



UAI Universidad Abierta
Interamericana

Fuerzas ortodóncicas:
Respuesta del osteocito en la mecanotransducción.
(Prueba Piloto)

Especialidad en Ortodoncia

Tutora:
Prof. Dra. Labate Laura Marta.

Autora:
Od. Castellanos Lucia Maria.

Fecha: JULIO 2023

RESUMEN

El presente trabajo pretende abordar cuáles son los cambios morfológicos que sufren los osteocitos y lagunas osteocitarias en el entorno óseo, tras recibir estímulos físicos como las fuerzas ortodóncicas.

Materiales y métodos: Se estudiaron 10 ratas Wistar sometidas a tratamientos de ortodoncia, donde se buscó distalizar el primer molar superior. En cada uno de los preparados histológicos se observó el comportamiento celular de tres grupos; Grupo 1 (osteocitos y lagunas osteocitarias en reposo); grupo 2 (osteocitos y lagunas osteocitarias en el sitio de presión); Grupo 3 (osteocitos y lagunas osteocitarias en el sitio de tensión).

Resultados: Se encontraron cambios en la morfología de los osteocitos cercanas a sitios de aplicación de las fuerzas traccionales y compresivas, como así también en los osteocitos en áreas alejadas al sitio de aplicación de estas, adquiriendo una forma ovalada ($P= 0.5650$). Hubo un aumento de volumen en las lagunas osteocitarias de los tres grupos, existiendo diferencias significativas entre el tamaño de los tres grupos ($p=0.019$). Si bien el tamaño de los osteocitos de los tres grupos aumentó en diferentes magnitudes, no hubo diferencias significativas en el tamaño de las células entre los grupos 2 y grupo 3 ($p=0.5872$). Observamos que el grupo control (Grupo 1) cuenta con un espacio mayor de laguna no ocupada por los osteocitos, con respecto al espacio lacunar libre que ocupan los osteocitos de los grupos 2 ($p=0.0023$) y grupo 3 ($p=0.0018$).

Conclusiones: Las células osteocitarias aumentan su volumen y cambian su forma al sentir las fuerzas mecánicas, independientemente que estas se encuentren cercanas o alejadas a al sitio de aplicación. La activación de los osteocitos en el hueso basal es menor que en las áreas cercanas a la aplicación de las fuerzas. El espacio libre de las lagunas osteocitarias es mayor en aquellas que se encuentran alejadas al sitio de aplicación de las fuerzas; lo que sugiere que a medida que nos alejamos de las zonas de aplicación de las fuerzas, esta disminuye y por ende la respuesta celular es menor. El aumento del volumen lacunar es posterior al aumento del volumen celular.

Palabras Claves: Osteocitos, Lagunas Osteocitarias, Cambios morfológicos, Fuerzas ortodóncicas.

INTRODUCCIÓN

Diferentes estudios apoyan la idea de que la integridad del esqueleto depende de la percepción de estímulos mecánicos que promuevan una actividad celular encaminada al mantenimiento, reparación o adaptación de la morfología o estructura del tejido óseo ⁽¹⁾

La mecanotransducción es la capacidad de determinadas células de sensar un estímulo mecánico y traducirlo a señales bioquímicas que regulen la acción de otras células, las células efectoras.

El osteocito desde hace ya algunos años no es más considerado como la mera diferenciación terminal del osteoblasto, que tan solo mantiene la vitalidad del tejido óseo. De hecho, reconocer su capacidad mecanosensora, es reconocer en esta célula su capacidad de respuesta inmediata y su rol como director de los procesos de modelación y remodelación óseas inducidos por las fuerzas ortodóncicas efectuadas a lo largo del tratamiento.

Los fundamentos biológicos y mecánicos del movimiento dental ortodóncico (OTM) son primordiales para la comprensión de cómo corregir la maloclusión dental y/o esquelética con ortodoncia. La antigua literatura científica de ortodoncia ha proporcionado una base sustancial para entender los mecanismos que controlan la OTM. Varios tipos celulares son fundamentales para este proceso; entre ellos se encuentran los osteoclastos, conocidos por su actividad de reabsorción de tejido óseo, y los osteoblastos, que crean hueso. La cascada clásica de remodelación ósea es que 1) los precursores de osteoclastos son atraídos por el torrente sanguíneo; 2) los precursores forman osteoclastos; 3) reabsorción localizada de hueso; 4) La reabsorción ósea ocurre paralelamente a la diferenciación de osteoblastos; 5) ocurre la formación ósea a través de estos ⁽⁷⁴⁾.

El movimiento dentario producido por ortodoncia es orquestado por una serie de eventos clínicos y biológicos que involucra la aplicación de fuerzas seguida por una cascada de respuestas moleculares y celulares. Los osteoblastos y osteoclastos fueron las primeras células analizadas en los movimientos dentarios de ortodoncia. Sin embargo, el papel que cumple el osteocito, una célula que históricamente se consideraba “estática”, debe ser considerada como pilar en los nuevos descubrimientos de la biología molecular. Los osteocitos son esenciales en el control de la respuesta a la fuerza mecánica.

Las fuerzas mecánicas en ortodoncia pueden ser intermitentes o continuas, y estimulan la cascada de remodelación ósea alveolar. La presión generada por las fuerzas ortodóncicas es caracterizada por la reabsorción ósea, mientras que, en el sitio de tensión, ocurre la formación del hueso. La respuesta biológica a las fuerzas está dirigida por dos mecanismos de control fundamentales; la electricidad biológica y la teoría de la

presión-tensión. La teoría de la bioelectricidad está basada en que los cambios del metabolismo óseo provienen de señales eléctricas que ocurren cuando el hueso alveolar sufre deflexión. Investigadores respaldan que los cambios que ocurren en el hueso alveolar durante la ortodoncia se deben a un fenómeno piezoeléctrico; los cristales de hidroxiapatita se deforman por la fuerza mecánica y producen un potencial de estrés (SGP) ⁽⁷⁵⁾.

Sin embargo, si bien se cree que la presencia de piezoelectricidad explica las señales eléctricas que a su vez conducen al mantenimiento del esqueleto óseo, la correlación con OTM es menos clara ya que el movimiento de ortodoncia se produce como resultado de una fuerza sostenida frente al tipo intermitente de fuerzas que causan SGP. Alternativamente, la teoría de la presión-tensión postula que los mensajeros químicos son responsables de los cambios celulares. Específicamente, el diente se desplaza en la cavidad en respuesta a la fuerza ortodóntica propagada a través del ligamento periodontal (PDL). A medida que el flujo sanguíneo dentro del ligamento disminuye donde se comprime la PDL y aumenta donde se estira, el entorno químico se altera concomitantemente para estimular segundos mensajeros como el AMP cíclico (AMPC), y la activación de las células responsables de la OTM. En resumen, la elevación del AMPC estimula la diferenciación celular y la proliferación a través de la actividad de la quinasa en el núcleo de cada célula. Además del AMPC, los fosfatos de inositol y el calcio intracelular responden a las fuerzas mecánicas al elevar sus niveles biológicos. El efecto resultante es que la entrada de calcio en la célula puede provenir de canales iónicos controlados por proteínas o la liberación de calcio de las reservas celulares internas ⁽⁷⁶⁾. La teoría de la presión-tensión se acepta generalmente como la teoría clásica del movimiento dentario en ortodoncia, aunque la teoría piezoeléctrica también es destacada por su importancia en la homeostasis ósea ⁽⁷⁴⁾.

Al considerar los mecanismos que rigen la OTM, es importante que pensemos desde la perspectiva de cómo estos mecanismos afectan los enfoques y resultados del tratamiento de ortodoncia. En otras palabras, nos permite conocer con qué rapidez puede un ortodoncista lograr un OTM efectivo, mientras permanece biológicamente sano ⁽⁷⁴⁾.

Para comprender la mecanotransducción es importante conocer como el osteocito está involucrado en la OTM, más allá del papel fundamental en el mantenimiento de la arquitectura ósea. Descubrimientos recientes sugieren que los osteocitos son críticos en OTM además de los osteoblastos y osteoclastos. Los osteocitos, que antes se pensaba que eran células inactivas, ahora se consideran reguladores activos en la remodelación ósea. Para apreciar el cambio de paradigma, es fundamental establecer el papel esencial de los osteocitos en la remodelación ósea. A través de la evaluación de la reciente literatura biológica molecular, se postula que puede existir un mecanismo directo sobre el osteocito, que puede mejorar los resultados clínicos de la ortodoncia; el osteocito puede proporcionar oportunidades para mejorar la atención clínica.

Los osteocitos, las células óseas más abundantes del tejido óseo, son células no proliferativas que residen en el interior de la matriz ósea mineralizada, alojadas en lagunas. Presentan largos procesos citoplasmáticos a través de los cuales establecen contacto y se comunican con las células osteoblásticas presentes en la superficie del hueso y con osteocitos vecinos ⁽²⁾. La red celular tridimensional que forman los cuerpos y los procesos citoplasmáticos de los osteocitos es conocida como red osteocitaria (ON: osteocyte network). Los osteocitos y el sistema de lagunas y canalículos (SLC) que los contienen forman una red sincicial de intercomunicación entre ellos: el sistema lacuno-canalicular osteocitario (SLCO) ⁽³⁾.

Se ha demostrado que los osteocitos son un miembro activo de la remodelación ósea y no solo una célula estática como se pensaba anteriormente. Los osteocitos ahora se consideran la principal célula mecanosensible, con un 90-95 % de las células del hueso. Sin osteocitos, el hueso es completamente insensible a las cargas. Los osteocitos pueden ejercer control sobre los osteoblastos y osteoclastos a través de múltiples vías de señalización, como el activador receptor del ligando del factor nuclear kappa-B (RANK), la osteoprotegerina (OPG) y el óxido nítrico (NO). Los osteocitos, que se diferencian y anclan en el hueso cortical y trabecular, pueden construir y absorber el hueso ⁽⁷⁴⁾.

Se sabe que la proteína de la matriz de la dentina 1 (Dmp1) es una molécula clave para regular la formación de osteocitos, la maduración, la regulación del fosfato y la mineralización. Además, los osteocitos están idealmente posicionados para actividades reguladoras a través de la comunicación por procesos dendríticos dentro del sistema lacuno-canalicular osteocitario para enviar y recibir señales para enviar por todo el hueso ⁽⁷⁴⁾.

En este sistema la comunicación a nivel celular se establece a través de uniones gap que permiten la comunicación de señales eléctricas y el transporte extracelular e intracelular de moléculas de señalización. Estos contactos célula-célula se establecen desde el momento de la diferenciación de osteoblasto a osteocito. Con los osteoclastos y sus precursores, en cambio, los osteocitos no establecen contacto directo y la comunicación se lograría a través de la difusión de moléculas de señalización liberadas por ellos ⁽⁴⁾.

Además, en el SLCO se establece comunicación a nivel extracelular por medio del fluido que transcurre por el espacio comprendido entre la membrana plasmática de los osteocitos y la pared de la laguna y los canalículos (espacio periosteocitario) dentro del sistema lacuno-canalicular y representa una extensa área para el intercambio molecular. Este espacio entre el osteocito y la matriz ósea contiene proteínas no colagenosas propias de la matriz (laminina, osteopontina, osteocalcina, sialoproteína ósea, fibronectina, entre otras) y proteoglicanos (principalmente ácido hialurónico). Estas proteínas no colagenosas tienen la particularidad de ligar los iones de calcio. Además, esta matriz contiene la proteína de matriz dentinaria tipo I (DMP1) ⁽⁵⁾ y fosfoglicoproteína de matriz extracelular (MEPE) ⁽⁶⁾. Una de las principales funciones de DMP-1 es mantener la integridad y rigidez de las paredes lacunar y canalicular, y su expresión se encuentra principalmente aumentada ante las fuerzas mecánicas. La MEPE

es una proteína que se concentra principalmente por fuera de la pared mineralizada de la laguna, en la matriz no mineralizada que rodea los osteocitos y procesos citoplasmáticos.

Los osteocitos se encuentran anclados en la matriz ósea que los circunda a través de uniones focales dependientes de integrina, aunque más recientemente se sugirió que la pronunciada capa de matriz no colágena (0,5 a 1 μm de espesor) rica en ácido hialurónico que forma una especie de glicocáliz alrededor del cuerpo de los osteocitos impediría el anclaje directo en la matriz mineralizada⁽³⁾. A diferencia del cuerpo celular, los procesos citoplasmáticos sí evidencian anclaje directo a través de integrinas (integrina $\alpha\text{V}\beta\text{3}$) posiblemente con la osteopontina (OPN) de la matriz que los rodea.

El movimiento del fluido óseo por el SLC se incrementa por la aplicación de fuerzas en el hueso, sugiriendo que el deslizamiento del fluido intersticial dentro del SLC genera un estrés que se relacionaría con la capacidad de sensado de las fuerzas en el hueso⁽⁷⁾⁽⁸⁾.

Existen evidencias que demuestran que las cargas mecánicas y la ausencia de estas cargas en el hueso provocan cambios en la expresión de diversos factores en los osteocitos, sugiriendo que estas células actuando como mecanosensores participarían en la regulación de los procesos de modelación y remodelación óseas adaptativas⁽²⁾.

A través de sus procesos citoplasmáticos y de la red de comunicación dentro del SLCO, los osteocitos actúan como mecanosensores del hueso sensando los estímulos mecánicos, traduciendo los mismos a señales bioquímicas y, a través de la comunicación y liberación de diversos factores, comunican el estímulo a las células efectoras (osteoblastos y osteoclastos). Los cambios en el entorno lacunar periosteocitario-pericanalicular actuarían como amplificadores locales de las fuerzas recibidas y favorecerían la transmisión de las señales entre las células⁽²⁾.

TRANSDUCCIÓN DE LA SEÑAL MECÁNICA

La capacidad de las células óseas de percibir las señales mecánicas en su entorno mineralizado requiere la presencia de mecanoreceptores, en otras palabras, moléculas, complejos proteicos o estructuras biológicas capaces de detectar cambios en las diferentes fuerzas asociadas la carga mecánica (como por ejemplo las fuerzas de tensión y presión ejercidas en los tratamientos de ortodoncia). En teoría, estas estructuras deberían 1) conectar a la célula con el espacio extracelular, permitiéndole sensar la tensión provocada en la matriz extracelular mineralizada, o bien 2) localizarse en la membrana plasmática para detectar cambios en la presión o en la velocidad del flujo que rodea a estas células⁽¹⁾.

Entre los elementos que se han postulado como responsables se encuentran diferentes integrinas, adhesiones focales, estructuras ciliares y diferentes proteínas de membrana. De hecho, se ha demostrado experimentalmente cómo las estructuras capaces de anclar

la célula a la matriz extracelular que la rodea, como las previamente mencionadas integrinas o adhesiones focales, son necesarias para percibir los estímulos mecánicos ⁽³⁵⁾ ⁽³⁶⁾.

Del mismo modo, los canales sensibles a estímulos físicos, como los canales de calcio o las conexinas, juegan también un papel importante en la recepción y posterior transducción de la señal, generalmente permitiendo la entrada o salida de diferentes factores encargados de mediar en la respuesta celular al estrés físico ⁽²⁾.

Finalmente, los órganos mecanosensores, como los cilios, están cobrando cada vez más importancia en este campo. Tal es así, que se ha sugerido que la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) tras la percepción de las señales mecánicas puede estar, al menos en parte, regulada por este tipo de estructuras ⁽³⁷⁾ ⁽³⁸⁾. Recientemente también se ha sugerido que el citoesqueleto, que conecta el interior celular con el entorno extracelular, puede ser un elemento crítico a la hora de determinar cómo los osteocitos sensan estas fuerzas.

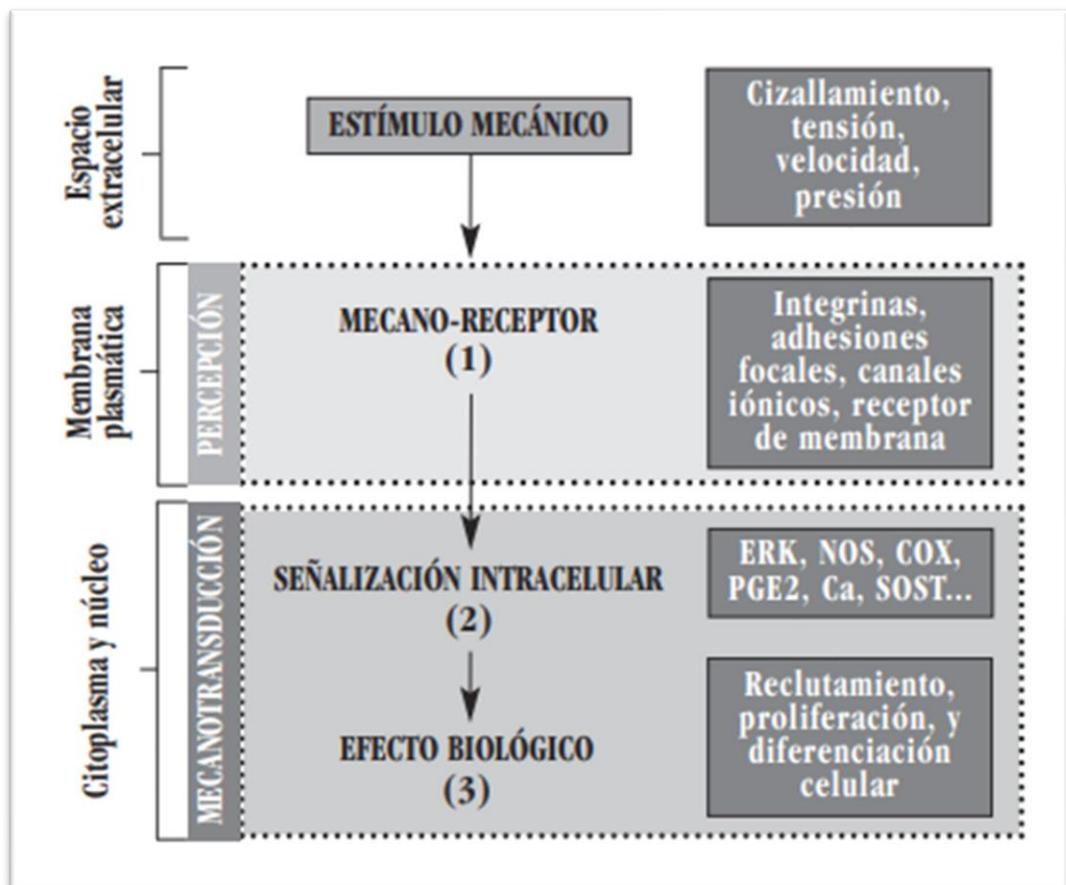


Figura 1. Imagen extraída de “Mecanobiología celular y molecular del tejido óseo” ⁽¹⁾ Transducción de la señal mecánica en el tejido óseo.

El proceso de mecanotransducción convierte a los estímulos mecánicos en una secuencia de eventos celulares que finalmente se traducen en efecto biológico (ej. incremento de la proliferación, inicio de programas de diferenciación celular). La

transducción de la señal comienza a nivel de membrana, a través de diferentes estructuras sensibles a los cambios en las características mecánicas que rodean a las células óseas. Estos receptores activan diversas vías intracelulares (ej. ERK, flujo de iones, proteínas G) que finalmente provocan cambios en la expresión de determinados genes claves para la biología de las células óseas. La variación en los niveles de estos genes modifica en último término la proliferación, diferenciación y el reclutamiento de precursores óseos.

Para comprender el orden en el que sucede la mecanotransducción, dividiremos el proceso en cuatro etapas ⁽⁹⁾:

- 1) Acoplamiento mecánico.
- 2) Acoplamiento bioquímico.
- 3) Transmisión de la señal bioquímica a las células efectoras.
- 4) Respuesta específica de las células efectoras

1) ACOPLAMIENTO MECÁNICO

Las cargas mecánicas en el hueso inducen gradientes de presión en la matriz ósea que genera un flujo del fluido intersticial dentro del SLC los cuales son sensados por los osteocitos inmersos en el SLC, a través de la deformación que sufre su membrana plasmática y el citoesqueleto anclado en ella ⁽⁷⁾ a través de las integrinas que anclan a los osteocitos en la matriz del hueso ^{(10) (11)}.

Los complejos que forman las integrinas $\alpha V\beta 3$ con componentes de la matriz ósea como OPN y vitronectina 19 actuarían como los principales sitios de transducción de la señal e iniciadores de los mecanismos de señalización intracelular ⁽²⁾. Este estrés tensiona intracelularmente los filamentos de actina del citoesqueleto, produciendo cambios en la organización de este que se manifiestan por aumentos en los niveles de α -actina (29%), filamina (185%) y vimentina (15%) ⁽¹²⁾.

