveles de calcitonina, se demostró una relación negativa. Es decir, los mayores incrementos en los niveles de calcitonina coincidieron con la disminución de las molestias experimentadas

por los pacientes. Esto concuerda con la literatura que identifica a esta hormona como anti-reabsortiva y analgésica (Knopp-Sihota et al., 2012; Ofluoglu et al., 2007; A. G. Turner et al., 2011). No se conoce con exactitud las razones de este efecto analgésico pero entre las diferentes hipótesis destacan aquellas que defienden una acción central (Azria, 2002; Nakamoto, Soeda, Takami, Minami, & Satoh, 2000), inhibición de la síntesis de PGE₂ y tromboxano (Ceserani, Colombo, Olgiati, & Pecile, 1979; Pecile, 1992), y la estimulación de liberación de β -endorfina (Franceschini, Cataldi, Barreca, Salvemini, & Rolandi, 1989; Ofluoglu et al., 2007; Pecile, 1992). Todo lo contrario parece ocurrir con otros mediadores inflamatorios como es el caso de la IL-1 β . Probablemente sea la interleuquina más estudiada en el campo del remodelado del hueso alveolar y la mayoría de los estudios coinciden en que su pico suele producirse a las 24 horas (Kapoor et al., 2014). Precisamente en ese momento se producen las mayores molestias detectadas por los pacientes en nuestro estudio, resultado que coincide con los publicados por Dudic (Dudic et al., 2006) y que lo relacionan con mayores niveles de IL-1 β . Luppapornlarp fue un poco más allá (Luppapornlarp, Kajii, Surarit, & Iida, 2010) y detectó que estos incrementos de IL-1 β eran aún mayores en relación a la magnitud de las fuerzas (50gr Vs 150gr) y, por consiguiente, el dolor percibido por el paciente también era mayor.

El tercer y último estudio tiene como objetivo evaluar la utilización de dos soluciones buffer diferentes para la detección de varias citoquinas inflamatorias (IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN, OC) al mismo tiempo en fluido crevicular mediante técnica de citometría de flujo con Luminex. Este método diagnóstico se basa en un array de proteínas en fase líquida donde los anticuerpos están unidos a unas microesferas. Se fundamenta también en el principio del ELISA sandwich pero en vez de detectar quimioluminiscencia se detecta fluorescencia (duPont et al., 2005; Elshal & McCoy, 2006; Nolan & Mandy, 2006). Hay que asumir que todo método diagnóstico es susceptible de error. Comenzando por la propia toma de la muestra con una posible contaminación con fluidos orales, pasando por la elección del buffer para la dilución de las muestras y el mantenimiento de las condiciones óptimas evitando la degradación producida por las proteasas del fluido crevicular, terminando por el propio método diagnóstico que necesita seguir unos pasos bien definidos y estrictos que no permiten variaciones (B. Turk, Turk, & Salvesen, 2002;

Wöstmann et al., 2008). Las ventajas de usar sistemas de detección múltiple son claros: ahorro de tiempo y esfuerzo, menor cantidad de muestra necesaria, menor cantidad de material de detección necesario con el consecuente ahorro económico (Bastarache et al., 2011; duPont et al., 2005; Elshal & McCoy, 2006; Moskowitz et al., 2012). A pesar de ello son técnicas que requieren mucha puesta a punto, y esa es la razón de este tercer artículo. En este caso se valoró la utilización de dos buffers diferentes con y sin la adición de inhibidores de proteasas. Al comparar el buffer Tris-HCl (tris hidroximetil aminometano hidrocioruro) y el PBS (buffer fosfato salino o tampón fosfato salino), los mejores resultados se obtuvieron con el segundo de ellos. Al analizar el uso de inhibidores de proteasas, en ambas soluciones tampón mejoraron las curvas de detección al añadir este componente. De hecho, al utilizar Tris-HCl sin inhibidor de proteasas, la detección de IL-1 β , OPG, OC y OPN fue nula o prácticamente nula. Por tanto, en este último artículo se concluye que la solución tampón utilizada resulta determinante a la hora de obtener resultados positivos en la detección de diferentes biomarcadores, y que el PBS con inhibidores de proteasas resultó ser la solución tampón más adecuada para el análisis de citoquinas en fluido crevicular mediante la técnica de citometría de flujo con Luminex. De hecho, el único artículo publicado hasta la fecha que analiza múltiples citoquinas al mismo tiempo con la tecnología Luminex durante el movimiento ortodóncico, también utiliza una solución tampón de PBS (Grant, Wilson, Rock, & Chapple, 2013).

A la hora de escoger una solución tampón o buffer, hay varias consideraciones importantes a tener en cuenta como el pH, la salinidad y los detergentes. El pH puede afectar la actividad de las proteasas, la solubilidad puede incrementarse con pequeñas cantidades de sal, y los detergentes con carga pueden afectar al posterior análisis. El PBS puede ayudar a minimizar estas variaciones permitiendo la uniformidad de las proteínas, manteniendo un pH constante y presentando niveles de osmolaridad y concentraciones de iones similares a los presentes en el ser humano (Gómez, Pikal, & Rodríguez-Hornedo, 2001). Tris-HCl, debido a su naturaleza, posiblemente cause importantes interacciones entre proteínas. Por otro lado, la extracción de proteínas lleva implícita la posible degradación de las mismas por lo que un inhibidor de proteasas puede resultar útil en

este tipo de análisis (B. Turk et al., 2002), dato corroborado en este tercer y último artículo.