Tanto las fuerzas traccionales como las fuerzas compresivas provocaron cambios morfológicos ya en 1° hora de aplicadas las fuerzas, y tanto a nivel del SLC como de la red osteocitaria. Estos cambios se manifestaron con incremento del volumen lacunar e incremento del espacio peri procesal (Figura 2), lo cual modificaría la permeabilidad dentro del sistema generando cambios en la dinámica del fluido intracanalicular y contribuyendo al sensado por parte de los osteocitos. ⁽²⁾⁽¹³⁾

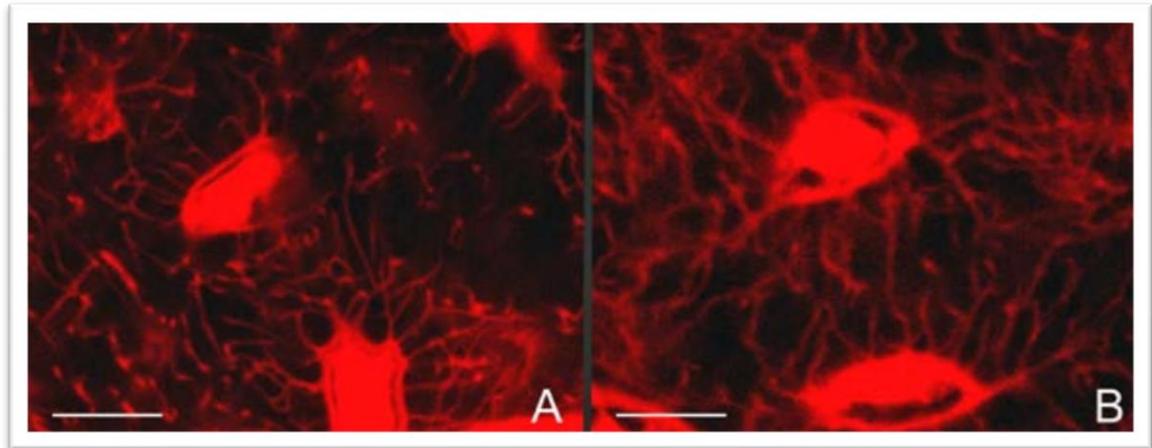


Figura 2. Imagen extraída de “Los osteocitos como mecanosensores del hueso.” Microfotografías obtenidas con microscopio láser de barrido confocal de hueso alveolar teñido con fucsina básica. Se observa una zona del hueso alveolar sin descalcificar de (A) un animal control y (B) de un animal experimental luego de la aplicación de las fuerzas ortodóncicas durante 1 hr. Nótese el aumento del volumen lacunar en B y el incremento del espacio periprocésal visible por penetración del colorante en la muestra de hueso que recibió la fuerza ortodóncica. Magnificación original 1500X. Escala 10 µm. ⁽²⁾

Dentro de los cambios osteocitarios causados por las fuerzas, dependientes de la modificación del citoesqueleto, hemos observado que los cuerpos celulares adoptan una forma redondeada ⁽¹³⁾. En un estudio *in vitro* se observó que los osteocitos de morfología esférica son más mecanosensibles que los osteocitos de morfología ovoide, por lo que la morfología celular parecería estar involucrada en la capacidad de sensado y adaptación funcional del hueso a las cargas.

En la hipótesis de la plasticidad osteocitaria propuesta por Rubin y col. se postula que la célula estaría modificando activamente la arquitectura del citoesqueleto, anclándose en la matriz y modulando el espacio periosteocitario en un intento por optimizar el microambiente para sensar las fuerzas, y que, cuando se produce un incremento en las fuerzas que recibe el hueso, los osteocitos rápidamente modifican la infraestructura de su citoesqueleto. En línea con esta hipótesis y de acuerdo con nuestros hallazgos, postulamos que –independientemente de que las fuerzas que recibe el hueso sean traccionales o sean compresivas– probablemente determinen cambios en la organización espacial del citoesqueleto de los osteocitos, modificando secundariamente el ambiente lacunar. Además, los cambios lacunares tal vez se asocien a modificaciones en las concentraciones de calcio y fosfato en el espacio periosteocitario ⁽¹⁴⁾.

De esta forma, el incremento del volumen lacunar observado inmediatamente luego de la aplicación de las fuerzas podría estar generando una movilización del calcio extracelular. En tanto uno de los primeros eventos en la activación mecánica de los osteocitos es la activación de canales de calcio-voltaje dependientes y la movilización intracitoplasmática del calcio que actúa como segundo mensajero, el calcio que se movilizaría por modificación del espacio periosteocitario estaría activando mecanismos de señalización en los osteocitos y regulando la expresión de genes específicos ⁽¹⁵⁾.

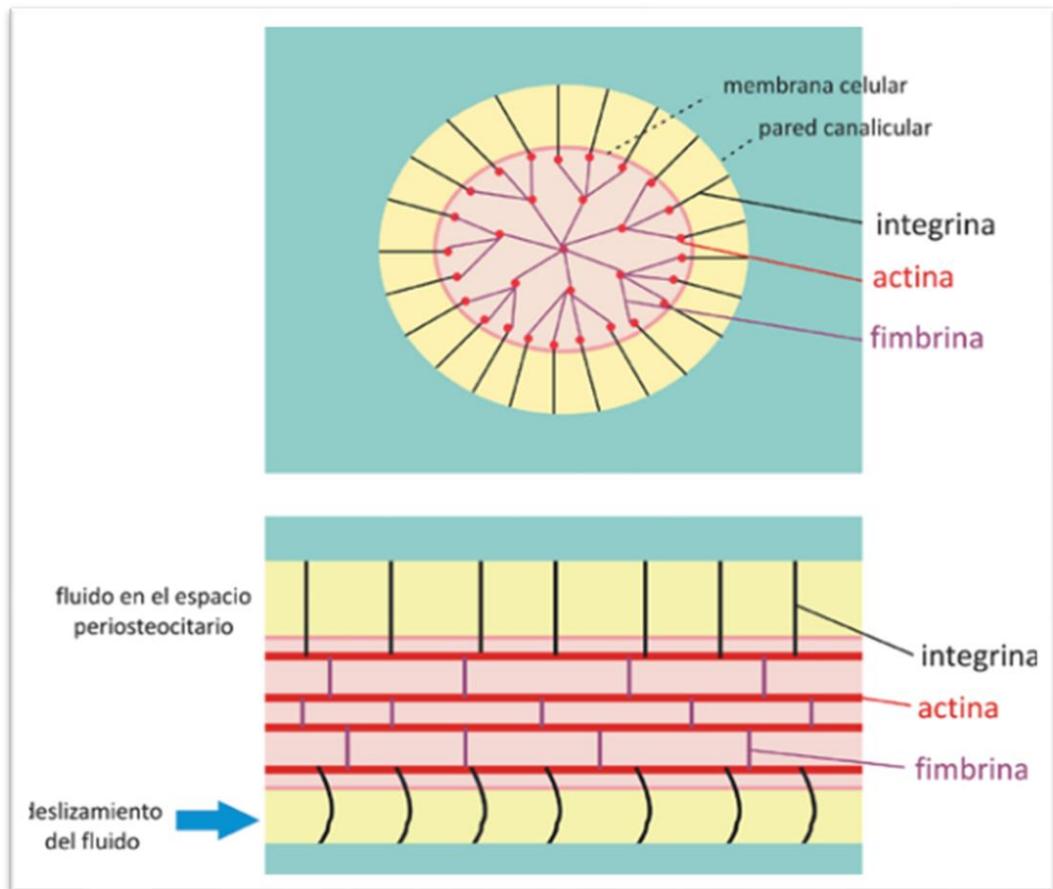


Figura 3. Imagen extraída de “Los osteocitos como mecanosensores del hueso.”⁽²⁾ Representación esquemática de una prolongación citoplasmática, el espacio periprocesal y la matriz mineralizada de la pared del canalículo en A) corte transversal y B) corte longitudinal. Basado en el modelo de amplificación de las cargas desarrollado por You y col. (2001, 2004). Se representan la actina del citoesqueleto de la prolongación citoplasmática y las proteínas asociadas integrina y fibrina. La aplicación de fuerzas en el hueso provocaría el deslizamiento del fluido óseo que transcurre por el espacio periprocesal provocando tensión sobre las integrinas de anclaje de la membrana celular a la matriz. Esta tensión se transmite intracelularmente a los filamentos de actina del citoesqueleto de la prolongación desencadenando el mecanismo de respuesta intracelular. Modificado de You y col. (2001).

Nicolella y col.⁽¹⁶⁾⁽¹⁷⁾ sugieren que la laguna osteocitaria actúa como un concentrador del estrés que provocan las fuerzas sobre el hueso, amplificando la magnitud de las fuerzas que actúan sobre él, mientras que el factor de amplificación de las fuerzas se relacionaría con las propiedades del tejido perilacunar. Los resultados observados en forma inmediata a la aplicación de las fuerzas en el hueso indican una modificación del espacio periosteocitario tanto a nivel lacunar como canalicular, lo cual contribuiría a generar cambios en la dinámica del desplazamiento del fluido óseo dentro del SLC. Debido a que el estrés de deslizamiento es inversamente proporcional al diámetro (cross-sectional area) del sitio por el que transcurre el líquido y el diámetro canalicular es mucho menor que el diámetro lacunar, el estrés de deslizamiento que se generaría sobre los procesos citoplasmáticos sería mucho mayor que el que se generaría sobre los cuerpos osteocitarios⁽¹¹⁾.

2) ACOPLAMIENTO BIOQUÍMICO:

Ante el estrés de deslizamiento del fluido, los osteocitos responden traduciendo el estímulo mecánico inicial en cascadas de señalización intracelular. Suceden aquí los siguientes fenómenos:

- a. Movilización del calcio (Ca^{2+}) desde los depósitos intracelulares, a través de la activación de canales de calcio voltaje-dependientes y de la vía del inositol trifosfato (IP3).
- b. El Ca^{2+} , actuando como segundo mensajero, activa mecanismos de señalización que regulan la expresión de genes específicos dentro del núcleo celular.
- c. Otra de las cascadas activadas es la de las MAP-quinasas (MAPK).
- d. A los pocos minutos de sentir las fuerzas, se encontró en los osteocitos un aumento en los niveles de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa.
- e. A las 2 horas un aumento en los niveles de ARNm para c-fos.
- f. A las 4 horas se incrementan la expresión de TGF- β , de IGF61 y de prostaglandinas, así como también se activa la síntesis de óxido nítrico (NO) y ATP.

3) TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL BIOQUÍMICA A LAS CÉLULAS EFECTORAS

La síntesis y liberación de los factores de expresión génica nombrados anteriormente, regulan la actividad de células, entre ellas osteoblastos y osteocitos, induciendo a la reabsorción y/o formación ósea como respuesta adaptativa a las fuerzas mecánicas. La respuesta osteocitaria a las fuerzas, es distinta en función de que las fuerzas que recibe sean fisiológicas o extremas ⁽²⁾.

El movimiento dentario en ortodoncia (OTM) da como resultado una remodelación del hueso alveolar como respuesta a una carga mecánica, resorción ósea de osteoclastos en el lado de la compresión, y formación ósea de osteoblastos en el lado de la tensión. El factor nuclear kappa B (RANK), RANK ligando (RANKL) y la osteoprotegerina (OPG) son considerados como proteínas importantes que controlan la función de osteoclastos en OTM. Aunque es sabido que la interleuquina IL-10 inhibe la osteoclastogénesis al acelerar la OPG y al reducir la producción de RANKL por a los osteoblastos del lado de la tensión, hay algunos estudios que muestran cómo también se promueve la formación ósea. La Semaforina 3A (Sema3A) ejerce un efecto osteoprotector al contener la resorción ósea y al aumentar la formación ósea ⁽⁶¹⁾.

3.1 PARTICIPACIÓN DE LAS UNIONES GAP EN LA TRANSMISIÓN DE LA SEÑAL.

La transmisión de la señal se da a través de la comunicación entre osteocitos vecinos a través de uniones gap ⁽⁹⁾ y/o por señalización paracrina dentro del SLC. Las uniones gap se forman por la unión de 2 hemicanales o conexones, uno de cada célula. Cada conexón tiene una estructura hexamérica compuesta por las proteínas transmembrana conexinas (Cx). Las uniones gap permiten la difusión de iones, metabolitos y moléculas de señalización entre las dos células que establecen el contacto, y presentan tamaño y carga específica dependiendo del tipo de conexinas participantes. Las Cx están involucradas en varios procesos que determinan el funcionamiento de las células óseas, entre ellos el control de la proliferación, la diferenciación y la supervivencia de los osteocitos ⁽¹⁸⁾ ⁽¹⁹⁾. Las Cx que se expresan en el tejido óseo son Cx43 (la más abundante), Cx45, Cx46,65 y recientemente se determinó que también se expresa la Cx37. Los conexones pueden ser activos incluso sin formar uniones gap con el conexón de otra célula. En este caso se los llama “hemicanales” y representan un canal de membrana con gran permeabilidad. Los hemicanales participan de la señalización luego de la estimulación mecánica de los osteocitos. Los canales de Cx43 están presentes en forma activa en los osteocitos y median la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) ⁶⁹ y ATP56 luego de la estimulación mecánica.

In vitro se demostró que, en los osteocitos, la estimulación mecánica induce la propagación de ondas de Ca²⁺ hacia los osteoblastos. Incluso, esta capacidad de los osteocitos de comunicar las señales mecánicas a los osteoblastos a través de uniones gap se inhibe por bloqueo farmacológico de las uniones gap o al impedir el contacto físico entre osteocitos y osteoblastos ⁽²⁰⁾. Sin embargo, el rol de los canales de Cx en la transducción de señales mecánicas en osteocitos, propuesta sobre la base de estudios in vitro, ha sido recientemente cuestionado. Tres diferentes grupos de investigadores han demostrado que en animales deficientes en Cx43 en células del linaje osteoblástico (incluidos osteocitos) la estimulación mecánica indujo, inesperadamente, una mayor respuesta anabólica ⁽²¹⁾ ⁽²²⁾.

3.2.1 EL OSTEOCITO COMO REGULADOR DE LA REABSORCIÓN ÓSEA ALVEOLAR

Es sabido que determinadas señales mecánicas regulan la fusión de precursores y la actividad osteoclástica. En este sentido, las fuerzas extremas que provoquen microfracturas en la matriz ósea, o condiciones de ausencia de cargas mecánicas, promueven la osteoclastogénesis incrementando la reabsorción ósea. En un estudio in vivo se ha demostrado que la ausencia de estimulación mecánica provoca un incremento en la prevalencia de osteocitos en apoptosis, seguido de un aumento en el reclutamiento de osteoclastos y de la reabsorción ósea. En el mismo sentido, las microfracturas generadas por la fatiga que provoca el exceso de cargas mecánicas

inducen el incremento de osteocitos en apoptosis seguido, luego de varios días, por un incremento local de la reabsorción osteoclástica, permitiendo el reemplazo del sitio dañado ⁽²³⁾ ⁽²⁴⁾. Ambas situaciones sugieren que los osteocitos apoptóticos, independientemente de la causa, llevan al reclutamiento osteoclástico induciendo un incremento de la reabsorción ósea. Sin embargo, en algunos estudios in vitro se determinó que determinadas cargas mecánicas inhiben la formación de osteoclastos. Varios estudios recientes sugieren que la formación de los osteoclastos podría estar regulada mecánicamente por factores solubles sintetizados por los osteocitos en respuesta a su activación por el estrés de deslizamiento del fluido óseo.

La osteopontina (OPN) es una de las principales glicoproteínas de la matriz ósea y, por ser un factor que regula la quimiotaxis y adhesión de los osteoclastos a la superficie del hueso durante la reabsorción, se cree que cumple un rol importante en la regulación de la remodelación ósea. En ausencia de estimulación mecánica, los osteocitos muestran un incremento significativo en la expresión de OPN. Sin embargo, otros estudios revelan que la aplicación de fuerzas provoca también un incremento en los niveles de expresión de OPN en los osteocitos.

Con la carga mecánica, la expresión de esclerostina, que es un inhibidor de la vía de señalización proteica Wnt/ β -catenina secretado de manera constitutiva por los osteocitos, disminuye provocando un incremento de la osteoblastogénesis. Por otra parte, los osteocitos apoptóticos inducen la secreción del ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL, del inglés Receptor Activator for Nuclear Factor κ B Ligand), estimulando indirectamente la osteoclastogénesis ⁽³⁹⁾.

Los factores reguladores importantes de la osteoclastogénesis y la reabsorción ósea son, por lo tanto, los factores del sistema RANK-RANKL OPG. En un estudio in vitro se demostró que los osteocitos secretan RANKL y M-CSF (factor estimulante de colonias macrofágicas), que son dos de las citoquinas más importantes que promueven la osteoclastogénesis. El hecho de que los osteocitos secreten RANKL como un factor regulador de la remodelación ósea sugiere que también podría ser a través de la liberación de RANKL que los osteocitos regularían la adaptación del hueso a las cargas.

Otro estudio in vitro demostró que los osteocitos (células MLO-Y4) sometidos a estrés de deslizamiento de fluido afectan la osteoclastogénesis disminuyendo el balance RANKL/OPG12 y de esa forma probablemente regularían la reabsorción ósea. Además, los osteocitos secretan OPG, el cual antagoniza con el RANKL compitiendo por su receptor en los osteoclastos y sus precursores. El cambio en el balance de RANKL/OPG sería uno de los factores que regularía la reabsorción ósea mediante la regulación de la osteoclastogénesis.

In vivo hemos observado que luego de la aplicación de fuerzas ortodóncicas se produce un incremento muy temprano en el porcentaje de osteocitos RANKL+ y en el cociente RANKL/OPG, lo que sugiere la participación de este sistema en la regulación de la modelación/remodelación ósea inducida por las fuerzas, favoreciendo la osteoclastogénesis y la sobrevivencia de los osteoclastos.

La PGE2 es otra importante molécula de señalización que sintetizan y liberan los osteocitos en respuesta a la estimulación mecánica. Esta citoquina actúa tanto sobre osteoblastos como sobre osteoclastos y desencadena tanto respuestas estimuladoras como inhibitorias. En relación con la osteoclastogénesis, la PGE2 promueve la diferenciación, maduración y supervivencia de osteoclastos en cultivos de células de la médula ósea y de células esplénicas. La PGE2 también promueve la osteoclastogénesis a través de la regulación del sistema RANK RANKL-OPG.

Por otro lado, los osteocitos normalmente secretan TGF- β , que inhibe la osteoclastogénesis y/o la reabsorción osteoclástica. Algunos autores postulan que los osteocitos apoptóticos, por ausencia o pérdida de esta señal inhibitoria, regularían la reabsorción ósea. La aplicación de fuerzas en el hueso que exceden el rango fisiológico (fuerzas extremas) o la presencia de condiciones patológicas como la osteoporosis, predisponen la aparición de microfracturas en la matriz ósea como consecuencia de la fatiga. En este caso, los osteocitos que se encuentran próximos al sitio de la microfractura experimentan apoptosis y esto atraería a los osteoclastos para el inicio de la reabsorción en el sitio del daño. La disminución o corte del pasaje del fluido óseo a nivel canalicular en los alrededores de la microfractura provoca una reducción en la síntesis de óxido nítrico (NO) en los osteocitos y causaría la apoptosis.

En diversos estudios in vivo se ha demostrado que, en zonas de microfracturas lineales por fatiga, los osteocitos se tornan apoptóticos, y hay un incremento de señales pro-osteoclásticas procedentes de los osteocitos adyacentes a la lesión; subsiguientemente estas áreas son reabsorbidas por osteoclastos. Sin embargo, las cargas mecánicas de rango fisiológico, muy por el contrario, no inducen apoptosis de los osteocitos, sino que promueven su supervivencia. In vitro se ha demostrado que fuerzas fisiológicas previenen la apoptosis de los osteocitos ⁽²⁵⁾.

El envejecimiento, la pérdida de esteroides sexuales, el exceso de glucocorticoides y ciertas enfermedades óseas como la osteoporosis, provocan un desacoplamiento en el remodelado óseo y una pérdida de la calidad de la masa ósea por la acumulación de osteocitos apoptóticos que preceden el reclutamiento de precursores osteoclásticos y su diferenciación para llevar a cabo el proceso de resorción ósea dirigida ⁽⁴⁰⁾ ⁽⁴¹⁾. Sin embargo, niveles fisiológicos de estimulación mecánica como el ejercicio físico mantiene la viabilidad de los osteocitos y, además, como se demuestra en el trabajo realizado por Cadenas Martín M y Col. ⁽³⁹⁾, actúa sobre su comportamiento modificando la producción de ciertas quimioquinas y regulando la migración de diferentes tipos celulares.

1.2.2. ROL DE LOS MACRÓFAGOS EN LA REABSORCIÓN ÓSEA ALVEOLAR

La fuerza mecánica, induce el remodelado del hueso alveolar, y la acción de los macrófagos en la inflamación local cumple un papel crítico. Aún la heterogeneidad del macrófago sigue sin conocerse en profundidad. La secuencia de la célula RNA fue

utilizada para estudiar esta heterogeneidad de la célula macrofagica durante el remodelado alveolar. El estudio llevado a cabo en China por Hao Xu y Col. ⁽⁴²⁾ identifico que subpoblaciones de macrófagos expresan genes con perfiles y funciones específicas. La comunicación celular y el análisis de la trayectoria celular, revelo un papel central de un grupo de Macrófagos denominados Ccr2, con la señalización crucial del grupo “CCL” para indicarles la ruta. Se demostró que el grupo Ccr2 modula la remodelación ósea asociado a la inflamación a través de la ruta NF-k8. Bloquear a los macrófagos del grupo Ccr2 podría significar la reducción del movimiento dentario en los tratamientos de ortodoncia. Además, confirmaron la presencia de dicho grupo de macrófagos, presentes en el tejido periodontal de humanos. Estos descubrimientos revelaron que las fuerzas mecánicas inducen un cambio funcional en los macrófagos del grupo Ccr2 mediados por la ruta NF-k8, generando una respuesta proinflamatoria y el remodelado óseo. Este grupo de macrófagos representa entonces un blanco potencial, para la manipulación del remodelado durante el tratamiento de ortodoncia.

Con una naturaleza altamente flexible y una habilidad para adaptarse rápidamente al microambiente local, los macrófagos cumplen un papel fundamental para el modelado y remodelado óseo, sirviendo como progenitores de los osteoclastos, moduladores de la inflamación, y efectores de la fuerza mecánica. Estudios previos muestran como son fuentes esenciales de la proinflamación, como algunas citoquinas incluyendo IL1b, IL-6, TNF-a y GM-CSF ⁽⁴²⁾.

De todas formas, aun es algo impreciso el origen, la función, y la dinámica de los cambios de los macrófagos durante las fuerzas inducidas que interfieren en el remodelado óseo. El origen de los macrófagos que pertenecen al tejido periodontal es crucial para modular la función de los macrófagos durante el remodelado óseo que se genera luego de las fuerzas ortodóncicas aplicadas a las piezas dentarias. Aun no se ha demostrado de donde proceden los macrófagos que están involucrados en el remodelado óseo alveolar inducido por fuerzas mecánicas.

Resumiendo, en un trabajo que realizo Hao Xu y Col. ⁽⁴²⁾ se revelo la diversidad de macrófagos que actúan durante las fuerzas del tratamiento de la ortodoncia, con el objetivo de proveer blancos específicos para la modulación del microambiente inflamatorio en los futuros tratamientos de ortodoncia.

Los resultados indicaron que los macrófagos en el hueso alveolar pueden ser categorizados en diferentes grupos con funciones específicas. Se definieron macrófagos residentes del tejido óseo a través de análisis funcionales y a través de caracterización de expresión génica de todos los grupos de estas células. La comunicación de las células revela que la ruta de señalización de CCL exhibe los patrones de señalización más prominentes dentro del grupo Ccr2. La comparación de los perfiles de expresión génica y funcional de grupos de Ccr2 antes y después de OTM (orthodontic tooth movement) revelaron un aumento significativo en la producción de la inflamación luego del movimiento ortodóntico dentario. Además, mostraron que el Ccr2/CCL2 juega un papel fundamental en los macrófagos Ccr2+. La reducción del CCR2 lleva a la inhibición del

OTM. Bloqueando CCR2 con un inhibidor o silenciando el CCR2 lleva a un descenso en el factor de expresión pro-inflamatorio, el cual está mediado por la fosforilación de p65 y activación de NF- κ B (factor nuclear kappa-B). Exponiendo los mecanismos inmunológicos envueltos en el movimiento dental, el tratamiento individual basado en las características fisiológicas puede emplearse para ajustar y controlar el movimiento durante el tratamiento de ortodoncia; el dolor producido mediante el tratamiento puede ser aliviado seleccionando mediadores específicos ⁽⁴²⁾. La inmunidad innata y la respuesta inmunológica adaptativa coordinadamente controlan la absorción y reconstrucción ósea. De todas formas, la inflamación excesiva está implicada en la reabsorción patológica. Los enfoques inmunomodulatorios que seleccionan tipos celulares específicos pueden ayudar a la resolución oportuna de la inflamación y modular el remodelado óseo ⁽⁴²⁾.

Los macrófagos de la médula ósea están involucrados en la remoción de las células apoptóticas, particularmente osteoblastos apoptóticos, a través de un proceso denominado eferocitosis. Este proceso fagocitario cumple un papel esencial en el rol de la homeostasis del hueso durante la condición patológica del mismo y durante la formación de hueso fisiológica. Estudios recientes revelaron que la cura exitosa de una fractura ósea es gobernada por comunicación controlada y coordinada entre las células inflamatorias y las células formadoras de hueso, particularmente macrófagos y células madre mesenquimatosas (MSCs) ⁽⁴²⁾. Vi et al. Verificaron que la reparación de hueso en ratas es orquestada por la secreción de células macrofágicas ⁽⁴³⁾. Las moléculas paracrina de señalización que derivan de los macrófagos, como oncostatin M, - Prostaglandina E2 (PGE2) y la proteína 2 morfogenética del hueso (BMP2) han demostrado que cumplen papeles críticos en la modulación del remodelado óseo ⁽⁴³⁾⁽⁴⁴⁾.

Además, aunque ha sido observado el rol fundamental del macrófago durante la formación de hueso y los procesos de reparación, los mecanismos aún están poco claros. Las cepas convencionales estudiadas de macrófagos, clásica y alternativamente activadas, son insuficientes para conocer los detalles de los mecanismos de acción. La tecnología celular, provee un enfoque práctico para dilucidar información previamente oculta entre las células individuales, separando células de tejidos. El análisis de la secuencia scRNA demostró por primera vez, la existencia de diferentes grupos de macrófagos con funciones específicas en la médula del hueso alveolar. Esto permite investigar en profundidad que tan involucradas están las células en el tejido óseo, durante la formación de este y luego de haber sido inducido una fuerza. De todas formas, el movimiento dentario producido por la ortodoncia es un proceso largo con cambios dinámicos en la cantidad y heterogeneidad de los macrófagos. A pesar de que este estudio reciente observó 7 días de movimientos dentarios en ratas, deberían estudiarse más casos que involucren distinta cantidad de días de aplicación de fuerzas en los dientes de los roedores.

El dogma que conocemos menciona que los macrófagos se originan de monocitos circulantes en la sangre. Recientemente esta teoría fue desafiada por estudios de

seguimiento de linaje, los que comprueban que muchos macrófagos residentes en los tejidos provienen de precursores embrionarios ⁽⁴⁵⁾. La colaboración entre los macrófagos infiltrados y residentes, han probado que contribuyen a la reparación óptima de las fracturas óseas ⁽⁴⁵⁾. Los macrófagos residentes en el tejido óseo han sido caracterizados por muchos estudios con F4/80+ Mac-2- / en tres diámetros diferentes de tejido óseo, y han comprobado formar parte del tejido óseo ⁽⁴⁵⁾.

Simultáneamente, cumplen un papel fundamental en la homeostasis del tejido óseo, regulando la función de los osteoblastos. Sin embargo, las características detalladas y las funciones de las células macrófágicas que residen en el hueso aun no son del todo claras. Hao xu et al identificó un grupo de macrófagos residentes del hueso con valores altos en los genes Trem 2, Pf4, y Vcam-1. Activando los receptores expresados en las células mieloides (Trem2) se puede regular la diferenciación celular del osteoclasto a través de las señales ROS durante la periodontitis ⁽⁴⁶⁾.

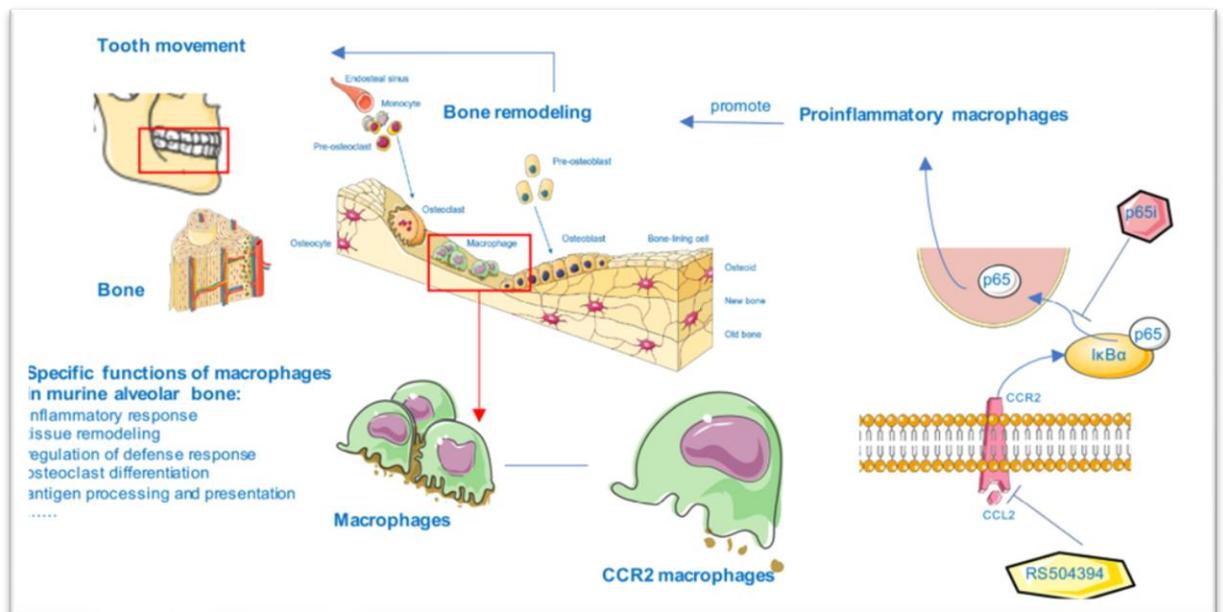


Figura 4. Imagen extraída de “*ccr2*⁺ macrophages promote orthodontic tooth movement and alveolar bone remodeling” (gráfico donde se visualizan los Macrófagos involucrados en el tejido óseo ⁽⁴²⁾).

3.2.3 EL ROL DEL FACTOR NUCLEAR KAPPA-B COMO REGULADOR DE LA REABSORCIÓN ÓSEA ALVEOLAR ⁽⁶⁸⁾.

El remodelado óseo alveolar en el movimiento dentario en ortodoncia (OTM) es un proceso regulado que coordina la reabsorción por osteoclastos y la formación de hueso nuevo por osteoblastos. La OTM tiene tres fases ⁽⁶⁸⁾:

1. Inflexión inicial del diente dentro del ligamento periodontal.
2. Una fase de retraso, donde se observa un área de hialinización en el sitio de compresión y donde los osteoclastos median la reabsorción ósea.
3. Sucede un movimiento rápido del diente involucrado.

Los osteoclastos son esenciales en el mantenimiento del hueso, reparación y remodelado. En la carga mecánica, las células alrededor del diente inducen la osteoclastogénesis a través de la regulación del activador de ligando del factor nuclear- jB (RANKL). Cuando los osteoclastos absorben el hueso alveolar junto al tejido hialinizado, los espacios de PDL se ensanchan y el diente comienza a moverse en la dirección que fue ejercida la fuerza. Hasta la fecha, los mecanismos subyacentes de los principales tipos de células en OTM y cómo regulan este proceso siguen sin estar claros ⁽⁶⁸⁾.

El OTM implica la estrecha interacción de varios tipos de células que producen RANKL para inducir la osteoclastogénesis. Las células del linaje de osteoblastos, incluidos los osteoblastos y los osteocitos, estimulan la resorción ósea mediante la expresión de RANKL y contribuyen a la formación ósea. Los osteocitos son el principal mecanosensor en el hueso y desempeñan un papel esencial en la inducción de la osteoclastogénesis durante OTM. El ligamento periodontal (PDL) es el tejido fibroso entre el cemento y el hueso alveolar que mantiene un diente en la cavidad ósea y los fibroblastos del ligamento transmiten señales mecánicas ⁽⁶⁸⁾.

Recientemente, se informó que el RANKL de los fibroblastos del PDL y células de revestimiento óseo era esencial en el OTM y en la osteoclastogénesis en respuesta a la carga mecánica. ⁽⁴⁾ Curiosamente, los fibroblastos tienen varias características similares a los osteoblastos y exhiben actividad promotora regulada por un elemento de respuesta de 2,3 Kb en el promotor Col1a1, exhiben alta actividad fosfatasa alcalina y tienen otros marcadores asociados a los huesos ⁽⁶⁸⁾.

Los ratones 2.3 kb Col1a1-Cre (raza de ratones) se utilizan ampliamente en estudios mecánicos para examinar la actividad de promoción y expresión génica en osteoblastos, osteocitos y fibroblastos del ligamento periodontal ⁽⁶⁸⁾.

En estudios anteriores, este elemento regulador se utilizó para generar ratones transgénicos que expresaban un linaje negativo dominante específico de un inhibidor de la $\text{I}\kappa\text{B}$ quinasa (IKK-DN) en osteoblastos y fibroblastos. El NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ es un regulador maestro de la inflamación, induce osteoclastogénesis e inhibe la formación de nuevo hueso. Los miembros de NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ son RelA (p65), p50, p52, RelB y RelC, el complejo heterodimérico p65/p50, NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ canónico, es la isoforma más común de NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ en células de mamíferos. La vía canónica NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ es activada por estímulos proinflamatorios como el factor de necrosis tumoral (TNF) e IL-1, mientras que la vía NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ alternativa es activada por un pequeño subconjunto de miembros de la familia TNF. Cuando el NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ está inactivo, se combina con inhibidores del NF- jB (I jB) y existe en el citoplasma. Cuando el inhibidor de $\text{I}\kappa\text{B}$ quinasa (IKK) es activado, causa la degradación de I jB y NF- jB se transloca al núcleo, estimulando la transcripción del gen proinflamatorio. Por el contrario, la inhibición o eliminación de IKK previene la activación NF- jB . Estudios anteriores informaron que NF- $\text{I}\kappa\text{B}$ afectó la remodelación ósea predominantemente induciendo la formación y actividad de osteoclastos. Aunque el papel de la señalización IKK/NF- jB en la periodontitis está bien establecido, su papel en el mecanismo de remodelado óseo a

través de fuerzas mecánicas inducidas (como es el caso de OTM) no ha sido reportada ⁽⁶⁸⁾.

El objetivo del estudio realizado por Hyeran Helen Jeona et al, fue investigar el efecto de la señalización IKK/NE-KB en las células del linaje osteoblástico y los fibroblastos del ligamento periodontal durante el OTM, examinando ratones transgénicos con un inhibidor negativo dominante de Nr-Ib bajo el control de un promotor de colágeno 1a1 de 2,3 kb. Se encontró que OTM se redujo significativamente con menos osteoclastogénesis, el espacio del ligamento periodontal más estrecho, una mayor fracción de volumen óseo y menos expresión de RANKL en ratones experimentales IKK-DN ⁽⁶⁸⁾.

Este estudio demostró la importancia de la activación de NF-1B en las células del linaje osteoblástico y en fibroblastos, en la transducción de fuerzas mecánicas durante el OTM, ya que la inhibición de este redujo significativamente la OTM. Se demostró por primera vez que la inhibición de la activación de NF-IB en las células del linaje de osteoblastos y los fibroblastos de PDL redujo significativamente la OTM. Este hallazgo se apoyó aún más por una menor formación de osteoclastos, un ancho del espacio del ligamento periodontal menor, una mayor fracción de volumen óseo y una reducción de la expresión de RANKL en ratones TG experimentales en comparación con los ratones WT.

Los resultados establecieron la importancia de las células del linaje osteoblastos y los fibroblastos PDL en OTM en respuesta a las fuerzas de ortodoncia mediadas por la regulación NF-jB en estas células. La vía de señalización NF-jB juega un papel importante en la remodelación ósea fisiológica y patológica ⁽⁶⁹⁾. Zuo et al. ⁽⁷⁰⁾ informaron que NF-IB se produjo rápidamente, principalmente en osteoclastos, en respuesta a la fuerza ortodoncia y la activación de NF-JB fue esencial en la diferenciación osteoclastos inducida por RANKL en OTM.

Un estudio reciente demostró que la vibración combinada con la fuerza de ortodoncia aumentó la activación de NF-KB y la expresión de RANKL en osteocitos in vitro ⁽⁷¹⁾. Del mismo modo, la fuerza de ortodoncia continua junto a la vibración de alta frecuencia aumentó la osteoclastogénesis y aceleró la OTM a través de la activación de la vía NF-kb en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos. El trabajo realizado por Hyeran Helen Jeon et al ⁽⁶⁸⁾, fue el primero en examinar el efecto de la activación de NF-kB en el remodelado óseo inducido por fuerzas mecánicas. Se observó la activación de NF-kB en el lado de la compresión en ratones W, que fue considerablemente menor en ratones TG experimentales, lo que llevó a una reducción significativa de OTM.

Los roles de NF-1B en la osteoclastogénesis inducida por RANKL son bien conocidos. La inhibición de NF-iB previene la diferenciación de las células precursoras en osteoclastos por FNT y RANKL, lo que demuestra que las vías NF-iB son necesarias para la diferenciación y actividad de los osteoclastos. ⁽³³⁾ Los ratones con doble deficiencia NF-jB p50 y p52 demuestran falta de osteoclastos ⁽⁶⁸⁾.

Otero et al. encontraron que la activación de NF- κ B era capaz de inducir la diferenciación de osteoclastos en ausencia de RANK o RANKL. En el estudio realizado por Hyeran Helen Jeon et al ⁽⁶⁸⁾, tanto la formación osteoclástica como la expresión de RANKL, fueron menor en ratones TG con inhibición de NF- κ B en células osteoblásticas y fibroblastos del PDL, comparados a ratones WT. Examinaron previamente en los mismos ratones transgénicos un modelo de periodontitis, demuestran que la localización nuclear del NF- κ B, indicativa de la activación de NF- κ B, en las células del linaje osteoblastos y fibroblastos se suprimió en ratones TG experimentales, y que la inhibición de la activación de NF- κ B bloquea la pérdida de hueso en ratas normo glucémicas y con diabetes ⁽⁷²⁾⁽⁷³⁾. Los osteoblastos y fibroblastos activados por NF- κ B cumplen un papel fundamental en el remodelado óseo, en la periodontitis inflamatoria y en la respuesta a las fuerzas de ortodoncia. El gran número de fibroblastos del PDL y células del linaje osteoblástico y su proximidad al hueso alveolar, cumplen un papel esencial en la transducción de fuerzas mecánicas que conducen a la resorción ósea que sucede en respuesta a la fuerza ortodóncica. Los fibroblastos del PDL constituyen del 50 % al 60 % de la cantidad total de células del PDL y son una fuente importante de Rank-L y se ha demostrado que estimulan las células progenitoras de osteoclastos. Además, la activación de NF κ B en osteoblastos es inducida por fuerza mecánica y la inhibición de NF- κ B en los osteoblastos reduce la reabsorción ósea y estimula la formación ósea para reducir la pérdida de hueso periodontal ⁽⁶⁸⁾.

Los osteocitos, que comprenden el 90% de todas las células óseas, muestran altos niveles de expresión RANKL y apoyan la osteoclastogénesis in vitro y la remodelación ósea alveolar durante el OTM. En resumen, se demostró por primera vez que las células del linaje osteoblástico y los fibroblastos del PDL desempeñan un papel esencial en la OTM a través de la regulación de NF- κ B. El bloqueo de la activación de NF- κ B en esas células redujo significativamente la osteoclastogénesis y la expresión de RANKL en respuesta a la fuerza mecánica e impidió el movimiento de los dientes, lo que indica que la vía de señalización IKK/NF- κ B en estas células es necesaria para mediar el OTM. Estos estudios proporcionan una nueva comprensión sobre la respuesta biológica a la fuerza mecánica y sugieren los beneficios clínicos del uso de la activación/inhibición de NF- κ B en ortodoncia clínica ⁽⁶⁸⁾.

3.3 EL OSTEOCITO COMO REGULADOR DE LA FORMACIÓN ÓSEA

Segundos después de la estimulación mecánica, los osteocitos liberan NO, ATP y PGs. Todas estas señales anabólicas activan a los osteoblastos y células de revestimiento óseo presentes en la superficie del hueso a través de uniones gap. El NO en el hueso inhibe la reabsorción ósea y promueve la formación ósea. Anteriormente hicimos referencia a la capacidad de la PGE2 35 como citoquina que actúa tanto sobre osteoblastos como sobre osteoclastos y desencadena tanto respuestas estimulatorias como inhibitorias. Si bien estas moléculas se asocian con la activación de una respuesta anabólica en el hueso, es

la rápida activación del Wnt/ β -catenina en los osteoblastos luego de la aplicación de una fuerza la que ha cobrado el mayor interés en el último tiempo.

Los osteocitos a través de la síntesis y secreción de la glicoproteína esclerostina, producto del gen SOST, regulan la función osteoblástica a través de la vía de señalización de Wnt. Dicha glicoproteína es un potente inhibidor de la formación ósea a través del bloqueo del camino de señalización Wnt/ β -catenina en los osteoblastos al competir por el receptor Lrp5/6 bloqueando su unión a Wnt ⁽²⁶⁾ ⁽²⁷⁾.

Entre los efectos de la activación de la vía Wnt en osteoblastos encontramos que además regula la transcripción génica de OPG122 y RANKL. Tanto el tratamiento con PTH como la estimulación mecánica reducen la expresión de esclerostina y de esta manera estimulan la formación ósea. In vivo se demostró que la aplicación de fuerzas provoca una disminución significativa en la proporción de osteocitos esclerostina-positivos 24 horas después de la aplicación de fuerzas, mostrando mayores reducciones en la zona donde el estímulo mecánico también fue mayor, lo que sugiere una asociación directa entre la expresión de esclerostina y la distribución de la fuerza ⁽²⁸⁾.