Llegados a este punto, ¿qué podemos esperar de esta línea de investigación?. ¿A dónde nos llevan estos resultados y otros publicados hasta la fecha?. Resulta muy complicado saber dónde nos encontraremos dentro de aproximadamente 10 años. Toda respuesta no deja de ser una mera especulación. De todos modos, como investigadores y científicos sí podríamos justificar todo este esfuerzo. En primer lugar, la investigación básica biomolecular es fundamental para entender los procesos biológicos que nos rodean. En este caso el movimiento de los dientes a través del hueso alveolar. Por ejemplo, el hecho de que el ratio RANKL/OPG sea mayor en jóvenes que en adultos podría justificar, en parte, la razón de que el movimiento ortodóncico resulte más sencillo en este primer tipo de pacientes (Kawasaki et al., 2006). Resulta mucho más sencillo buscar nuevas técnicas o métodos terapéuticos ortodóncicos conociendo la biología. Dejando a un lado la faceta de científico y poniéndonos la bata de clínico, ¿qué queremos conseguir para nuestros futuros pacientes de ortodoncia? Partiendo de la base obvia de conseguir el mejor resultado terapéutico posible; la mayor velocidad en el movimiento y la ausencia de molestias por parte de los pacientes son dos de los deseos más buscados por cualquier profesional que realice tratamientos ortodóncicos. ¿Qué ocurriría si fuéramos capaces de acelerar el tratamiento ortodóncico y reducir las molestias producidas por el mismo con la simple administración de un fármaco? Hoy día se están realizando muchos estudios con este fin. Recientemente Nimeri y cols. (Nimeri, Kau, Abou-Kheir, & Corona, 2013) publicaron una revisión de 74 artículos desde 1959 a 2013 con los diferentes métodos publicados para acelerar el procedimiento ortodóncico. Algunas de las justificaciones más utilizadas por los autores es la disminución del número de caries, recesiones gingivales y reabsorciones radiculares. Dividieron todas las técnicas y métodos en 4 grandes grupos: técnicas biomecánicas, métodos físicos, técnicas quirúrgicas y métodos biológicos. La biomecánica ha sufrido muchos cambios en los últimos años y quizás sea el grupo de los cuatro que más se ha desarrollado y más inversión ha recibido. Brackets de baja fricción, aleaciones de níquel-titanio, uso de microimplantes, entre otros, proporcionaron mejoras en términos generales de resultados en los tratamientos pero también, en muchos casos,

de aceleración de este proceso. Los métodos físicos investigados hasta la fecha para acelerar el movimiento ortodóncico son la vibración, corriente eléctrica y láser de baja frecuencia. Estudios en animales observaron incrementos de aceleración entre un 15-30% al aplicar vibraciones con diferentes frecuencias y potencias (Kakehi, Yamazaki, Tsugawa, & Sode, 2007; Nishimura et al., 2008). Resultados similares se han conseguido con el uso de corriente eléctrica en la zona a tratar, una vez más en un estudio en animales (Davidovitch et al., 1980). En tercer y último lugar está la aplicación del láser de baja frecuencia o también llamada fotobiomodulación. Existe mucha expectativa al respecto y es una de las líneas de investigación que más importancia está adquiriendo en estos últimos años. Se realizaron estudios en ratas (Fujita, Yamaguchi, Utsunomiya, Yamamoto, & Kasai, 2008; Kawasaki & Shimizu, 2000) y en humanos (Doshi-Mehta & Bhad-Patil, 2012) pero todos los autores coinciden en que falta mucho por investigar aunque los resultados son esperanzadores. Respecto a las técnicas quirúrgicas que aceleran o pueden acelerar el movimiento ortodóncico es lógico pensar que así sea. El propio acto quirúrgico y, más aún, cualquier osteoplastia u ostectomía controlada va a producir un proceso de inflamación que ayudará y favorecerá el remodelado óseo. Entre las técnicas más utilizadas están las corticotomías. Desde sus inicios a finales de los años 50 por parte de Köle (KOLE, 1959), se han publicado muchas técnicas, en gran medida con el objetivo de hacerlas menos cruentas. De echo, ese punto es justamente uno de los más criticados y la razón de su bajo uso. Esto está cambiando gracias a técnicas como la descrita por Dibart bajo el nombre de Piezocision (Dibart, Surmenian, Sebaoun, & Montesani, 2010). Esta técnica es mucho menos invasiva que las descritas hasta la fecha y se basa en la utilización del piezoeléctrico a través de unas pequeñas incisiones verticales en mucosa alveolar que se realizan entre cada diente con el objetivo de permitir la entrada de la punta del piezoeléctrico y crear unas pequeñas ostectomías. Esto animó a otros autores a corroborar el aumento de la velocidad ortodóncica, incluso combinándola con técnicas más recientes como el Invisalign (Keser & Dibart, 2011). De todas formas y pensando desde un punto de vista biológico, lo interesante es favorecer la llegada de mediadores inflamatorios que favorezcan el movimiento. De ahí que se realizaran estudios con técnicas mucho más sencillas como simples perforaciones corticales para aumentar la

llegada de mediadores inflamatorios a la zona, tanto en ratas (Alikhani et al., 2013) como en humanos (Teixeira et al., 2010).