A la hora de recibido el estímulo mecánico esta disminución de esclerostina es significativa, independiente del tipo de fuerza recibida. Esto sugiere que uno de los mecanismos a través de los cuales los osteocitos regulan la remodelación ósea adaptativa incluye la activación del camino canónico Wnt/ β -catenina mediante la supresión de la proteína esclerostina como modulador negativo de la formación ósea ⁽²⁾.

3.4 ROL DE SEMAFORINA 3A EN LA REGULACION DEL REMODELADO DEL HUESO ALVEOLAR EN EL MOVIMIENTO ORTODÓNCICO DENTARIO ⁽⁶¹⁾.

Un estudio reciente reveló que la Semaforina 3A (Sema3A) ejerce un efecto osteoprotector al contener la resorción ósea y al aumentar la formación ósea ⁽⁵⁸⁾. Las semaforinas son una familia de células superficiales y proteínas solubles que regulan tanto las interacciones entre célula y célula como la diferenciación, la morfología y la función de las células. La característica más común y específica de la familia de semaforinas es la presencia del campo extracelular SEMA, y del campo cysteinerich plexin, semaforina e integrina (campo PSI), ambos campos se encuentran en la parte terminal del amino de la proteína. La familia de semaforinas incluye 8 subclases: clases 1-7 y V ⁽⁵⁹⁾ ⁽⁶⁰⁾.

Sema3A es una proteína clase 3 secretada principalmente por osteoblastos, la cual inhibe el desplazamiento de progenitores osteoclasticos al reprimir la activación de un miembro homólogo de la familia (RhoA). Además, Plexin A1 promueve la osteoclastogénesis al activarse un receptor inmunológico dependiente de tirosina (ITAM), al entrar en contacto con el receptor desencadenante, presente en las células mieloides (TREM2). El Sema3A unido a neuropilin-1 inhibe la potencial diferenciación de progenitores osteoclasticos al alejar a Plexin-A1 de TREM2 ⁽⁶¹⁾.

El Sema3A se encuentra involucrado en la formación de la trayectoria de erupción de los dientes de las ratas, modulando la actividad osteoclástica ⁽⁶³⁾. Si bien se ha demostrado que el Sema3A se produce en los ligamentos periodontales humanos (PDL) a través de pre-osteoblastos y fibroblastos del PDL ⁽⁶⁴⁾, no se sabe con exactitud como está involucrado en el OTM. Aunque la tensión mecánica y algunas citoquinas inflamatorias estimulen las células de los ligamentos periodontales para regular la expresión RANKL, poco se conoce acerca de los factores que regulan la expresión Sema3A. Hirokazu Kamei et Al, al utilizar un modelo OTM, mostraron cómo el Sema3A afecta al OTM y cómo factores identificados influyen la expresión Sema3A in vivo e in vitro. Estos resultados nos ayudan a explicar uno de los mecanismos del OTM y de la remodelación ósea ⁽⁶¹⁾.

Este estudio, reveló que el Sema3A promueve la diferenciación de osteoblastos al activar el canal catiónico Wnt/ β . Se considera que Sema3A juega un rol esencial en la fase de la formación ósea, en la cual los osteoblastos crean hueso mientras que al mismo tiempo previene que los osteoclastos se desplacen a los sitios de formación y reabsorba el hueso recientemente formado. El hueso alveolar alrededor de la raíz de los dientes se remodela constantemente, y los osteoblastos en la superficie del hueso alveolar secretan Sema3A durante el remodelado para mantener a los osteoclastos alejados del sitio de remodelación. Durante el movimiento de ortodoncia, se demostró que, en el sitio de compresión de la raíz sometida a fuerzas ortodóncicas, hay una disminución de Sema3A, lo cual inhibe a la diferenciación osteoblástica y promueve la diferenciación osteoclástica, creando un ambiente ideal para la reabsorción ósea. En el sitio de tensión, el aumento de Sema3A promueve la diferenciación osteoblástica creando un ambiente de formación ósea, promoviendo la formación y mineralización de este tejido óseo, e inhibe la osteoclástica ⁽⁶²⁾.

La estimulación de IL-1 β aumenta la expresión e ARNm y Sema3A a través de PCR en tiempo real (RT-qPCR o Reverse transcription quantitative real-time PCR), y aún más IL-1 β se observa en el sitio de tensión de OTM en los días 1, 3, y 7 comparado con el sitio de compresión en inmunohistoquímica. Fue reportado un aumento de IL-1 β cuando la fuerza de tensión aplicada es mayor en el ligamento periodontal de humanos ⁽⁶⁵⁾ ⁽⁶⁶⁾ y la IL-1 β aumenta en el líquido crevicular en ambos lados de la raíz del diente (sitio de tensión y de compresión) durante el OTM, aunque este aumento es mayor en el sitio de tensión ⁽⁶⁷⁾.

Los resultados que obtuvieron Hirokazu Kamei et. Al fueron consistentes con los anteriormente narrados. A pesar de esto, los experimentos realizados no revelaron como la IL-1 β regula la expresión de la Sema3A. Se demostró que la IL-6 y IFN- γ redujeron la expresión de Sema3A y mRNA en osteoblastos. Estas citoquinas inflamatorias también regulan la expresión de Sema3A y podrían estar involucradas ⁽⁶²⁾.

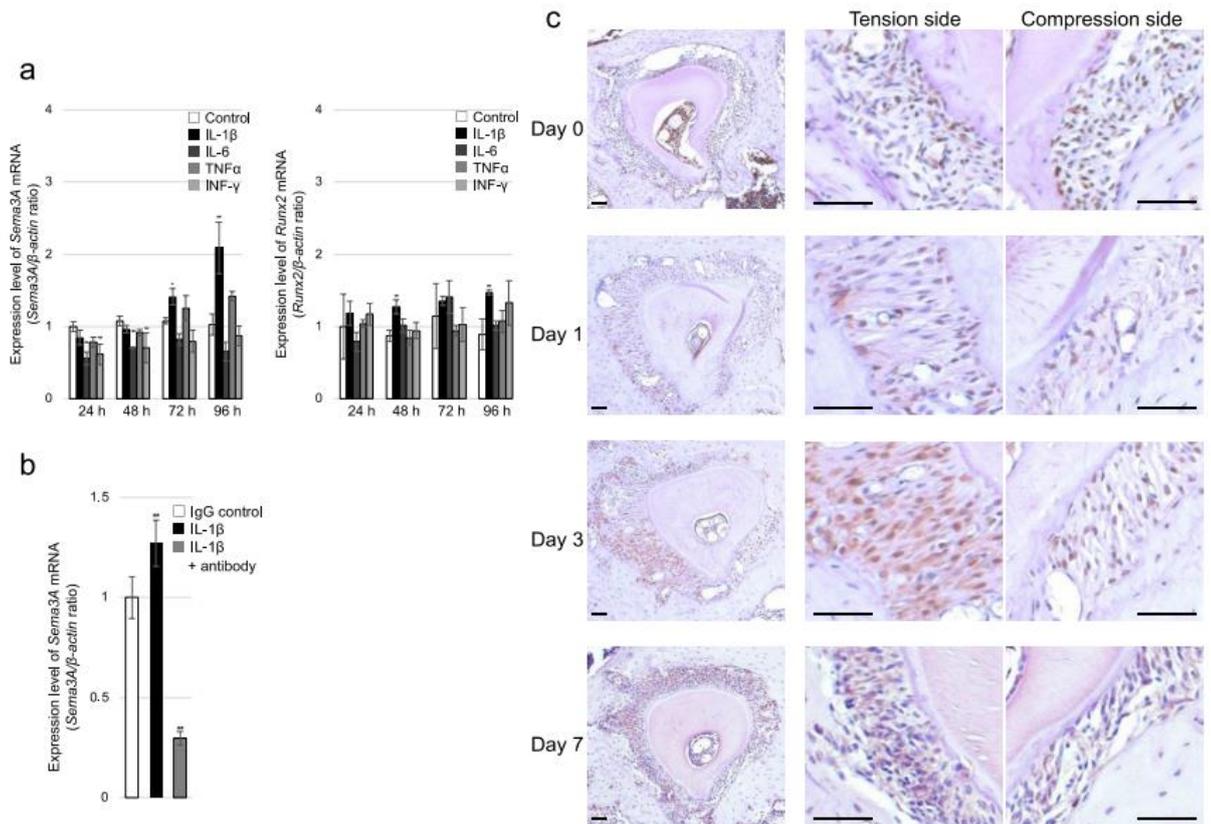


Figura 5. Imagen extraída de “Semaphorin 3A regulates alveolar bone remodeling on orthodontic tooth movement” (a) Sema3A y Runx2 mRNA cuantificadas por PCR en tiempo real en osteoblastos luego de 24, 48, 72, y 96 horas en ausencia o presencia de citoquinas inflamatorias. La expresión de Sema3A aumento a las 72 y 96 horas con IL-1β y se redujo significativamente luego de las 24 y 48 horas con IL-6 y INF-γ. Las barras representan los niveles de Sema3A y Runx2 mRNA relativos a los niveles de β-actina mRNA. (b) cuantificación de Sema3A mRNA a través de RT-qPCR en osteoblastos tratados con IgG en el grupo control, IL-1β e IL-1β + antibody. (c) inmunohistoquímica para observar la IL-1β. Cortes horizontales en los días 0, 1, 3, y 7 luego del movimiento OTM. Hubo más células positivas para IL-1β- en el sitio de tensión comparado al sitio de compresión en los días 1, 3 y 7. Se utilizo una escala de 50 μm. ⁽⁶²⁾.

4) RESPUESTA ESPECÍFICA DE LAS CÉLULAS EFECTORAS

4.1 EFECTO DE FUERZAS DE DISTINTA MAGNITUD SOBRE LOS OSTEOCITOS

Existen pocos estudios que hayan evaluado la respuesta de las células óseas a distintas magnitudes de fuerzas. Los primeros trabajos sobre la respuesta osteocitaria a estímulos mecánicos de diferentes magnitudes mostraron in vitro que el estrés generado por FFSS (fluid flow shear stress) de baja magnitud (0,5 Pa) e impacto (0,4 Pa/s) es más eficaz en inducir respuestas bioquímicas en los osteocitos que las fuerzas hidrostáticas compresivas de 13kPa y 35kPa ⁽²⁹⁾ esto sugiere que el mecanismo mecanotransductor de los osteocitos estaría activado por las fuerzas de deslizamiento de baja magnitud. En un estudio in vivo (30) se evaluó la respuesta de huesos largos sometidos a dos

protocolos de estimulación mecánica, uno de baja magnitud y alta frecuencia (500 $\mu\epsilon$ a 30 Hz) y otro de alta magnitud y baja frecuencia (3000 $\mu\epsilon$ a 1 Hz) durante 4 semanas, determinando que sólo la baja magnitud estimuló la formación ósea y la expresión de ARNm para Col I en los osteocitos.

Bacabac y col. ⁽³¹⁾ demostraron que la frecuencia y magnitud de las fuerzas es un parámetro importante para la activación de la célula. Realizaron un trabajo de investigación donde se estudió in vitro la respuesta de los osteoblastos a diferentes grados de fuerzas y se determinó que la producción de NO es directamente proporcional al grado de fuerzas. En otro trabajo donde se estimularon mecánicamente células osteoblásticas in vitro con fuerzas cíclicas traccionales de diferente magnitud durante 24 horas, pudieron determinar que se produce un incremento en la síntesis de OPG y una disminución en la síntesis de RANKL ⁽³²⁾.

Basados en las observaciones realizadas por Carola B. Bozal y Col. ⁽²⁾ la aplicación in vivo de fuerzas ortodóncicas de magnitudes extremas (fuerza fuerte de 230 g y fuerza liviana de 16 g) no mostró diferencias en la respuesta osteocitaria inmediata (1 y 2 horas después de la aplicación de las fuerzas); sin embargo, es de esperar que la respuesta muestre diferencias a medida que avanza el tiempo de aplicación. Esto nos permite sugerir que los osteocitos responden en forma inmediata a la aplicación de las fuerzas, independientemente de la magnitud, y que a medida que se mantiene el estímulo la célula comienza a manifestar respuestas diferentes en función de que las fuerzas estén dentro del rango fisiológico o, por el contrario, sean fuerzas suprafiológicas o infrafiológicas.

La ortodoncia ejerce diferentes tipos de fuerzas, que generan distintos efectos biomecánicos: presión y tensión. Se asume que los cambios en el tejido periodontal durante las fuerzas ortodóncicas influyen mecánicamente al hueso alveolar, actuando sobre la actividad del osteocito y la red de comunicación de este durante los procesos adaptativos. Los estudios en el osteocito alveolar muestran que la aplicación de fuerzas de tensión durante 48 horas, generan la expresión de la proteína conexina 43, mientras que la aplicación de fuerzas de presión luego de 24 horas resulta en un crecimiento de osteocitos apoptóticos, llegando a un pico en la proporción de osteocitos necróticos y lagunas vacías a los 2 y 4 días respectivamente ⁽³⁴⁾.

Los resultados obtenidos de un modelo experimental que combina ambos tipos de fuerzas mostraron que la expresión de DMP1 (proteína de matriz dentinaria) aumentaba luego de 6 horas aplicada la fuerza y llegaba a un pico máximo entre los 3 y 7 días posteriores a la aplicación de esta, y que la expresión de MEPE (fosfoglicoproteína de matriz extracelular) aumentaba a los 3 días. De acuerdo con los reportes de la literatura, el porcentaje de osteopontina (en los osteocitos) y el factor de crecimiento de tejido conectivo (CTGF) y expresión de ARNm en osteocitos, también aumento 12 horas luego de aplicar la fuerza. Estudios previos mostraron que tanto las fuerzas compresivas como de tensión generadas en ortodoncia, inducen a cambios tempranos en los osteocitos y sus lagunas, lo cual se manifiesta como un aumento en el volumen lacunar

y cambios en su forma y orientación, con un incremento en el ancho canalicular y en el crecimiento longitudinal de los procesos citoplasmáticos⁽³⁴⁾.

Un estudio in vitro de la respuesta de las células osteoblásticas muestra que la producción de óxido nítrico es linealmente dependiente del corte de la fuerza, mostrando que la tasa de deformación (determinada por frecuencia y magnitud) es un parámetro importante para la activación celular⁽³⁴⁾.

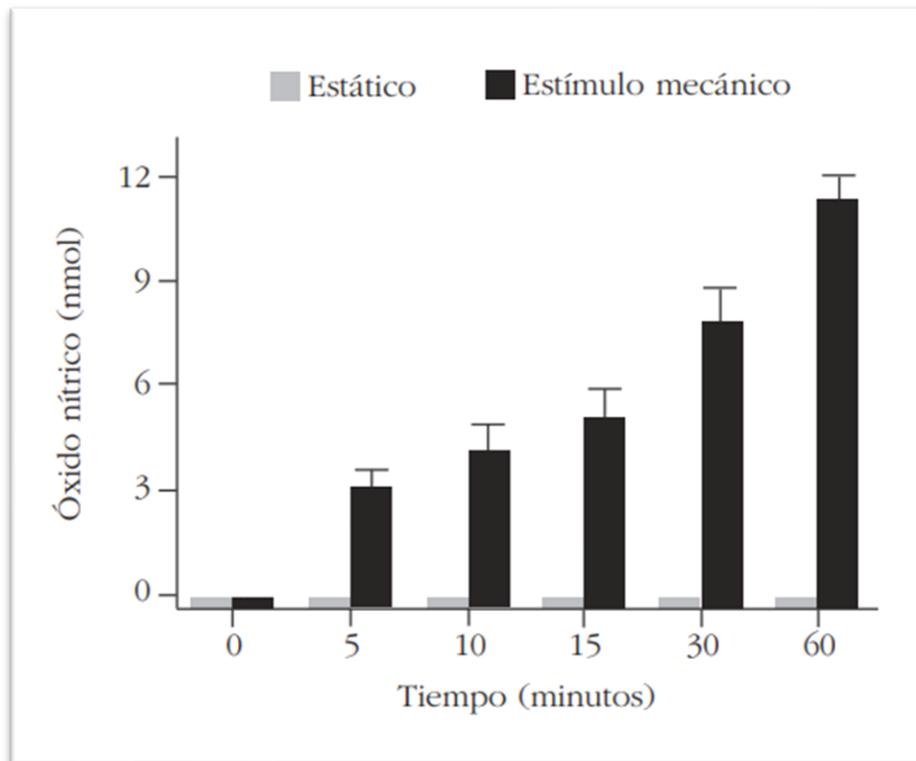


Figura 6. Imagen extraída de “Los osteocitos como mecanosensores del hueso.” Producción de óxido nítrico en respuesta a estímulos mecánicos. La aplicación de un flujo pulsátil directamente sobre la membrana celular de células osteoblásticas (HOS-TE85) induce una marcada secreción de óxido nítrico al medio (barras negras), incrementando ésta con la duración del estímulo. Por el contrario, no se detectó óxido nítrico en aquellas células que no fueron estimuladas mecánicamente (barras grises). nmol= ⁽¹⁾

En un estudio realizado en el año 2018 en la Universidad de Buenos Aires, Argentina, Facultad de Odontología, en la Cátedra de Histología y Embriología⁽³⁴⁾ se realizó el primer estudio que evaluaba in vitro la respuesta de los osteocitos alveolares a diferentes fuerzas de ortodoncia, usando un modelo experimental para movimiento de dientes en ratas. Crearon un resorte que permitía ser adaptado y activado con fuerzas de distintas magnitudes y así analizar las células comprometidas en el proceso de remodelación adaptativa del hueso. En este estudio se observó una disminución en el número de osteocitos TUNEL positivos en los grupos de fuerzas livianas y pesadas, con una marcada disminución en el lado de tensión. En otro estudio, el hueso alveolar sujeto a fuerzas de ortodoncia exhibió un crecimiento en osteocitos TUNEL positivos en el sitio de presión luego de tres horas aplicada la fuerza, llegando a un pico máximo a las 24

horas. En otros estudios se encontraron zonas de hialinización en el ligamento periodontal en el sitio de presión, lo cual suprime el sistema de transporte de sustancias, resultando en isquemia e hipoxia, lo cual lleva a la muerte celular, incluidos los osteocitos. También en este estudio, los resultados muestran un aumento en el número de osteocitos TUNEL positivos, y no muestra hialinización del tejido periodontal al que no se le detuvo la nutrición, previniendo que los osteocitos entren en apoptosis⁽³⁴⁾.

Se sabe que las fuerzas ejercen un efecto anti apoptótico. Detener el estrés revierte la apoptosis de células endoteliales inducida por diferentes estímulos. También detener el estrés regula la expresión de integrinas y mecanotransductores ubicados en la superficie celular. Muchas integrinas previenen la apoptosis y se sugiere que la señalización de integrinas antiapoptóticas, involucra la activación de la señal de regulación extracelular Kinasa (ERK) 1/218. Muchos estudios en vivo mostraron que la estimulación mecánica inhibe la apoptosis del osteocito por falta de suero, dexametasona y TNF α . Los osteocitos detectan el corte del estrés del fluido canalicular a través de las integrinas, y la producción de óxido nítrico comienza inmediatamente. El ON previene la apoptosis de las células endoteliales y se piensa que tiene el mismo efecto sobre el osteocito. Otra respuesta del osteocito a las fuerzas mecánicas es la liberación de muchos factores de crecimiento⁽³⁴⁾.

Uniéndose a los receptores celulares, los factores de crecimiento activan canales de señalización que envuelven miembros de la familia de Bcl2 que suprimen la apoptosis. También se demostró que el estímulo mecánico preserva la vida del osteocito activando ERKs y un gen de transcripción in vitro y previene la inducción de apoptosis por glucocorticoide en células osteocíticas MLOY4. Un estudio aún más reciente sugiere que la estimulación por solo 10 minutos es suficiente para generar la señalización que mantiene vivos a los osteocitos. En el trabajo realizado por la Dra. Bozal y Col. (34) los osteocitos sujetos a fuerzas ortodónticas vieron revertida la apoptosis. Entonces es posible que la producción de ON dentro del sistema canalicular, la activación de ERKs y el efecto autocrino de la secreción de factores de crecimiento cuando son sujetos in vivo a estrés mecánico de las fuerzas ortodónticas dentro del rango fisiológico, parece ser un factor de supervivencia importante para los osteocitos dentro del tiempo experimental del estudio⁽³⁴⁾.

En el mismo estudio⁽³⁴⁾, la asociación entre la magnitud de la fuerza y la expresión de osteopontina (OPN) fue evaluado en el lado de presión y de tensión luego de haber aplicado fuerzas ortodónticas, mostrando en todos los casos un aumento de la expresión de OPN, y valores más altos en los osteocitos sujetos a fuerzas livianas. La OPN juega un papel importante en la remodelación ósea ya que promueve y regula la quimiotaxis y agregado de osteoclastos a la superficie del hueso durante la reabsorción ósea. Los estudios reportados en la literatura encontraron que los osteocitos localizados cerca de los sitios de reabsorción expresan OPN durante el movimiento dentario fisiológico y casi todos los osteocitos expresan OPN 48 horas luego de haber sido

sometidos a fuerzas de ortodoncia, antes del reclutamiento de osteoclastos en la superficie.

Carola B Bozal y Col. ⁽³⁴⁾ encontraron que la expresión de OPN aumenta significativamente en la matriz mineralizada del hueso que se encuentra bajo estrés, sugiriendo que la OPN fue sintetizada por osteocitos maduros y no por osteocitos que habían sido recientemente incluidos en la matriz, o por osteoblastos activos localizados en la superficie del hueso. Este fenómeno sugiere que hay una activación clara de los osteocitos comunicados a través de la vía lacunar dentro de la matriz ósea mineralizada. También encontraron un aumento de OPN en el sitio de tensión, donde la formación de hueso es estimulada. La expresión de OPN fue encontrada también durante la formación de hueso en las suturas craneales, sugiriendo que la presencia del OPN es un factor positivo para la formación de hueso por los osteoblastos en las suturas que se encuentran bajo estrés mecánico. Los resultados de este estudio demostraron que las fuerzas de presión y de tensión de magnitudes fisiológicas aplicadas en vivo, parecen activar la mecanotransducción y promover el remodelado por la expresión temprana de OPN osteocitaria.

Es notable que ambas fuerzas (presión y tensión) generan una respuesta osteocitaria inmediata. El crecimiento marcado de la apoptosis y el incremento significativo de expresión de OPN observado luego de la aplicación de distintas fuerzas ortodónticas permite concluir que los osteocitos se activan muy rápidamente cuando son sometidas a aplicaciones de fuerzas en vivo, sean fuerzas de tensión o de presión livianas o pesadas, y determina un papel importante del osteocito como mediador de la activación de la reabsorción y formación ósea, siendo esto lo que sucede como la respuesta final de la aplicación de las fuerzas de ortodoncia⁽³⁴⁾.

4.2 ROL DEL LIGAMENTO PERIODONTAL EN EL REMODELADO ÓSEO, DURANTE LOS MOVIMIENTOS DENTARIOS EN ORTODONCIA.

El movimiento dentario ortodóntico (Orthodontic tooth movement o OTM) es un proceso que depende del remodelado de los tejidos periodontales que rodean a las raíces, principalmente del hueso alveolar, ligamento periodontal, y cemento radicular. Durante el movimiento dentario, el remodelado alveolar es inducido por respuestas biológicas del ligamento periodontal, con formación ósea en el sitio de tensión y reabsorción en el sitio de compresión de este. La asociación entre el estímulo mecánico y el ligamento periodontal ha sido demostrada por múltiples estudios desde diferentes puntos de vista en lo que concierne a biología celular y señalización molecular. Las células del ligamento periodontal cumplen un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis periodontal y regulando el remodelado de este tejido ⁽⁴⁷⁾.

Las células del ligamento periodontal (periodontal ligament o PDL), tienen múltiples funciones locales como formar y mantener el ligamento periodontal, mediar la

reparación del hueso alveolar y el cemento radicular, y la regeneración del tejido periodontal ⁽⁴⁸⁾ ⁽⁴⁹⁾.

Las fuerzas ortodónticas, desencadenan la conversión del estímulo mecánico a señales químicas intercelulares dentro de las células del PDL y actúan activando el remodelado óseo alveolar y consecuentemente, iniciando el OTM. ⁽⁴⁷⁾ Estudios recientes testimonian que las células del PDL pueden sentir estrés mecánico, y transformar el mismo en señales bioquímicas, y eventualmente regular el remodelado óseo, secretando múltiples factores ⁽⁵⁰⁾. Por ejemplo, el activador tisular plasminógeno (tPA) y el inhibidor tisular plasminógeno -1 (tPA-1), matriz metaloproteinasas (MMPs) y sus inhibidores, y citoquinas incluyendo a la Prostaglandina 2 (PGE2) y interleuquina -6 (IL-6) son secretadas bajo estímulo mecánico para regular el remodelado del tejido periodontal ⁽⁵¹⁾ mientras que el receptor activador del ligando Factor nuclear Kappa B (RANKL), RANK, y la osteoprotegerina (OPG) están involucrados en la regulación de la diferenciación osteoclástica por las células del PDL ⁽⁵²⁾.

Durante el OTM, el mecanismo específico a través del cual las células del PDL perciben los estímulos, los traducen en señales biológicas y por último contribuyen a el remodelado óseo, continúa siendo poco claro. Recientemente el canal ion Piezo 1, el cual es mecanosensible, demostró jugar un papel crucial en diferentes tipos de células humanas, transformando los estímulos físicos externos en señales químicas intercelulares. De todas formas, la función del ion Piezo 1 durante el proceso de mecanotransducción de las células del PDL no se ha reportado ⁽⁴⁷⁾.

Recientemente, los canales iónicos en la superficie de las células del PDL involucradas en las rutas de mecanotransducción son prometedoras para la investigación ⁽⁵³⁾. La familia de canales no selectivos catiónicos Piezo, fueron identificadas como subunidades formadoras de poros de canales de iones que son sensibles y permeables a la excitación mecánica que producen los iones de sodio, potasio y calcio ⁽⁵⁴⁾. Los canales Piezo de mamíferos son un complejo de tres hélices trimétricas que contienen al menos 2500 aminoácidos, los cuales incluyen dos subtipos, Piezo 1 y Piezo 2. Piezo 1 es predominantemente expresado en tejidos no sensoriales expuestos a fuerzas mecánicas, mientras que Piezo2 es principalmente expresado en tejidos sensoriales ⁽⁵⁷⁾. El canal Piezo 1 ha sido implicado en la remodelación ósea en la literatura. Múltiples estudios in vivo han provisto de evidencia que Piezo1 removido de las células osteoblásticas de ratas, causan pérdida de hueso y fracturas espontáneas con incremento de reabsorción ósea, sugiriendo que es posible el rol del Piezo 1 en la regulación mecánica, carga-dependiente de la formación y remodelado óseo (Li et al., 2019; Wang et al., 2020b; Zhou et al., 2020). Piezo1 también es expresado en células madre mesenquimales (MSCs) como un factor determinante ante la presión hidrostática, lo cual también implica la relevancia de Piezo 1 en la formación ósea ⁽⁵⁷⁾. Piezo1 también existe en la membrana de células primarias del tejido periodontal. Los estudios in vitro han confirmado que el canal iónico de Piezo 1 puede transmitir señales mecánicas y regular tanto la diferenciación osteogénica y la osteoclastogénesis de las

células del ligamento periodontal a través de varias vías de señalización incluyendo las proteínas quinasas (ERK), factor nuclear kappa B (NF-κB), y caminos de señalización Notch1 (Jin et al., 2015; Shen et al., 2020; Wang et al., 2020a). Estos resultados sugieren que el Piezo 1 tiene un posible rol dentro de la Mecanotransducción durante el OTM. Hasta ahora, la relevancia funcional de Piezo 1 y el remodelado óseo en el sitio de tensión, no ha sido aclarado.

El hueso alveolar y el ligamento periodontal emprenden un proceso de remodelado inducido por las fuerzas mecánicas inducidas durante el movimiento dentario ortodóncico. De todas formas, aún no está completamente especificado como el hueso alveolar y el ligamento periodontal sensan las fuerzas mecánicas. Piezo1, un canal catiónico no selectivo, responde de varias maneras a la estimulación mecánica, incluyendo su elongamiento, deflexión y mediación de la afluencia de Calcio (Ca²⁺). Recientemente, el rol de Piezo1 en el remodelado óseo ha sido reportado por muchos estudios. Para revelar el posible rol de Piezo1 durante la mecanotransducción en el proceso de OTM, el estudio se enfocó en caracterizar la expresión y la función del canal de Piezo1 mecánicamente activado en las células del ligamento periodontal en el remodelado óseo alveolar. En este estudio, la localización de los resultados de inmunofluorescencia mostró que Piezo1 fue expresado principalmente en las células del ligamento y localizado en el plasma y núcleo celular. La expresión de Piezo1 en el grupo de OTM fue seguido durante la aplicación de las fuerzas ortodóncicas. Estudios similares reportaron que el estrés mecánico es asociado con un incremento en los niveles de Piezo1 en las células del ligamento periodontal.

Por lo tanto, Yukun Jiang et al especulan que el canal de Piezo1 es un mecanosensor crucial a través del cual el ligamento periodontal sensa y traduce la fuerza ortodóncica en una respuesta biológica, la cual luego influencia el remodelado del hueso alveolar. Para verificar esto, se llevó a cabo un estudio experimental. El equipo de estudio ha establecido que un modelo de movimiento dentario ortodóncico en ratas para estudiar el rol del ion Piezo 1 durante la mecanotransducción en las células del ligamento periodontal y han investigado los efectos en el sitio de tensión durante el remodelado óseo alveolar ⁽⁴⁷⁾.

En este trabajo se dividieron de manera aleatoria tres grupos de 24 ratas cada uno; un grupo al cual se le aplicaron una fuerza ortodóncica y un inhibidor de Piezo1, un grupo al cual sólo se le aplicaron fuerzas ortodóncicas, y un grupo de control al cual no se le aplicaron fuerzas ortodóncicas. Un resorte de níquel-titanio fue colocado entre el primer molar superior izquierdo y los incisivos para generar una fuerza de 40 gramos, los cuales fueron activados inmediatamente luego de su inserción y la correcta colocación de este fue revisada a diario. No fueron activados nuevamente luego de su inserción durante el tiempo experimental. Los animales expuestos a los Grupos que recibieron fuerzas ortodóncicas más el inhibidor, recibieron una inyección subcutánea de Piezo1 más el inhibidor Grammostola spatulata mechanotoxin 4 (GsMTx4) con una dosis de 20 µl y una concentración de 10µM todos los días, mientras que el grupo expuesto a fuerzas

ortodóncicas sin inhibidor y el grupo control solo recibieron el vehículo. Un total de 6 ratas de cada grupo fueron sacrificadas inmediatamente en el día 0 (el día de la aplicación de la fuerza ortodóncica) para servir como los grupos negativos controles, y en los días 3, 7 y 14 luego del movimiento dentario. Bloques de hueso alveolar incluyeron el primer molar izquierdo, el cual fue intervenido para posteriores análisis (47).

Los resultados de este trabajo mostraron que el canal Piezo1 fue activado durante el OTM en el lado de tensión y se pueden destacar los siguientes resultados:

A) El canal de Piezo1 fue activado por las fuerzas del movimiento ortodóncico en el sitio de tensión, durante los movimientos ortodóncicos dentarios.

Para probar la hipótesis de que el canal de Piezo 1 es un mecanosensor crucial para el remodelado óseo, la expresión de los patrones de Piezo1 en el área periodontal del lado de tensión, fueron examinados primero a través de inmunofluorescencia (IF). Se pudo observar la presencia de este en el ligamento periodontal mientras que no fue encontrado en el hueso alveolar. Piezo1 fue expresando débilmente en el PDL del grupo control (el cual no recibió fuerzas ortodóncicas), mientras que el grupo que activado por aplicaciones de fuerzas ortodóncicas durante todo el periodo experimental arrojó resultados positivos de diferentes magnitudes. Estudios semi cuantitativos revelaron que la expresión de Piezo1 en el grupo de estudio comenzaron a aumentar en el día 2, seguido por un pico máximo luego de 7 días de movimiento dentario, y los valores disminuyeron en el día 14. Cuando el canal inhibidor de Piezo1 denominado GsMTx4 fue aplicado, no se observaron cambios significantes en la expresión de Piezo1, lo cual indica que la expresión de este fue activada por las fuerzas ortodóncicas en el ligamento periodontal durante los movimientos dentarios ortodóncicos.

B) La inhibición del canal Piezo1 impide el movimiento dentario ortodóncico y disminuye la masa ósea alveolar.

La inhibición de los canales de Piezo1 dificulta el movimiento dentario en ortodoncia y disminuye la masa ósea lo cual confirma el efecto del canal de Piezo1 en el OTM. El inhibidor GsMTx4 se utilizó en este estudio para inactivar el canal de Piezo1. Bajo condiciones normales, la distancia entre el primer y segundo molar aumento en el tiempo, con un incremento relativamente rápido en la última etapa (día 7 a 14). Cuando el canal de Piezo1 fue inactivado por el inhibidor GsMTx4, la distancia del movimiento dentario decreció desde el día 7 al 14. Estos resultados sugieren que la función correcta del canal Piezo1 es necesaria para lograr el movimiento dentario ortodóncico.

Luego para evaluar la masa ósea alveolar y los cambios en la microarquitectura del hueso alveolar en el área de tensión de los tres grupos, se utilizaron los parámetros de volumen óseo (bone volumen o BV) Volumen total (Total Volume o TV) Espacio trabecular (trabecular spacing o Tb. Sp) Número trabecular (trabecular number o Tb.N) y espesor trabecular (trabecular thickness o Tb.Th).

Th fue examinado a través de micro CT análisis de alta resolución. Los parámetros muestran una expresión estable de los niveles en el grupo control con diferencias no estáticas a lo largo del experimento. Cuando los tres grupos fueron comparados, encontraron diferencias en BV/TV y Tb. El Th en el área de tensión del grupo de OTM fue significativamente mayor que en el grupo de OTM + el inhibidor y que en el grupo control en el día 14 del experimento. No se encontraron diferencias significantes en los valores de Tb. N y el espacio trabecular (Th.Sp) entre los tres grupos. Los resultados muestran como la masa de hueso alveolar fue decreciendo con la inhibición de los canales de Piezo1 durante el OTM.

C) Cambios histológicos del tejido periodontal durante el movimiento dentario ortodóncico.

Histológicamente los cambios en las células del ligamento periodontal durante las aplicaciones de fuerzas para el movimiento dentario ortodóncico fueron examinados utilizando la tinción tricrómica H&E and Masson's. En el día 0, las fibras periodontales mostraron estar organizadas en forma de malla y cada una de ellas mostro una configuración ondulada en el ligamento periodontal de los tres grupos.

Luego del día 3 del movimiento ortodóncico, se observó en los tres grupos, un aumento gradual en el espacio periodontal. Luego de 3 días de movimiento ortodóncico, el espacio del ligamento periodontal aumento en los grupos de OTM y en el de OTM+INH, la organización típica ondulada de las fibras se perdió y las fibras se observaron estiradas entre el hueso alveolar y la raíz. En el día 7, las fibras del ligamento periodontal parecieron verse relajadas en el grupo de OTM a comparación del día 3, mientras que se observación totalmente estiradas en el grupo de OTM+INH.

En el día 14, la organización de las fibras del ligamento periodontal en los grupos de OTM recupero su forma ondulada antes del grupo de OTM+INH. En este periodo de tiempo, las fibras del ligamento periodontal del lado de tensión fueron organizadas en los tres grupos (Figura 9 A, B). El canal de Piezo1 es crítico para mejorar la expresión de los factores de osteogénesis en el lado de tensión durante el movimiento dentario ortodóncico, y la expresión inmunohistoquímica de los factores relacionados a la osteogénesis fue examinada para evaluar la relación entre Piezo1 y la osteogénesis. (Figura 9 A–D).

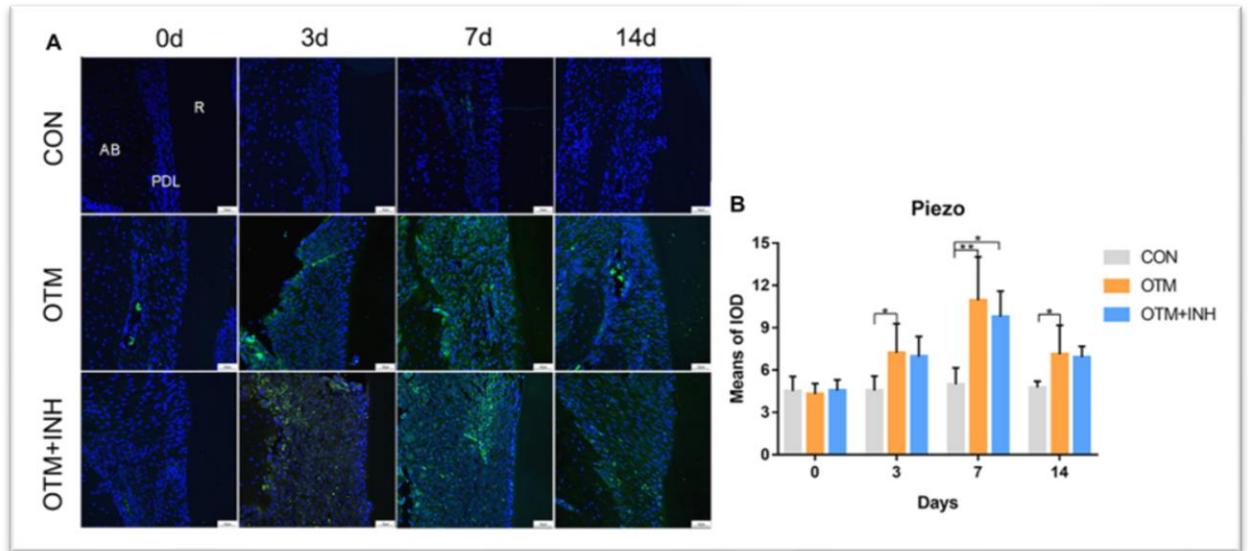


Figura 7. Imagen extraída de “Mechanosensitive Piezo1 in Periodontal Ligament Cells Promotes Alveolar Bone Remodeling During Orthodontic Tooth Movement.” La expresión de Piezo1 fue activada por la fuerza ortodóncica en el sitio de tensión de las raíces disto vestibulares. (A) Inmunofluorescencia muestra que Piezo1 fue expresada en el ligamento periodontal del grupo OTM y del grupo OTM+INH luego de la aplicación de la fuerza. (B) El significado de la intensidad de inmunofluorescencia de Piezo1. La expresión de Piezo1 en el grupo OTM fue mayor que en el grupo control desde el día 3 al 14 ⁽⁴⁷⁾.

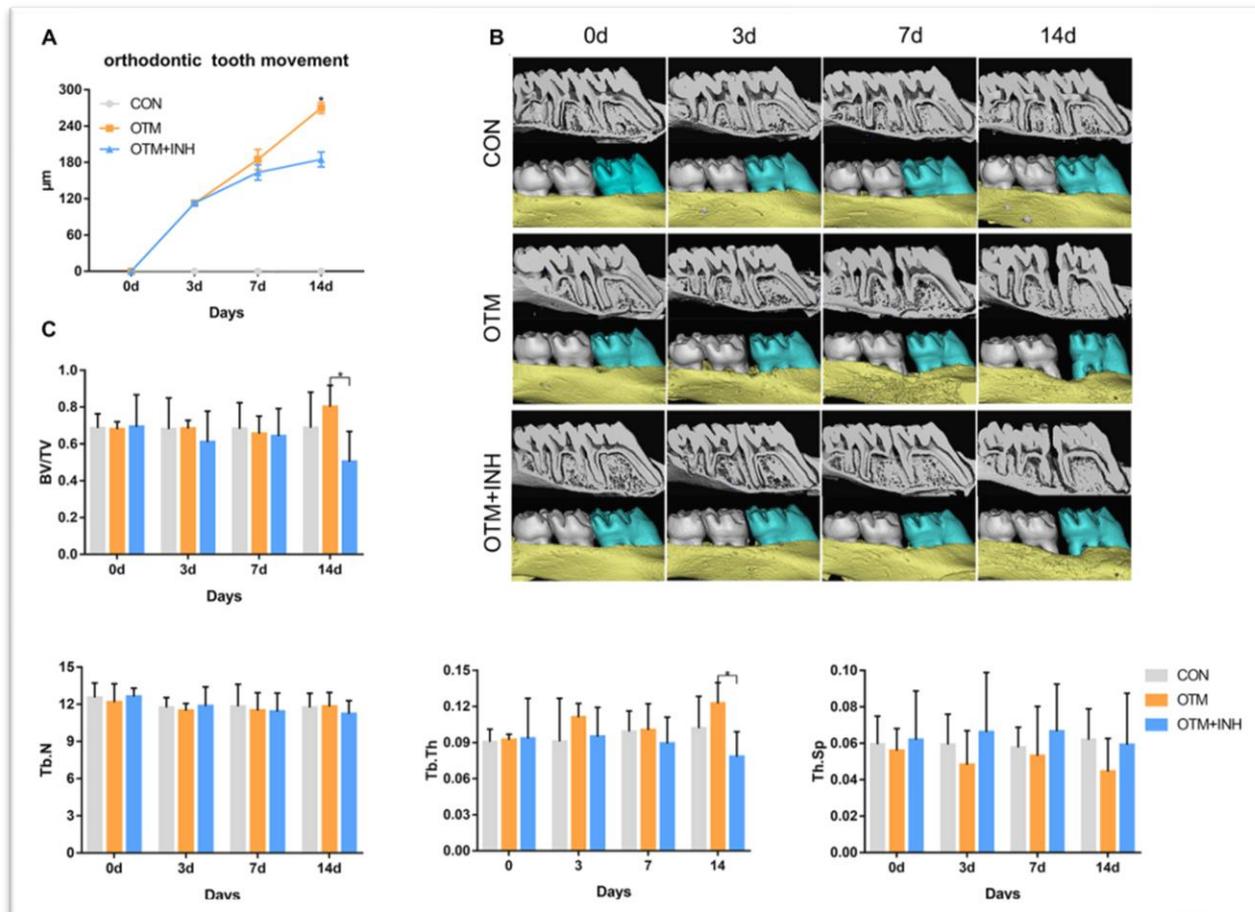


Figura 8. Imagen extraída de “Mechanosensitive Piezo1 in Periodontal Ligament Cells Promotes Alveolar Bone Remodeling During Orthodontic Tooth Movement.” inhibición de Piezo1 dificulta el movimiento dentario por fuerzas ortodóncicas y produce una disminución en la masa ósea. (A) imágenes de microtomografo y reconstrucción tridimensional que muestran la distancia del OTM. (B) La distancia entre OTM desde el día 0 al día 14. La distancia fue incrementada por fuerzas ortodóncicas a lo largo del tiempo en el grupo de OTM mientras que disminuyo en el grupo de OTM + INH. (C) Parámetros incluyendo el volumen oseó/volumen total (BV/TV), número trabecular (Tb.N), espesor trabecular (Tb.Th), y espacio trabecular (Tb.Sp) fueron examinados desde el día 0 al día 14. BV/TV y Tb.Th del grupo OTM fueron mayores que los del grupo OTM + INH y que el grupo control en el día 14 del movimiento dentario ortodóncico ⁽⁴⁷⁾.