Volviendo a la revisión de Nimeri y cols. del 2013, el cuarto y último grupo de técnicas para acelerar el movimiento ortodóncico es el método biológico. Se entiende como tal cualquier procedimiento biomolecular que modifique la cascada de acontecimientos que se suceden desde el inicio de la aplicación de la fuerza ortodóncica. Por ejemplo, en el 2006 se publicó un artículo en el que se pudo comprobar en ratas un aumento de la velocidad del movimiento dental tras la aplicación de RANKL (Kanzaki, Chiba, Arai, et al., 2006a) y, de igual forma, una disminución del movimiento con la aplicación de OPG (Kanzaki et al., 2004). La administración de diferentes prostaglandinas también se ha asociado a mayores movimientos ortodóncicos pero siempre en estudios en animales, ya sea en ratas (Leiker, Nanda, Currier, Howes, & Sinha, 1995; Seifi, Eslami, & Saffar, 2003; Yamasaki, Miura, & Suda, 1980) o en monos (Yamasaki, Shibata, & Fukuhara, 1982). El inconveniente de estos métodos es controlar los posibles efectos secundarios o nocivos. De ahí que sea tan importante el estudio de los factores que más directamente influyen en la formación y destrucción del hueso alveolar.

Por todo ello, resulta fundamental seguir desarrollando esta línea de investigación para encontrar respuesta a las múltiples preguntas que aún siguen sin contestarse. El desarrollo de nuevos métodos diagnóstico y la puesta a punto de los actualmente utilizados serán algunas de las tareas a realizar en sucesivos años para aumentar el conocimiento de todos los biomarcadores que participan en el movimiento ortodóncico y para en un futuro, esperemos no muy lejano, poder utilizarlos para acelerar el movimiento y disminuir sus molestias.

8. Conclusiones

8. Conclusiones

1/ Los tres métodos diagnósticos utilizados son válidos para la detección de mediadores bioquímicos en el fluido crevicular.

2/ El método diagnóstico de análisis múltiple denominado Searchlight permitió detectar la expresión de RANK, OPG, OPN y TGF- β 1 comparando lado de presión, tensión y control durante el movimiento ortodóncico inicial.

3/ El análisis múltiple de RANK, OPG, OPN y TGF- β 1 mediante Searchlight no detectó cambios en las localizaciones controles durante el movimiento ortodóncico inicial.

4/ La concentración de OPG disminuyó significativamente en el lado de presión a las 24 horas de la aplicación de una fuerza ortodóncica.

5/ Los niveles de RANK mostraron diferencias significativas entre los lados de tensión, presión y control a los 7 días de la aplicación de una fuerza ortodóncica.

6/ Los niveles de TGF- β 1 aumentaron en el lado de presión al compararlos con el lado de tensión y control a los 7 días del inicio de la fuerza ortodóncica.

7/ El análisis del fluido crevicular mediante la técnica de western blot evidenció un incremento de niveles de calcitonina en el intervalo entre 1 hora y 7 días en el lado de compresión al aplicar una fuerza ortodóncica.

8/ Se detectaron diferencias estadísticamente significativas respecto a niveles de calcitonina a favor del lado de compresión respecto al de tensión a los 7 días desde el inicio de la aplicación de la fuerza ortodóncica.

9/ Se demostró una relación negativa entre los niveles de calcitonina y la percepción de dolor por parte del paciente al que se le aplica una fuerza ortodónica. Los mayores incrementos en los niveles de calcitonina coincidieron con la disminución de las molestias experimentadas por los pacientes.

10/ La utilización de una solución tampón PBS resultó mejor que otra a base de Tris-HCl para la medición múltiple de IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN y OC mediante citometría de flujo con Luminex.

11/ La adición de un inhibidor de proteasas a las soluciones tampón mejoraron los resultados para la detección de IL-1 β , IL-6, TNF- α , OPG, OPN, OC.

9. Bibliografía

9. Bibliografía

1. Alhashimi, N., Frithiof, L., Brudvik, P., & Bakhiet, M. (2001). Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 119(3), 307–312.
2. Alikhani, M., Raptis, M., Zoldan, B., Sangsuwon, C., Lee, Y. B., Alyami, B., et al. (2013). Effect of micro-osteoperforations on the rate of tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 144(5), 639–648.
3. Araújo, M. G., & Lindhe, J. (2005). Dimensional ridge alterations following tooth extraction. An experimental study in the dog. *Journal of Clinical Periodontology*, 32(2), 212–218.
4. Azria, M. (2002). Possible mechanisms of the analgesic action of calcitonin. *Bone*, 30(5 Suppl), 80S–83S.
5. Bastarache, J. A., Koyama, T., Wickersham, N. E., Mitchell, D. B., Mernaugh, R. L., & Ware, L. B. (2011). Accuracy and reproducibility of a multiplex immunoassay platform: a validation study. *Journal of Immunological Methods*, 367(1-2), 33–39.
6. Bister, D., & Meikle, M. C. (2013). Re-examination of “Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung” (Some contributions to the theory of the regulation of teeth) published in 1904-1905 by Carl Sandstedt. *European Journal of Orthodontics* (Vol. 35, pp. 160–168).
7. Brady, T. A., Piesco, N. P., Buckley, M. J., Langkamp, H. H., Bowen, L. L., & Agarwal, S. (1998). Autoregulation of periodontal ligament cell phenotype and functions by transforming growth factor-beta1. *Journal of Dental Research*, 77(10), 1779–1790.
8. Bucay, N., Sarosi, I., Dunstan, C. R., Morony, S., Tarpley, J., Capparelli, C., et al. (1998). Osteoprotegerin-deficient mice develop early onset osteoporosis and arterial calcification. *Genes & Development*, 12(9), 1260–1268.