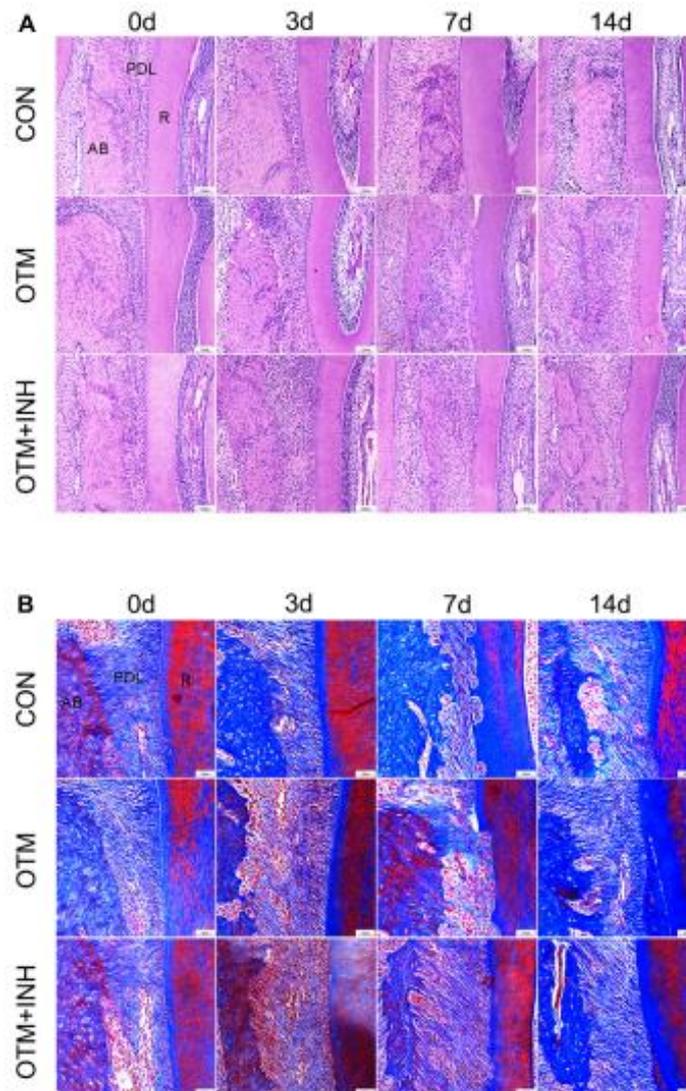


Figura 9. Imagen extraída de “Mechanosensitive Piezo1 in Periodontal Ligament Cells Promotes Alveolar Bone Remodeling During Orthodontic Tooth Movement.” Cambios histológicos en el ligamento periodontal en el sitio de tensión de las raíces disto vestibulares. (A) coloración con Hematoxilina Eosina (B) coloración con Masson tricromico del ligamento periodontal. Las fibras periodontales se vieron estiradas por la aplicación de fuerzas ortodóncicas en el grupo OTM, mientras que el remodelado de las fibras se vio retardado en el grupo OTM +INH⁽⁴⁷⁾.

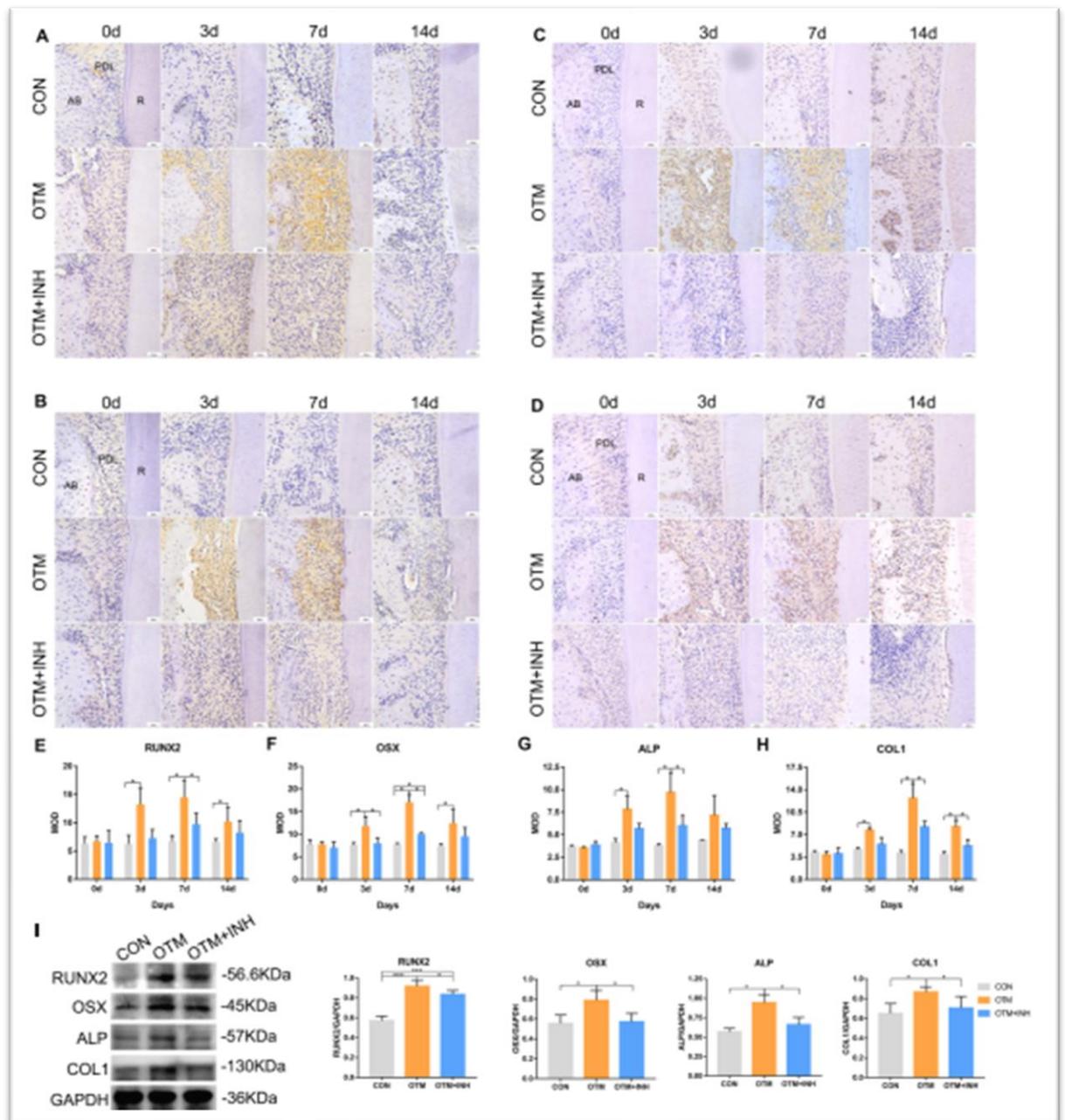


Figura 10. Imagen extraída de “Mechanosensitive Piezo1 in Periodontal Ligament Cells Promotes Alveolar Bone Remodeling During Orthodontic Tooth Movement.” La inhibición del canal de Piezo1 suprime la expresión de la osteogénesis y de los factores relacionados a la misma durante los movimientos de ortodoncia en el lado de tensión. Tinción inmunohistoquímica de RUNX2 (A), OSX (B), ALP (C), y COL1 (D) del ligamento periodontal en el lado de tensión de las raíces disto vestibulares y el significado de la densidad óptica integrada (IOD) RUNX2 (E), OSX (F), ALP (G), y COL1 (H). La expresión de RUNX2, OSX, ALP, y COL1 en el grupo de OTM crece significativamente en los días 3, 7 y 14 comparado con el grupo control, mientras que fue reducido en el grupo de OTM + INH en el día 3 y 7 para OSX, en el día 7 para RUNX2 y ALP y en el día 7 y 14 para COL1. El análisis con Western Blot detecto proteínas de RUNX2, OSX, ALP, y COL1 en el día 7 del movimiento dentario ortodóncico. GsMTx4 (inhibidor) redujo la expresión de proteínas de RUNX2, OSX, ALP, y COL1 en el día 7. ⁽⁴⁷⁾.

D) El canal de Piezo1 es crítico para incrementar los niveles de factores relacionados a la osteogénesis en el sitio de tensión durante el movimiento dentario.

Luego de haber aplicado fuerzas ortodóncicas, la expresión de RUNX2, OSX, ALP, y COL1 en el grupo de OTM se incrementó significativamente en los días 3, 7 y 14 comparados con el grupo control. Todos los factores alcanzaron un pico máximo de expresión en el grupo de OTM en el día 7 comparados con el grupo control. Cuando el canal de Piezo1 fue inhibido por GsMTx4, la expresión de estos factores relacionados a la osteogénesis sufrió un descenso. La expresión de RUNX2 y ALP del grupo OTM + INH fue significativamente más baja que el grupo de OTM en el día 7. La expresión de OSX en el grupo de OTM +INH fue menos que la del grupo OTM en el día 3 y 7. Lo mismo sucede con los factores COL1, donde los valores en el grupo OTM + INH fueron más bajos en el día 7 y 14 comparados al grupo OTM (Figura 9 E– H). Tanto la tinción inmunohistoquímica (IHC) como los resultados de Western Blot (WB) mostraron que los niveles de la proteína del factor de osteogénesis en el día 7 fueron reducidos por el inhibidor en el grupo OTM+INH, lo cual indica que el canal de Piezo 1 es crítico para la expresión de los factores relacionados a la osteogénesis en el sitio de tensión durante el movimiento dentario ortodóncico. (Figure 8 I). Los inhibidores de Piezo1 suprimen la actividad osteoclástica en el sitio de tensión.

E) La inhibición del canal de Piezo1 suprime la actividad osteoclástica en el sitio de tensión durante el movimiento dentario ortodóncico.

La actividad osteoclástica también fue investigada en el lado de tensión durante OTM. La tinción fosfatasa acida resistente al tartrato (TRAP) fue utilizada para observar la proporción de células TRAP positivas en los tres grupos. En el día 3, se observa un gran aumento de osteoclastos en el grupo OTM comparado al grupo OTM + INH y al grupo control. En los días 7 y 14, solo un grupo de células positivas al TRAP fueron observadas, sin diferencias significativas comparadas entre los tres grupos (Figura 9 A, D.).

Luego fue evaluada la expresión del receptor activador del factor nuclear Kappa B ligando (RANKL) y de osteoprotegerina (OPG). La inmunoreactividad de RANKL fue observada en los osteoblastos y los osteoclastos en la superficie del hueso alveolar con gran tinción positiva en el citoplasma y una débil tinción positiva en la matriz extracelular del área del ligamento periodontal. La expresión de los niveles de RANKL en el grupo de OTM fue significativamente mayor que en el grupo de OTM +INH y el grupo control en el día 3, y luego declino considerablemente. No hubo cambios significativos entre los tres grupos en los días 7 y 14 (Figura 9 B,E).

La inmunoreactividad de OPG fue observada en algunos osteoblastos con tinción altamente positiva en el citoplasma y una débil tinción positiva en la matriz extracelular

del área del ligamento periodontal. En este estudio, la expresión de OPG en el grupo de OTM fue disminuyendo gradualmente en el día 3, alcanzó su pico máximo en el día 7 y disminuyó levemente luego de eso. Con respecto al grupo control, la expresión de OPG en el grupo de OTM fue significativamente mayor en el día 3. En el día 7, la expresión de OPG en el grupo OTM fue mayor que en el grupo de OTM + INH y que en el grupo control (Figures 9 C,F).

El RANKL/OPG aumentó rápidamente en el grupo OTM y fue significativamente mayor que los grupos OTM+INH y que en el grupo control (Figura 9 G). En los días 7 y 14, no hubo cambios significativos encontrados en el ratio de RANKL/OPG entre los tres grupos. En el día 3, los resultados de WB de RANKL y OPG fueron consistentes con la tinción inmunohistoquímica (Figura 9 H).

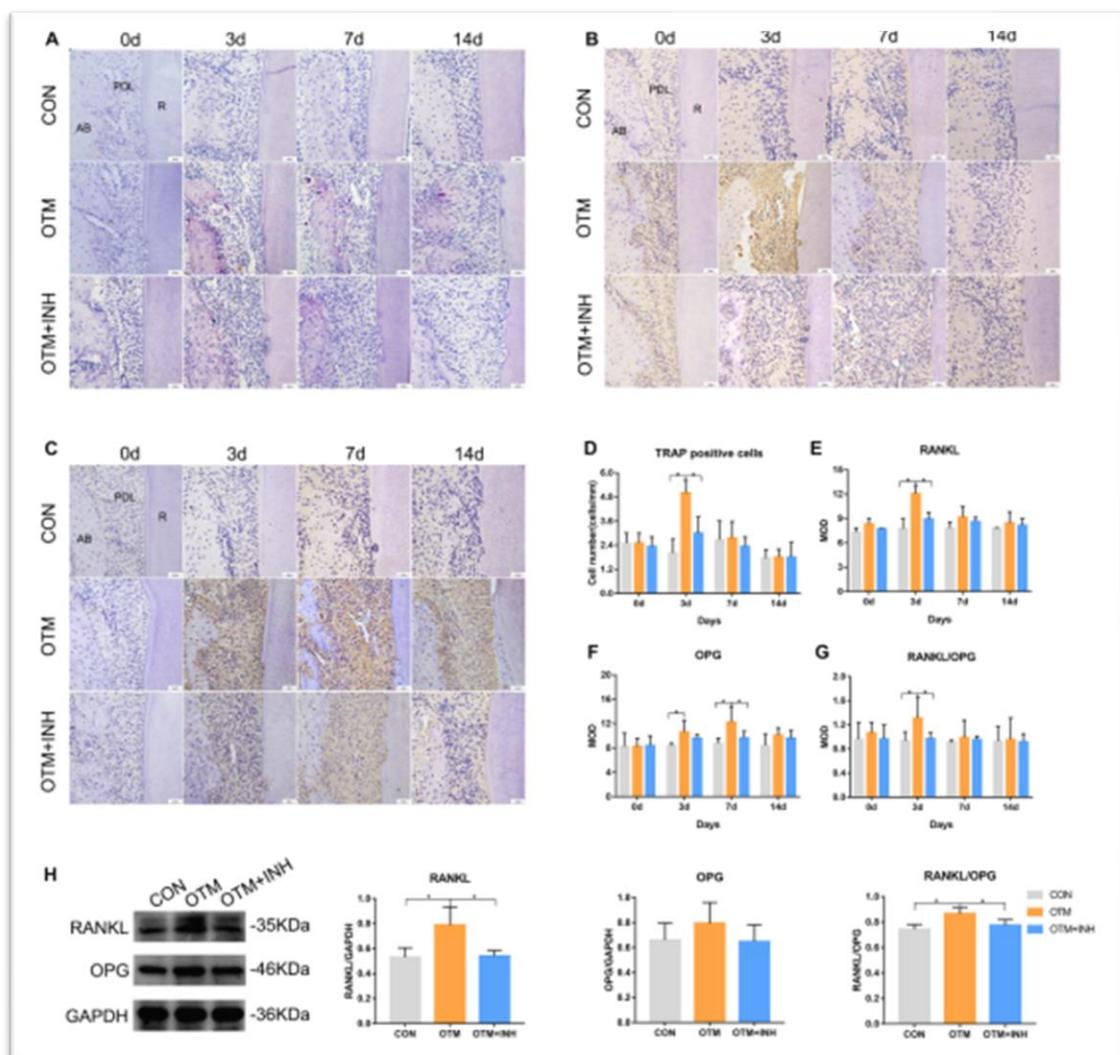


Figura 11. Imagen extraída de “Mechanosensitive Piezo1 in Periodontal Ligament Cells Promotes Alveolar Bone Remodeling During Orthodontic Tooth Movement.” La inhibición de Piezo1 suprime la actividad osteoclástica en el lado de tensión. La tinción TRAP (A) y la cuantificación de células TRAP positivas (D). Los osteoclastos TRAP positivos fueron detectados cerca de las raíces del lado de tensión. En el día 3 el número de osteoclastos fue considerablemente altos comparados con el grupo control y el grupo con inhibidor. La barra de escala es 50 μ m. La tinción inmunohistoquímica de RANKSL (B) y OPG (C) en el lado

de tensión de las raíces disto vestibulares. Se muestra el significado de la densidad óptica integrada (IOD) de RANKL (E), OPG (F), y radio de RANKL/OPG (G). En el día 3, el radio RANKL/OPG del grupo fue mayor que en el grupo control y OTM + INH. La tinción con Western Blot (H) detecto niveles de RANK/OPG crecientes en el día 3 del OTM. La proteína de expresión de RANKL/OPG creció significativamente en el grupo OTM comparado a los otros dos grupos. ⁽⁴⁷⁾.

Como conclusión de lo anteriormente narrado, el estudio que se llevó a cabo por Yukun Jiang et. Al, revela los patrones de expresión específica del canal Piezo1 en el sitio de tensión durante el movimiento dentario en la ortodoncia. El canal de Piezo1 cumple un rol vital en el remodelado óseo en el sitio de tensión, promoviendo la osteogénesis y la actividad osteoclástica. También, este trabajo de investigación provee de bases teóricas para aplicaciones terapéuticas locales para controlar el canal de Piezo1, el cual representa un objetivo intrigante para inducir el remodelado óseo estable y controlado durante el movimiento dentario en ortodoncia ⁽⁴⁷⁾.

Con el objetivo de corroborar la hipótesis de la plasticidad osteocitaria propuesta por Rubin et al quien postula que tras el incremento en las fuerzas traccionales o compresivas que recibe el hueso, el osteocito cambia la arquitectura del citoesqueleto y modifica secundariamente al ambiente lacunar. ⁽⁷⁷⁾ Y en el trabajo de Bozal y col. donde observa que los cuerpos celulares osteocitarios adoptan una morfología esférica tras la recepción de fuerzas mecánicas ⁽¹³⁾, hemos diseñado el presente trabajo.

En la hipótesis de la plasticidad osteocitaria propuesta por Rubin et al. se postula que la célula estaría modificando activamente la arquitectura del citoesqueleto al sentir fuerzas, adquiriendo una morfología más ovalada. Esto significaría entonces que la diferencia entre el eje largo de los osteocitos y el eje corto de los mismos resultaría un valor más bajo en los grupos sometidos a fuerzas de presión y de tensión comparado con el grupo control, conformado por osteocitos en reposo. Además de cambiar su morfología ante el stress mecánico, se cree que tanto los osteocitos, como las lagunas donde se alojan aumentan su volumen, entonces los osteocitos y las lagunas sometidas a fuerzas traccionales y compresivas, deberían tener un perímetro mayor que los del grupo control.

HIPÓTESIS

Los cambios en el citoesqueleto de forma y tamaño en los osteocitos sometidos a fuerza ortodóncicas son diferentes acorde al tipo de fuerzas traccionales o compresivas, que actúan sobre ellos.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron 10 ratas de la cepa Wistar de sexo femenino y masculino, de 120gr a 180gr de peso. Todos los animales recibieron acceso al alimento balanceado y agua "ad libitum". Las condiciones de alojamiento fueron las siguientes: jaulas de alambre galvanizado; temperatura: 21 C a 24 C; humedad: 52 % a 56%; ciclos de luz / oscuridad: 12 horas /12 horas.

El protocolo experimental fue aprobado por el Comité de Ética de la Facultad de Odontología (CICUAL-ODONTO-FOUBA) de la Universidad de Buenos Aires, Argentina, y en concordancia con la guía de uso y cuidado de Animales de Laboratorio del National Institutes of Health (NIH).

A todos los animales se les realizó la exodoncia del segundo molar superior izquierdo o derecho con instrumental quirúrgico especialmente diseñado para evitar la fractura radicular y posteriormente fueron sometidos a tratamientos de ortodoncia, donde se buscó distalizar el primer molar superior.

Los animales fueron sacrificados por medio de una inyección de euthanyle (pentobarbital sódico/difenilhidantoína sódica).

Los maxilares superiores fueron extraídos, disecados y fijados en formol al 10 % e incluidos en parafina. Se realizaron cortes histológicos orientados en sentido mesiodistal del lado del maxilar superior sometido al tratamiento de ortodoncia.

Los preparados histológicos fueron teñidos con coloración de hematoxilina/eosina y analizados con microscopio de campo claro. Para seleccionar los espacios más representativos para la conformación de grupos, los mismos fueron observados con el lente 2X, en una escala de 1000 μm . Y con una escala de 100 μm , que corresponde a preparados analizados con el lente de 20X, para realizar la posterior evaluación histomorfométrica de lagunas osteocitarias y osteocitos.

A continuación, podemos observar microfotografías de los preparados histológicos examinados con el lente de 2X en una escala de 1000 μm , donde podemos apreciar una visión general del mismo.

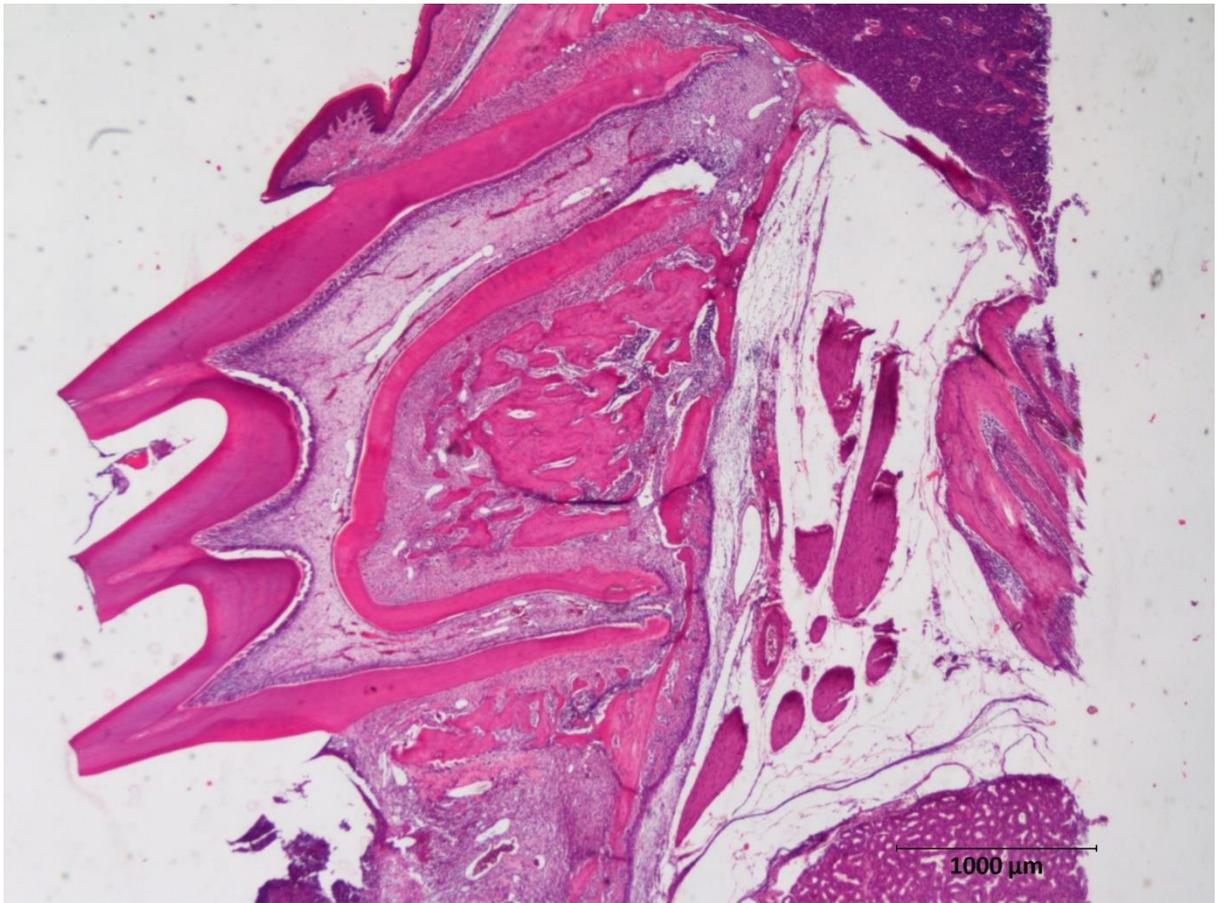


Figura 12. Microfotografía digital de corte histológico en una escala de 1000 µm, con el lente de 2X. Primer molar superior derecho.

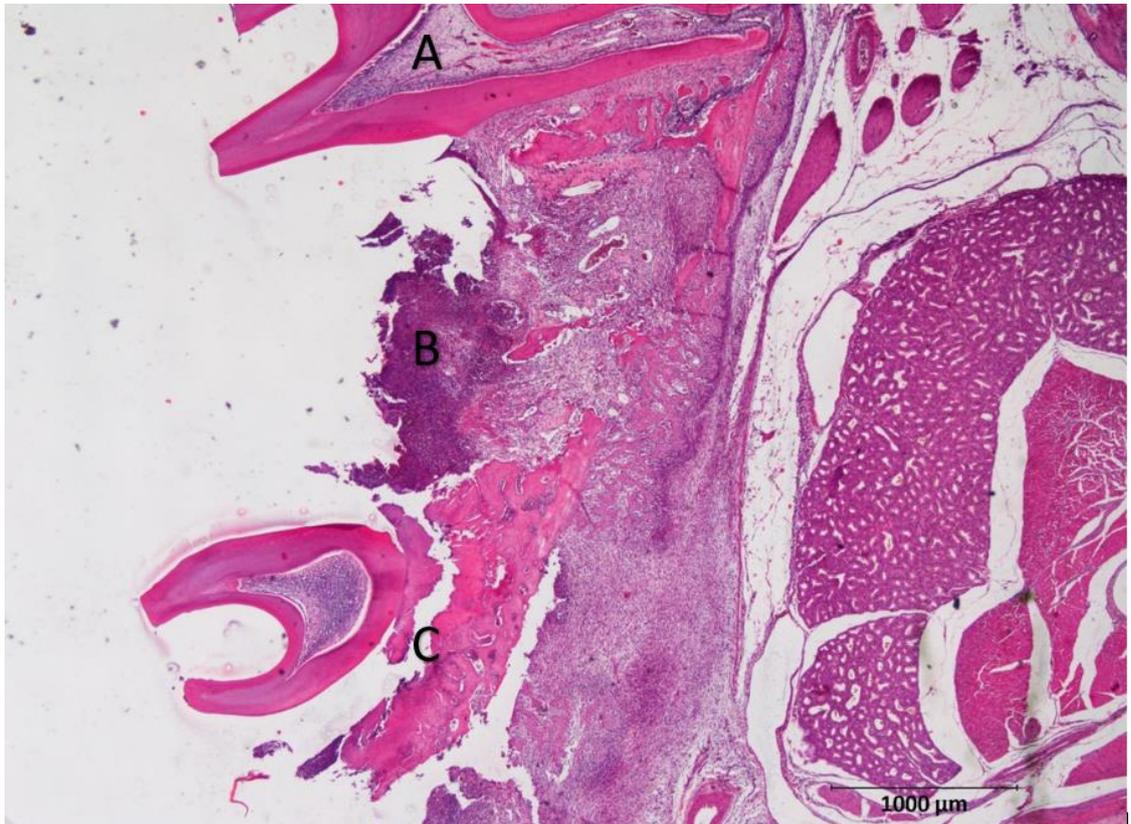


Figura 13. Microfotografía digital de corte histológico en una escala de 1000 μm , con el lente de 2X. A) Raíz y porción coronaria distal y de un primer molar superior derecho donde fueron aplicadas fuerzas ortodóncicas. B) Espacio que ocupaba el segundo molar superior extraído previo al tratamiento de ortodoncia. C) Tercer molar superior.

En cada uno de los preparados, se estudiaron tres grupos celulares:

- Grupo 1 corresponde a osteocitos y sus correspondientes lagunas osteocitarias en reposo, tomadas en el hueso basal o distal del tercer molar superior, del mismo lado del maxilar (derecho o izquierdo) donde fueron aplicadas las fuerzas ortodóncicas, pero en un sitio alejado a donde se efectuaron las mismas.
- Grupo 2 corresponde a osteocitos y lagunas osteocitarias en el sitio de presión, seleccionados en el lado distal de la raíz mesial del primer molar superior sometido a fuerzas ortodóncicas de distalamiento, sobre el hueso interradicular.
- Grupo 3 corresponde a osteocitos y lagunas osteocitarias en el sitio de tensión seleccionados en el lado mesial de la raíz mesial del primer molar superior sometido a fuerzas mecánicas ortodóncicas.

Para realizar las mediciones correspondientes, se tomaron microfotografía de los preparados observados con el lente 20X que nos brindó una escala de 100 μm del mismo, y luego a través del programa "Image J – win 32" fue evaluada la actividad ósea, midiendo tanto las células osteocíticas (perímetro, eje largo y eje corto) como las lagunas osteocitarias donde se alojan (perímetro, eje largo y eje corto).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la distribución de las variables se utilizó la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov o Shapiro-Wilk según el número de muestras a analizar. Para el análisis de diferencias de los resultados se utilizó el test de ANOVA (de los datos previamente logaritmizados cuando correspondiera), y Bonferroni o Tukey como test a posteriori. Los resultados se expresaron y/o graficaron como media \pm DE para aquellos datos con distribución normal y como mediana (rango) para los datos no paramétricos. Se utilizó el programa GraphPad Prism 8. Las diferencias se consideraron significativas con un p menor a 5%.

RESULTADOS

Se encontraron cambios en la morfología de los osteocitos cercanas a sitios de aplicación de las fuerzas traccionales y compresivas, como así también en los osteocitos en áreas alejadas al sitio de aplicación de estas, adquiriendo una forma ovalada.

Si bien no hay diferencias significativas entre los grupos ($p=0.5650$) el promedio del calibre de las células localizadas en el sitio de presión y de tensión ($17,003 \mu\text{m}$ y $18,064 \mu\text{m}$ respectivamente) fue mayor que el de los osteocitos del grupo control ($15,760 \mu\text{m}$).

PERIMETRO DEL OSTEOCITO

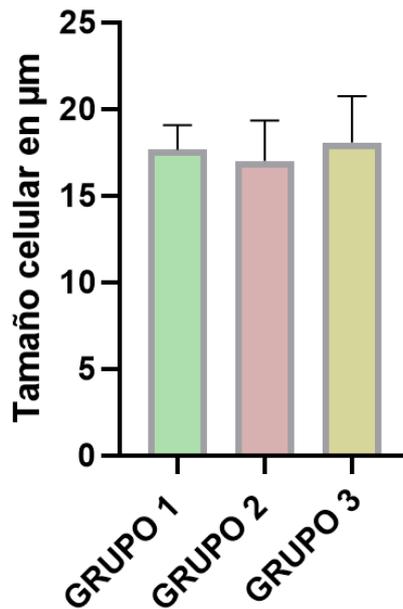


Figura 17. Perímetro en μm de las células osteocitarias de los tres grupos de estudio.

Encontramos aumento de volumen en las lagunas osteocitarias de los tres grupos, hay diferencias significativas entre el tamaño de los tres grupos ($p=0.019$).

PROMEDIO PERIMETRO LAGUNA

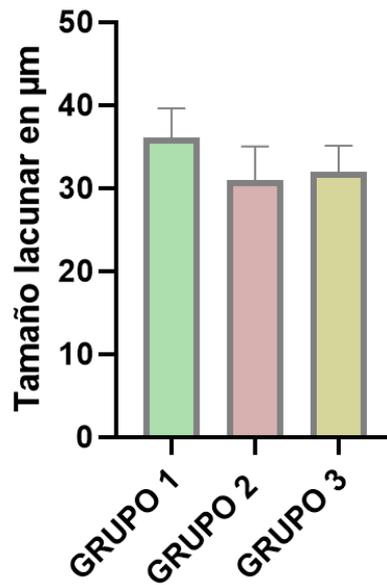


Figura 18. Promedio del perímetro en μm de las lagunas osteocitarias de los tres grupos de estudio.

Si bien el tamaño de los osteocitos de los tres grupos aumentó, no hubo diferencias significativas en el tamaño de las células entre los grupos 2 y grupo 3 ($p=0.5872$).

PERIMETRO DE OSTEOCITOS

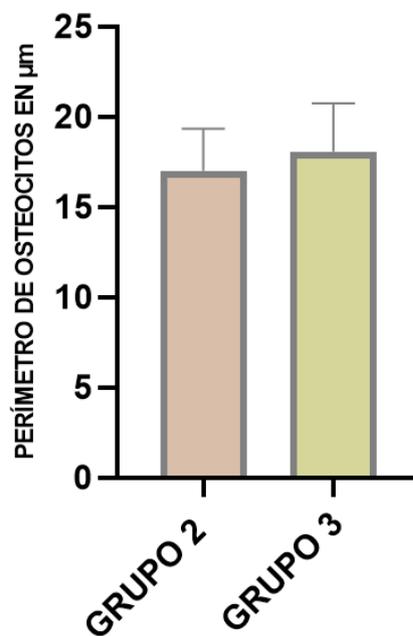


Figura 19. Promedio del perímetro en μm de los osteocitos de los grupos de presión (grupo 2) y tensión (grupo 3).

Observamos que el grupo control (Grupo 1) cuenta con un espacio mayor de laguna no ocupada por los osteocitos, con respecto al espacio lacunar libre que ocupan los osteocitos de los grupos 2 ($p=0.0023$) y grupo 3 ($p=0.0018$).

DIFERENCIA PERÍMETRO LAGUNA MENOS PERÍMETRO DEL OSTEOCITO

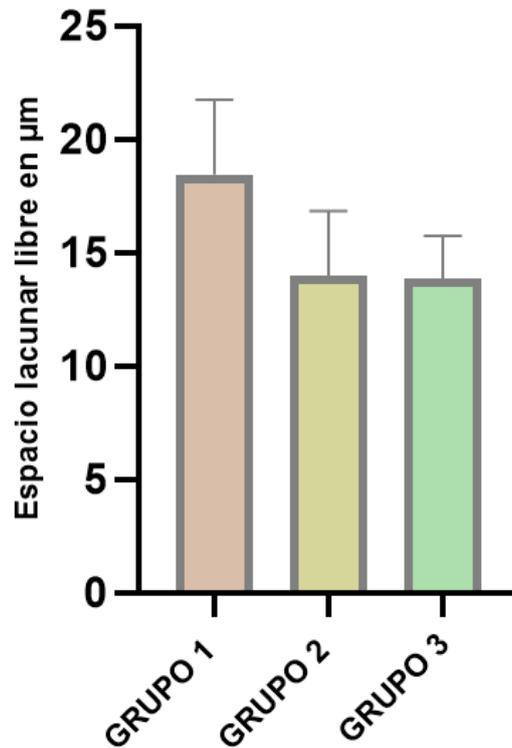


Figura 20. Espacio lacunar no ocupado por sus respectivos osteocitos residentes en los tres grupos.

Los resultados histomorfométricos demuestran que:

1. Las células osteocitarias de los tres grupos aumentan su volumen al sentir las fuerzas, adoptando una morfología ovalada, sin diferencias estadísticamente significativas entre los mismos ($p=0.5650$).
2. No existen diferencias estadísticamente significativas entre el tamaño de las células osteocitarias en el sitio de presión y de tensión ($p=0.5872$).
3. Al sentir las fuerzas, las lagunas osteocitarias de los tres grupos celulares aumentan su tamaño existiendo diferencias significativas de volumen entre los tres grupos ($p=0.019$).
4. Las células de los sitios de presión y tensión ocupan mayor espacio dentro de la laguna osteocitaria, comparadas a los osteocitos que se encuentran en sitios alejados a la aplicación de fuerzas. Los resultados fueron Grupo 1 vs. Grupo 2 ($p=0.0023$) y Grupo 1 vs. Grupo 3 ($p=0.0018$).

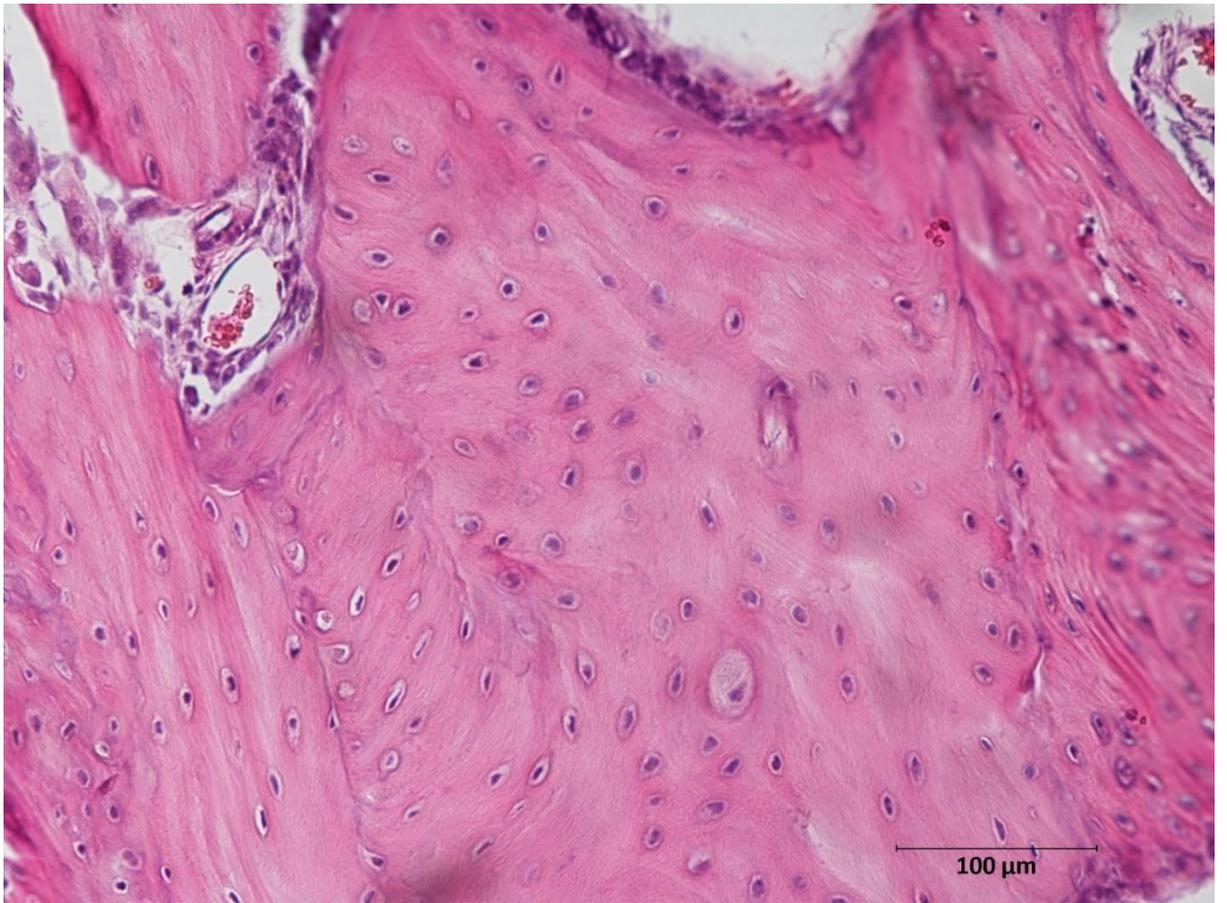


Figura 14. Histomorfometría de lagunas osteocitarias y osteocitos en reposo (grupo 1), hueso basal del tercer molar superior.