9. Cantarella, G., Cantarella, R., Caltabiano, M., Risuglia, N., Bernardini, R., & Leonardi, R. (2006). Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 130(5), 568.e11–6.
10. Cate, Ten, A. R. (1997). The development of the periodontium--a largely ectomesenchymally derived unit. *Periodontology 2000*, 13, 9–19.
11. Ceserani, R., Colombo, M., Olgiati, V. R., & Pecile, A. (1979). Calcitonin and prostaglandin system. *Life Sciences*, 25(21), 1851–1855.
12. Davidovitch, Z., Finkelson, M. D., Steigman, S., Shanfeld, J. L., Montgomery, P. C., & Korostoff, E. (1980). Electric currents, bone remodeling, and orthodontic tooth movement. II. Increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotide levels by combined force and electric current. *American Journal of Orthodontics*, 77(1), 33–47.
13. Davidovitch, Z., Nicolay, O. F., Ngan, P. W., & Shanfeld, J. L. (1988). Neurotransmitters, cytokines, and the control of alveolar bone remodeling in orthodontics. *Dental Clinics of North America*, 32(3), 411–435.
14. de Paula, F. J. A., & Rosen, C. J. (2010). Back to the future: revisiting parathyroid hormone and calcitonin control of bone remodeling. *Hormone and Metabolic Research*, 42(5), 299–306.
15. Dibart, S., Surmenian, J., Sebaoun, J. D., & Montesani, L. (2010). Rapid treatment of Class II malocclusion with piezocision: two case reports. *The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*, 30(5), 487–493.
16. Doshi-Mehta, G., & Bhad-Patil, W. A. (2012). Efficacy of low-intensity laser therapy in reducing treatment time and orthodontic pain: a clinical investigation. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 141(3), 289–297.
17. Dudic, A., Kiliaridis, S., Mombelli, A., & Giannopoulou, C. (2006). Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *European Journal of Oral Sciences*, 1–7.

18. Dunn, M. D., Park, C. H., Kostenuik, P. J., Kapila, S., & Giannobile, W. V. (2007). Local delivery of osteoprotegerin inhibits mechanically mediated bone modeling in orthodontic tooth movement. *Bone*, 41(3), 446–455.
19. duPont, N. C., Wang, K., Wadhwa, P. D., Culhane, J. F., & Nelson, E. L. (2005). Validation and comparison of luminex multiplex cytokine analysis kits with ELISA: determinations of a panel of nine cytokines in clinical sample culture supernatants. *Journal of Reproductive Immunology*, 66(2), 175–191.
20. Elshal, M. F., & McCoy, J. P. (2006). Multiplex bead array assays: performance evaluation and comparison of sensitivity to ELISA. *Methods (San Diego, Calif.)*, 38(4), 317–323.
21. Fisher, L. W., McBride, O. W., Termine, J. D., & Young, M. F. (1990). Human bone sialoprotein. Deduced protein sequence and chromosomal localization. *The Journal of Biological Chemistry*, 265(4), 2347–2351.
22. Flórez-Moreno, G. A., Isaza-Guzmán, D. M., & Tobón-Arroyave, S. I. (2013). Time-related changes in salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG through orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 143(1), 92–100.
23. Franceschini, R., Cataldi, A., Barreca, T., Salvemini, M., & Rolandi, E. (1989). Plasma beta-endorphin, ACTH and cortisol secretion in man after nasal spray administration of calcitonin. *European Journal of Clinical Pharmacology*, 37(4), 341–343.
24. Fujihara, S., Yokozeki, M., Oba, Y., Higashibata, Y., Nomura, S., & Moriyama, K. (2006). Function and regulation of osteopontin in response to mechanical stress. *Journal of Bone and Mineral Research*, 21(6), 956–964.
25. Fujita, S., Yamaguchi, M., Utsunomiya, T., Yamamoto, H., & Kasai, K. (2008). Low-energy laser stimulates tooth movement velocity via expression of RANK and RANKL. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 11(3), 143–155.
26. Garlet, T. P., Coelho, U., Silva, J. S., & Garlet, G. P. (2007). Cytokine expression pattern in compression and tension sides of the periodontal ligament during

- orthodontic tooth movement in humans. *European Journal of Oral Sciences*, 115(5), 355–362.
27. Gómez, G., Pikal, M. J., & Rodríguez-Hornedo, N. (2001). Effect of initial buffer composition on pH changes during far-from-equilibrium freezing of sodium phosphate buffer solutions. *Pharmaceutical Research*, 18(1), 90–97.
28. Grant, M., Wilson, J., Rock, P., & Chapple, I. (2013). Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *European Journal of Orthodontics*, 35(5), 644–651.
29. Griffiths, G. S., Moulson, A. M., Petrie, A., & James, I. T. (1998). Evaluation of osteocalcin and pyridinium crosslinks of bone collagen as markers of bone turnover in gingival crevicular fluid during different stages of orthodontic treatment. *Journal of Clinical Periodontology*, 25(6), 492–498.
30. Hannon, R. A., & Eastell, R. (2006). Bone markers and current laboratory assays. *Cancer Treatment Reviews*, 32 Suppl 1, 7–14.
31. Heinegård, D., Hultenby, K., Oldberg, A., Reinholt, F., & Wendel, M. (1989). Macromolecules in bone matrix. *Connective Tissue Research*, 21(1-4), 3–11; discussion 12–4.
32. Hofbauer, L. C., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Spelsberg, T. C., Riggs, B. L., & Khosla, S. (1999). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells. *Bone*, 25(3), 255–259.
33. Hong, S. L., Polsky-Cynkin, R., & Levine, L. (1976). Stimulation of prostaglandin biosynthesis by vasoactive substances in methylcholanthrene-transformed mouse BALB/3T3. *The Journal of Biological Chemistry*, 251(3), 776–780.
34. Hughes, F. J., Turner, W., Belibasakis, G., & Martuscelli, G. (2006). Effects of growth factors and cytokines on osteoblast differentiation. *Periodontology 2000*, 41(1), 48–72.
35. Ishijima, M., Tsuji, K., Rittling, S. R., Yamashita, T., Kurosawa, H., Denhardt, D. T., et al. (2002). Resistance to unloading-induced three-dimensional bone loss in

- osteopontin-deficient mice. *Journal of Bone and Mineral Research*, 17(4), 661–667.
36. Isik, F., Sayinsu, K., Arun, T., & Unlüçerçi, Y. (2005). Bone marker levels in gingival crevicular fluid during orthodontic intrusive tooth movement: a preliminary study. *The Journal of Contemporary Dental Practice*, 6(2), 27–35.
37. Itonaga, I., Sabokbar, A., Sun, S. G., Kudo, O., Danks, L., Ferguson, D., et al. (2004). Transforming growth factor-beta induces osteoclast formation in the absence of RANKL. *Bone*, 34(1), 57–64.
38. Ivaska, K. K., Hentunen, T. A., Vääräniemi, J., Ylipahkala, H., Pettersson, K., & Väänänen, H. K. (2004). Release of intact and fragmented osteocalcin molecules from bone matrix during bone resorption in vitro. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(18), 18361–18369.
39. Janssens, K., Dijke, ten, P., Janssens, S., & Van Hul, W. (2005). Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocrine Reviews*, 26(6), 743–774.
40. Kakehi, N., Yamazaki, T., Tsugawa, W., & Sode, K. (2007). A novel wireless glucose sensor employing direct electron transfer principle based enzyme fuel cell. *Biosensors & Bioelectronics*, 22(9-10), 2250–2255.
41. Kanaan, R. A., & Kanaan, L. A. (2006). Transforming growth factor beta1, bone connection. *Med Sci Monit*, 12(8), RA164–9.
42. Kanzaki, H., Chiba, M., Arai, K., Takahashi, I., Haruyama, N., Nishimura, M., & Mitani, H. (2006a). Local RANKL gene transfer to the periodontal tissue accelerates orthodontic tooth movement. *Gene Therapy*, 13(8), 678–685.
43. Kanzaki, H., Chiba, M., Sato, A., Miyagawa, A., Arai, K., Nukatsuka, S., & Mitani, H. (2006b). Cyclical tensile force on periodontal ligament cells inhibits osteoclastogenesis through OPG induction. *Journal of Dental Research*, 85(5), 457–462.
44. Kanzaki, H., Chiba, M., Takahashi, I., Haruyama, N., Nishimura, M., & Mitani, H. (2004). Local OPG gene transfer to periodontal tissue inhibits orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, 83(12), 920–925.

45. Kapoor, P., Kharbanda, O. P., Monga, N., Miglani, R., & Kapila, S. (2014). Effect of orthodontic forces on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid: a systematic review. *Progress in Orthodontics*, 15, 65.
46. Karsdal, M. A., Henriksen, K., Arnold, M., & Christiansen, C. (2008). Calcitonin: a drug of the past or for the future? Physiologic inhibition of bone resorption while sustaining osteoclast numbers improves bone quality. *BioDrugs : Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, 22(3), 137–144.
47. Kawasaki, K., & Shimizu, N. (2000). Effects of low-energy laser irradiation on bone remodeling during experimental tooth movement in rats. *Lasers in Surgery and Medicine*, 26(3), 282–291.
48. Kawasaki, K., Takahashi, T., Yamaguchi, M., & Kasai, K. (2006). Effects of aging on RANKL and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 9(3), 137–142.
49. Keser, E. I., & Dibart, S. (2011). Piezocision-assisted Invisalign treatment. *Compendium of Continuing Education in Dentistry*, 32(2), 46–8– 50–1.
50. Khosla, S. (2001). Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. *Endocrinology*, 142(12), 5050–5055.
51. Kim, T., Handa, A., Iida, J., & Yoshida, S. (2007). RANKL expression in rat periodontal ligament subjected to a continuous orthodontic force. *Archives of Oral Biology*, 52(3), 244–250.
52. Knopp-Sihota, J. A., Newburn-Cook, C. V., Homik, J., Cummings, G. G., & Voaklander, D. (2012). Calcitonin for treating acute and chronic pain of recent and remote osteoporotic vertebral compression fractures: a systematic review and meta-analysis. *Osteoporosis International*, 23(1), 17–38.
53. KOLE, H. (1959). Surgical operations on the alveolar ridge to correct occlusal abnormalities. *Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology*, 12(5), 515–29 concl.
54. Kong, Y. Y., Yoshida, H., Sarosi, I., Tan, H. L., Timms, E., Capparelli, C., et al. (1999). OPG is a key regulator of osteoclastogenesis, lymphocyte development and lymph-node organogenesis. *Nature*, 397(6717), 315–323.

55. Kurihara, S., & Enlow, D. H. (1980). An electron microscopic study of attachments between periodontal fibers and bone during alveolar remodeling. *American Journal of Orthodontics*, 77(5), 516–531.
56. Kuroda, S., Balam, T. A., Sakai, Y., Tamamura, N., & Takano-Yamamoto, T. (2005). Expression of osteopontin mRNA in odontoclasts revealed by in situ hybridization during experimental tooth movement in mice. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 23(2), 110–113.
57. Lee, K.-J., Park, Y.-C., Yu, H.-S., Choi, S. H., & Yoo, Y.-J. (2004). Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1beta and prostaglandin E2 production in gingival crevicular fluid. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 125(2), 168–177.
58. Leiker, B. J., Nanda, R. S., Currier, G. F., Howes, R. I., & Sinha, P. K. (1995). The effects of exogenous prostaglandins on orthodontic tooth movement in rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 108(4), 380–388.
59. Li, J., Sarosi, I., Yan, X. Q., Morony, S., Capparelli, C., Tan, H. L., et al. (2000). RANK is the intrinsic hematopoietic cell surface receptor that controls osteoclastogenesis and regulation of bone mass and calcium metabolism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(4), 1566–1571.
60. Lindhe, J., Karring, T., & Araujo, M. G. (2009). Anatomía de los tejidos periodontales. In Panamericana (Ed.), *Periodontología Clínica e Implantología Odontológica* (5 ed., pp. 3–49).
61. Luppapanornlarp, S., Kajii, T. S., Surarit, R., & Iida, J. (2010). Interleukin-1beta levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *European Journal of Orthodontics*, 32(5), 596–601.
62. Maeda, A., Soejima, K., Bandow, K., Kuroe, K., Kakimoto, K., Miyawaki, S., et al. (2007). Force-induced IL-8 from periodontal ligament cells requires IL-1beta. *Journal of Dental Research*, 86(7), 629–634.

63. Mahmood, T., & Yang, P.-C. (2012). Western blot: technique, theory, and trouble shooting. *North American Journal of Medical Sciences*, 4(9), 429–434.
64. Martin, T. J., Romas, E., & Gillespie, M. T. (1998). Interleukins in the control of osteoclast differentiation. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 8(2), 107–123.
65. Marzia, M., Chiusaroli, R., Neff, L., Kim, N.-Y., Chishti, A. H., Baron, R., & Horne, W. C. (2006). Calpain is required for normal osteoclast function and is down-regulated by calcitonin. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(14), 9745–9754.
66. Masella, R. S., & Meister, M. (2006). Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 129(4), 458–468.
67. Matthews, J. L., Wiel, C. V., & Talmage, R. V. (1978). Bone lining cells and the bone fluid compartment, an ultrastructural study. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 103, 451–458.
68. McKee, M. D., Hoac, B., Addison, W. N., Barros, N. M. T., Millán, J. L., & Chaussain, C. (2013). Extracellular matrix mineralization in periodontal tissues: Noncollagenous matrix proteins, enzymes, and relationship to hypophosphatasia and X-linked hypophosphatemia. *Periodontology 2000*, 63(1), 102–122.
69. Meikle, M. C. (2006). The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *European Journal of Orthodontics*, 28(3), 221–240.
70. Menton, D. N., Simmons, D. J., Chang, S. L., & Orr, B. Y. (1984). From bone lining cell to osteocyte--an SEM study. *The Anatomical Record*, 209(1), 29–39.
71. Miller, S. C., & Jee, W. S. (1987). The bone lining cell: a distinct phenotype? *Calcified Tissue International*, 41(1), 1–5.
72. Miller, S. C., Bowman, B. M., Smith, J. M., & Jee, W. S. (1980). Characterization of endosteal bone-lining cells from fatty marrow bone sites in adult beagles. *The Anatomical Record*, 198(2), 163–173.

73. Mizuno, A., Amizuka, N., Irie, K., Murakami, A., Fujise, N., Kanno, T., et al. (1998). Severe osteoporosis in mice lacking osteoclastogenesis inhibitory factor/osteoprotegerin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247(3), 610–615.
74. Morinobu, M., Ishijima, M., Rittling, S. R., Tsuji, K., Yamamoto, H., Nifuji, A., et al. (2003). Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(9), 1706–1715.
75. Moskowitz, H. S., Gooding, W. E., Thomas, S. M., Freilino, M. L., Gross, N., Argiris, A., et al. (2012). Serum biomarker modulation following molecular targeting of epidermal growth factor and cyclooxygenase pathways: a pilot randomized trial in head and neck cancer. *Oral Oncology*, 48(11), 1136–1145.
76. Nakamoto, H., Soeda, Y., Takami, S., Minami, M., & Satoh, M. (2000). Localization of calcitonin receptor mRNA in the mouse brain: coexistence with serotonin transporter mRNA. *Brain Research. Molecular Brain Research*, 76(1), 93–102.
77. Nakamura, H., Nagaoka, N., Hirata, A., Inoue, M., Ozawa, H., & Yamamoto, T. (2005). Distribution of actin filaments, non-muscle myosin, M-Ras, and extracellular signal-regulated kinase (ERK) in osteoclasts after calcitonin administration. *Archives of Histology and Cytology*, 68(2), 143–150.
78. Nakao, K., Goto, T., Gunjigake, K. K., Konoo, T., Kobayashi, S., & Yamaguchi, K. (2007). Intermittent force induces high RANKL expression in human periodontal ligament cells. *Journal of Dental Research*, 86(7), 623–628.
79. Nimeri, G., Kau, C. H., Abou-Kheir, N. S., & Corona, R. (2013). Acceleration of tooth movement during orthodontic treatment--a frontier in orthodontics. *Progress in Orthodontics*, 14, 42.
80. Nishijima, Y., Yamaguchi, M., Kojima, T., Aihara, N., Nakajima, R., & Kasai, K. (2006). Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. *Orthodontics & Craniofacial Research*, 9(2), 63–70.

81. Nishimura, M., Chiba, M., Ohashi, T., Sato, M., Shimizu, Y., Igarashi, K., & Mitani, H. (2008). Periodontal tissue activation by vibration: intermittent stimulation by resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 133(4), 572–583.
82. Nolan, J. P., & Mandy, F. (2006). Multiplexed and microparticle-based analyses: quantitative tools for the large-scale analysis of biological systems. *Cytometry. Part a : the Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 69(5), 318–325.
83. Ofluoglu, D., Akyuz, G., Unay, O., & Kayhan, O. (2007). The effect of calcitonin on beta-endorphin levels in postmenopausal osteoporotic patients with back pain. *Clinical Rheumatology*, 26(1), 44–49.
84. Palumbo, C. (1986). A three-dimensional ultrastructural study of osteoid-osteocytes in the tibia of chick embryos. *Cell and Tissue Research*, 246(1), 125–131.
85. Palumbo, C., Palazzini, S., & Marotti, G. (1990). Morphological study of intercellular junctions during osteocyte differentiation. *Bone*, 11(6), 401–406.
86. Pecile, A. (1992). Calcitonin and relief of pain. *Bone and Mineral*, 16(3), 187–189.
87. Perinetti, G., Paolantonio, M., D'Attilio, M., d'Archivio, D., Dolci, M., Femminella, B., et al. (2003). Aspartate aminotransferase activity in gingival crevicular fluid during orthodontic treatment. A controlled short-term longitudinal study. *Journal of Periodontology*, 74(2), 145–152.
88. Perinetti, G., Paolantonio, M., D'Attilio, M., d'Archivio, D., Tripodi, D., Femminella, B., et al. (2002). Alkaline phosphatase activity in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 122(5), 548–556.
89. Perinetti, G., Serra, E., Paolantonio, M., Bruè, C., Meo, S. D., Filippi, M. R., et al. (2005). Lactate dehydrogenase activity in human gingival crevicular fluid during orthodontic treatment: a controlled, short-term longitudinal study. *Journal of Periodontology*, 76(3), 411–417.

90. Pilkington, M. F., Sims, S. M., & Dixon, S. J. (2001). Transforming growth factor-beta induces osteoclast ruffling and chemotaxis: potential role in osteoclast recruitment. *Journal of Bone and Mineral Research*, *16*(7), 1237–1247.
91. Qin, H., & Yang, F. S. (2008). Calcitonin may be a useful therapeutic agent for osteoclastogenesis syndromes involving premature eruption of the tooth. *Medical Hypotheses*, *70*(5), 1048–1050.
92. Qin, H., Cai, J., Xu, H., & Gong, Y. (2009). Inhibition of Behcet's disease by calcitonin. *Medical Hypotheses*, *73*(1), 24–26.
93. Reddy, S. V., & Roodman, G. D. (1998). Control of osteoclast differentiation. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, *8*(1), 1–17.
94. Reinholt, F. P., Hultenby, K., Oldberg, A., & Heinegård, D. (1990). Osteopontin--a possible anchor of osteoclasts to bone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *87*(12), 4473–4475.
95. Ren, Y., & Vissink, A. (2008). Cytokines in crevicular fluid and orthodontic tooth movement. *European Journal of Oral Sciences*, *116*(2), 89–97.
96. Ren, Y., Hazemeijer, H., de Haan, B., Qu, N., & de Vos, P. (2007). Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *Journal of Periodontology*, *78*(3), 453–458.
97. Ren, Y., Maltha, J. C., Van't Hof, M. A., den Hoff, Von, 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*(8), 757–762.
98. Saffar, J. L., Lasfargues, J. J., & Cherruau, M. (1997). Alveolar bone and the alveolar process: the socket that is never stable. *Periodontology 2000*, *13*, 76–90.
99. Seifi, M., Eslami, B., & Saffar, A. S. (2003). The effect of prostaglandin E2 and calcium gluconate on orthodontic tooth movement and root resorption in rats. *European Journal of Orthodontics*, *25*(2), 199–204.
100. Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Lüthy, R., et al. (1997). Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell*, *89*(2), 309–319.

- 101.Sodek, J. (1977). A comparison of the rates of synthesis and turnover of collagen and non-collagen proteins in adult rat periodontal tissues and skin using a microassay. *Archives of Oral Biology*, 22(12), 655–665.
- 102.Sodek, J., & McKee, M. D. (2000). Molecular and cellular biology of alveolar bone. *Periodontology 2000*, 24, 99–126.
- 103.Takai, H., Kanematsu, M., Yano, K., Tsuda, E., Higashio, K., Ikeda, K., et al. (1998). Transforming growth factor-beta stimulates the production of osteoprotegerin/osteoclastogenesis inhibitory factor by bone marrow stromal cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(42), 27091–27096.
- 104.Takayanagi, H. (2005). Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. *Journal of Periodontal Research*, 40(4), 287–293.
- 105.Teixeira, C. C., Khoo, E., Tran, J., Chartres, I., Liu, Y., Thant, L. M., et al. (2010). Cytokine expression and accelerated tooth movement. *Journal of Dental Research*, 89(10), 1135–1141.
- 106.Terai, K., Takano-Yamamoto, T., Ohba, Y., Hiura, K., Sugimoto, M., Sato, M., et al. (1999). Role of osteopontin in bone remodeling caused by mechanical stress. *Journal of Bone and Mineral Research*, 14(6), 839–849.
- 107.Toygar, H. U., Kircelli, B. H., Bulut, S., Sezgin, N., & Tasdelen, B. (2008). Osteoprotegerin in gingival crevicular fluid under long-term continuous orthodontic force application. *The Angle Orthodontist*, 78(6), 988–993.
- 108.Turk, B., Turk, D., & Salvesen, G. S. (2002). Regulating cysteine protease activity: essential role of protease inhibitors as guardians and regulators. *Current Pharmaceutical Design*, 8(18), 1623–1637.
- 109.Turner, A. G., Tjahjono, F., Chiu, W. S. M., Skinner, J., Sawyer, R., Moore, A. J., et al. (2011). The role of the calcitonin receptor in protecting against induced hypercalcemia is mediated via its actions in osteoclasts to inhibit bone resorption. *Bone*, 48(2), 354–361.
- 110.Tzannetou, S., Efstratiadis, S., Nicolay, O., Grbic, J., & Lamster, I. (1999). Interleukin-1beta and beta-glucuronidase in gingival crevicular fluid from molars

during rapid palatal expansion. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 115(6), 686–696.

111. Uematsu, S., Mogi, M., & Deguchi, T. (1996). Interleukin (IL)-1 beta, IL-6, tumor necrosis factor-alpha, epidermal growth factor, and beta 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, 75(1), 562–567.
112. van Driel, W. D., van Leeuwen, E. J., den Hoff, Von, J. W., Maltha, J. C., & Kuijpers-Jagtman, A. M. (2000). Time-dependent mechanical behaviour of the periodontal ligament. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of Engineering in Medicine*, 214(5), 497–504.
113. Visser, E. J., & Kwei, P. L. (2006). Salmon calcitonin in the treatment of post herpetic neuralgia. *Anaesthesia and Intensive Care*, 34(5), 668–671.
114. Wise, G. E., & King, G. J. (2008). Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*, 87(5), 414–434.
115. Wöstmann, B., Rehmann, P., Trost, D., & Balkenhol, M. (2008). Effect of different retraction and impression techniques on the marginal fit of crowns. *Journal of Dentistry*, 36(7), 508–512.
116. Yamaguchi, M., Yoshii, M., & Kasai, K. (2006). Relationship between substance P and interleukin-1beta in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement in adults. *European Journal of Orthodontics*, 28(3), 241–246.
117. Yamasaki, K., Miura, F., & Suda, T. (1980). Prostaglandin as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *Journal of Dental Research*, 59(10), 1635–1642.
118. Yamasaki, K., Shibata, Y., & Fukuhara, T. (1982). The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fuscata*). *Journal of Dental Research*, 61(12), 1444–1446.
119. Yan, T., Riggs, B. L., Boyle, W. J., & Khosla, S. (2001). Regulation of osteoclastogenesis and RANK expression by TGF-beta1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 83(2), 320–325.