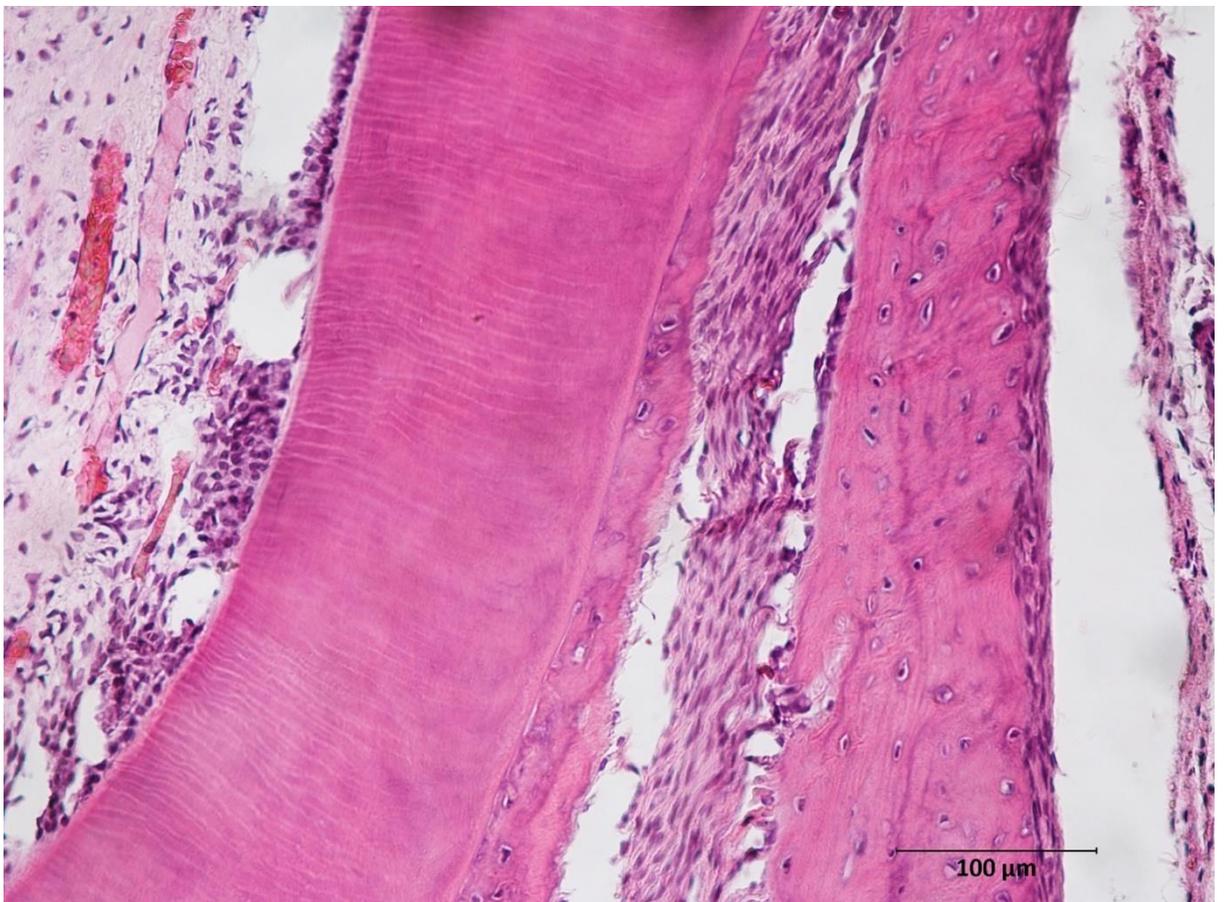


Figura 15. Histomorfometría de osteocitos, laguna osteocitaria y actividad ósea de las células óseas sitio de presión (grupo 2), distal de la raíz mesial, el hueso interradicular del primer molar superior.

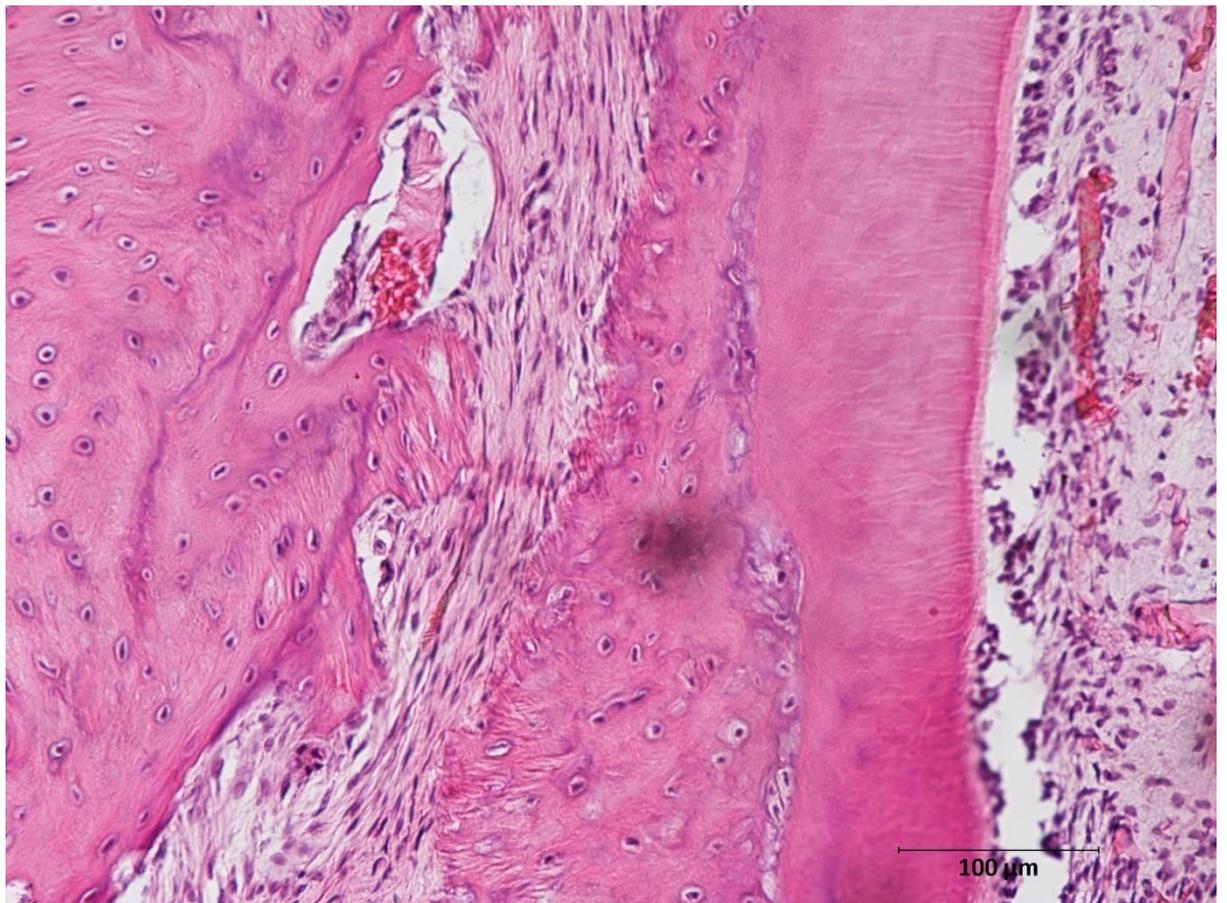


Figura 16. Histomorfometría de osteocitos, laguna osteocitaria y actividad ósea de las células óseas ubicadas en el sitio de tensión (grupo 3), medidos por mesial de la raíz mesial del primer molar superior.

DISCUSIÓN

El estudio del hueso basal fue inicialmente seleccionado como grupo control por pertenecer a tejido óseo alejado al tratamiento de ortodoncia. Al observar actividad celular en los osteocitos de los tres grupos estudiados, sería conveniente incorporar un real "grupo control". Áreas óseas similares a las estudiadas (hueso alveolar) perteneciente a maxilares de ratas Wistar que no hayan sido sometidas a ningún tratamiento de ortodoncia.

No se observaron células osteocitarias redondas como propone Bozal y col, aunque si observamos células ovaladas, lo que sugiere que la modificación de la morfología osteocitaria podría estar influenciada por el tiempo de acción o la intensidad de las fuerzas. Sería conveniente realizar un estudio más específico donde se mida el tiempo de acción de los aparatos de ortodoncia como así también la intensidad de las fuerzas, y si esto influye o no en la forma que adoptan las células.

CONCLUSIONES

Las células osteocitarias aumentan su volumen y cambian su forma al sentir las fuerzas mecánicas, independientemente que estas se encuentren cercanas o alejadas a al sitio de aplicación.

La activación de los osteocitos en el hueso basal es menor que en las áreas cercanas a la aplicación de las fuerzas

El espacio libre de las lagunas osteocitarias es mayor en aquellas que se encuentran alejadas al sitio de aplicación de las fuerzas; lo que sugiere que a medida que nos alejamos de las zonas de aplicación de las fuerzas, esta disminuye y por ende la respuesta celular es menor.

El aumento del volumen lacunar es anterior al aumento del volumen celular.

ANEXOS

TABLA PROMEDIOS VALORES POR GRUPOS

	Perímetro de la laguna	Eje Largo	Eje corto	Perímetro del osteocito	Eje largo	Eje corto	Diferencia perímetro de laguna menos osteocito	Diferencia eje largo menos eje corto osteocito
Grupo 1	31,901 μm	11,570 μm	7,249 μm	15,760 μm	5,020 μm	2,869 μm	16,141 μm	2,151 μm
Grupo 2	30,963 μm	11,065 μm	6,124 μm	17,003 μm	5,570 μm	2,970 μm	13,960 μm	2,600 μm
Grupo 3	31,920 μm	11,117 μm	6,828 μm	18,064 μm	6,150 μm	3,432 μm	13,856 μm	2,719 μm

TABLA PROMEDIOS VALORES POR PREPARADOS

PROMEDIOS GRUPO 1: Osteocitos en Reposo						
PREPARADO	Perímetro de la laguna	Eje Largo	Eje corto	Perímetro del osteocito	Eje largo	Eje corto
5560 - EXP 5 R1 NIC exo + ort	41,935	17,815	7,749	18,935	8,852	2,993
5560- EXP 6 R 2	32,796	11,008	5,970	18,582	7,276	3,487
5560 -EXP2 -rata2 nic	35,421	14,627	12,237	20,076	6,986	3,061
5560-R6EXP 3 NIC	38,722	14,989	11,244	17,180	4,641	4,162
5573 - I A	37,478	14,336	8,498	17,921	6,050	3,256
5573 - I B	34,374	11,888	7,690	15,893	4,552	2,898
5573 - A	34,178	12,587	5,296	18,165	5,588	2,970
5573 - B	33,359	11,781	5,140	16,934	5,669	3,036
Exp 3 rata 4 (1) grupo exo 2018	40,992	13,910	8,929	17,602	4,692	3,606
Exp 3 rata 4.2 grupo exo 2018	31,648	10,560	7,480	15,229	4,740	2,211
PROMEDIOS	31,901	11,570	7,249	15,760	5,020	2,869
MEDIA	11,556			5,695		

PROMEDIOS GRUPO 2: Osteocitos en sitio de presión						
PREPARADO	Perímetro de la laguna	Eje Largo	Eje corto	Perímetro del osteocito	eje largo	eje corto
5560 - EXP 5 R1 NIC exo + ort	26,806	10,07 2	5,980	13,415	4,811	2,531
5560- EXP 6 R 2	29,151	10,71 8	5,468	16,606	5,670	3,076
5560 -EXP2 -rata2 nic	35,683	13,60 0	5,781	18,613	6,650	3,289
5560-R6EXP 3 NIC	30,690	12,39 2	6,385	16,770	5,470	2,865
5573 - I A	38,160	14,95 3	6,413	20,349	7,565	2,860
5573 - I B	32,526	10,38 7	7,131	20,326	5,515	3,587
5573 - A	26,482	8,192	5,040	16,700	5,205	3,122
5573 - B	25,789	8,332	5,009	15,533	4,377	2,759
Exp 3 rata 4 (1) grupo exo 2018	31,452	11,08 0	7,065	14,040	4,464	2,860
Exp 3 rata 4.2 grupo exo 2018	32,886	10,91 9	6,967	17,679	5,973	2,752
PROMEDIOS	30,963	11,06 5	6,124	17,003	5,570	2,970
MEDIA	4,054			2,343		
PROMEDIOS GRUPO 3: Osteocitos en sitio de tensión						
PREPARADO	Perímetro de la laguna	Eje Largo	Eje corto	Perímetro del osteocito	Eje largo	Eje corto
5560 - EXP 5 R1 NIC exo + ort	33,551	12,04 2	7,703	17,236	5,990	3,071
5560- EXP 6 R 2	34,596	13,12 9	7,334	20,112	8,488	3,728
5560 -EXP2 -rata2 nic	27,550	8,999	5,565	16,183	5,023	3,490
5560-R6EXP 3 NIC	27,365	9,742	6,371	15,039	5,001	3,351
5573 - I A	35,177	12,62 5	7,928	19,176	6,345	3,903
5573 - I B	34,224	11,90 4	8,255	20,442	7,007	4,636
5573 - A	31,655	10,37 3	5,867	20,335	6,765	3,232
5573 - B	34,634	12,86 1	6,459	21,768	6,883	3,175
Exp 3 rata 4 (1) grupo exo 2018	27,686	9,134	5,586	13,672	4,219	2,623
Exp 3 rata 4.2 grupo exo 2018	32,765	10,35 8	7,213	16,675	5,784	3,107
PROMEDIOS	31,920	11,11 7	6,828	18,064	6,150	3,432
MEDIA	3,191			2,678		

BIBLIOGRAFIA

1. Riancho, J. A. (01 de 03 de 2013). Mecanobiología celular y molecular del tejido óseo. *Departamento de Medicina Interna - Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV-Universidad de Cantabria - Santander*. Obtenido de <http://www.revistadeosteoporosisymetabolismomineral.com/pdf/articulos/12013050100510056.pdf>
2. Bozal, C. B. (2013). Los osteocitos como mecanosensores del hueso. *Actualizaciones en Osteología*, 176-193. Cátedra de Histología y Embriología, Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires. <http://osteologia.org.ar>
3. Schneider P, Meier M, Wipf R, Müller R. Towards quantitative 3D imaging of the osteocyte lacuno-canalicular network. *Bone* 2010; 47:848-58.
4. Yellowley CE, Li ZY, Zhou ZY, Jacobs CR, Donahue HJ. Functional gap junctions between osteocytic and osteoblastic cells. *J Bone Miner Res* 2000; 15:209-17
5. Yang W, Lu Y, Kalajzic I, et al. Dentin matrix protein one gene cis regulation: use in osteocytes to characterize local responses to mechanical loading in vitro and in vivo. *J Biol Chem* 2005; 280:20680-90
6. Gluhak-Heinrich J, Pavlin D, Yang W, MacDougall M, Harris SE. MEPE expression in osteocytes during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol* 2007; 52:684-90.
7. Knothe Tate ML, Steck R, Forwood MR, Niederer P. In vivo demonstration of load-induced fluid flow in the rat tibia and its potential implications for processes associated with functional adaptation. *J Exp Biol* 2000b; 203:2737-45
8. Knothe Tate ML, Knothe U. An ex vivo model to study transport processes and fluid flow in loaded bone. *J Biomech* 2000a; 33:247-54.
9. Burger EH, Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone--role of the lacuno-canalicular network. *FASEB J* 1999; 13:101S-12S
10. You LD, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. A model for strain amplification in the actin cytoskeleton of osteocytes due to fluid drag on pericellular matrix. *J Biomech* 2001; 34:1375-86.
11. Han YF, Cowin SC, Schaffler MB, Weinbaum S. Mechanotransduction and strain amplification in osteocyte cell processes. *PNAS* 2004; 101:16689-94.

12. Jackson WM, Jaasma MJ, Tang RY, Keaveny TM. Mechanical loading by fluid shear is sufficient to alter the cytoskeletal composition of osteoblastic cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2008; 295:1007-15.
13. Bozal CB, Sánchez LM, Mandalunis PM, Ubios AM. Histomorphometric study and threedimensional reconstruction of the osteocyte lacuno-canalicular network one hour after applying tensile and compressive forces. *Cells Tissues Organs* 2013.
14. Harris SE, Gluhak-Heinrich J, Harris MA, et al. DMP1 and MEPE expression are elevated in osteocytes after mechanical loading in vivo: Theoretical role in controlling mineral quality in the perilacunar matrix. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2007; 7:313-5.
15. Iqbal J, Zaidi M. Molecular regulation of mechanotransduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 328:751-5.
16. Nicolella DP, Moravits DE, Gale AM, Bonewald LF, Lankford J. Osteocyte lacunae tissue strain in cortical bone. *J Biomech* 2006; 39:1735-43.
17. Nicolella DP, Feng JQ, Moravits DE, et al. Effects of nanomechanical bone tissue properties on bone tissue strain: implications for osteocyte mechanotransduction. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008; 8:330-1.
18. Plotkin LI. Connexin 43 and bone: not just a gap junction protein. *Actual Osteol* 2011; 7:79-90. 67.
19. Plotkin LI, Bellido T. Beyond gap junctions: Connexin43 and bone cell signaling. *Bone* 2013; 52:157-66.
20. Taylor AF, Saunders MM, Shingle DL, Cimbala JM, Zhou Z, Donahue HJ. Mechanically stimulated osteocytes regulate osteoblastic activity via gap junctions. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292:C545-52
21. Grimston SK, Watkins MP, Brodt MD, Silva MJ, Civitelli R. Enhanced Periosteal and Endocortical Responses to Axial Tibial Compression Loading in Conditional Connexin43 Deficient Mice. *PLoS ONE* 2012; 7:e44222. doi:10.1371/journal.pone.0044222 72.
22. Bivi N, Pacheco-Costa R, Brun LR, et al. Absence of Cx43 selectively from osteocytes enhances responsiveness to mechanical force in mice. *J Orthop Res* 2013; 31(7):1075:81

23. Verborgt O, Tatton NA, Majeska RJ, Schaffler MB. Spatial distribution of Bax and Bcl-2 in osteocytes after bone fatigue: complementary roles in bone remodeling regulation? *J Bone Miner Res* 2002; 17:907-14.
24. Noble BS, Peet N, Stevens HY, et al. Mechanical loading: biphasic osteocyte survival and targeting of osteoclasts for bone destruction in rat cortical bone. *Am J Physiol Cell Physiol* 2003; 284:C934-43.
25. Plotkin LI, Mathov I, Aguirre JI, Parfitt AM, Manolagas SC, Bellido T. Mechanical stimulation prevents osteocyte apoptosis: requirement of integrins, Src kinases and ERKs. *Am J Physiol Cell Physiol* 2005; 289:C633-43.
26. Li X, Zhang Y, Kang H, et al. Sclerostin binds to LRP5/6 and antagonizes canonical Wnt signaling. *J Biol Chem* 2005; 280:19883-7.
27. Semenov MV, He X. LRP5 mutations linked to high bone mass diseases cause reduced LRP5 binding and inhibition by SOST. *J Biol Chem* 2006; 281:38276-84.
28. Robling AG, Niziolek PJ, Baldrige LA, et al. Mechanical Stimulation of Bone in Vivo Reduces Osteocyte Expression of Sost/Sclerostin. *J Biol Chem* 2008; 283:5866-75.
29. Klein-Nulend J, Semeins CM, Ajubi NE, Nijweide PJ, Burger EH. Pulsating fluid flow increases nitric oxide (NO) synthesis by osteocytes but not periosteal fibroblasts— correlation with prostaglandin upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 1995b; 217:640-8.
30. Sun YQ, McLeod KJ, Rubin CT. Mechanically induced periosteal bone formation is paralleled by the upregulation of collagen type one mRNA in osteocytes as measured by in situ reverse transcript-polymerase chain reaction. *Calcif Tissue Int* 1995; 57:456-62.
31. Bacabac RG, Smit TH, Mullender MG, Dijcks SJ, Van Loon JJWA, Klein-Nulend J. Nitric oxide production by bone cells is fluid shear stress rate dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 315:823-9.
32. Tang L, Lin Z, Li Y M. Effects of different magnitudes of mechanical strain on osteoblasts in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344:122-8.

33. Ponik SM, Triplett JW, Pavalko FM. Osteoblasts and osteocytes respond differently to oscillatory and unidirectional fluid flow profiles. *J Cell Biochem* 2007; 15:794-
34. Carola B. Bozal, Luciana M. Sánchez, Patricia M. Mandalunis, Angela M. Ubios. Evaluation of apoptosis and osteopontin expression in osteocytes exposed to orthodontic forces of different magnitudes. *Acta Odontol. Latinoam.* 2018 vol. 31 Nº 2: pag. 110-116
35. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, BlickeHogervorst JM, Klein-Nulend J. Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 2010;391:364-9. 22.
36. Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, Davison A, Sharkey N, Bronson S, Srinivasan S, Gross TS, Donahue HJ. Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *PLoS ONE* 2011;6:e23516.
37. Malone AM, Anderson CT, Tummala P, Kwon RY, Johnston TR, Stearns T, Jacobs CR. Primary cilia mediate mechanosensing in bone cells by a calcium-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:13325-30.
38. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur Cell Mater* 2012;24:278-91.
39. Cadenas Martín M, Tirado I, Martín E, Ardura JA, Bravo B, Gortazar AR. Efectos de la estimulación mecánica en la comunicación entre células óseas. Instituto de Medicina Aplicada de la Universidad San Pablo-CEU - Madrid (España) Departamento de Ciencias Médicas Básicas - Facultad de Medicina - Universidad San Pablo CEU - Madrid (España) Fecha de aceptación: 26/11/2018
40. Lee K, Kim H, Kim JM, Kim JR, Kim KJ, Kim YJ, et al. Systemic transplantation of human adipose-derived stem cells stimulates bone repair by promoting osteoblast and osteoclast function. *J Cell Mol Med.* 2011;15(10):2082-94.
41. Xu H, Zhang S, Sathe AA, Jin Z, Guan J, Sun W, Xing C, Zhang H and Yan B (2022) CCR2⁺ Macrophages Promote Orthodontic Tooth Movement and Alveolar Bone Remodeling. *Front. Immunol.* 13:835986. doi: 10.3389/fimmu.2022.835986
42. Pajarinen J, Lin T, Gibon E, Kohno Y, Maruyama M, Nathan K, et al. Mesenchymal Stem Cell-Macrophage Crosstalk and Bone Healing. *Biomaterials* (2019) 196:80–9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.12.025

43. Vi L, Baht GS, Soderblom EJ, Whetstone H, Wei Q, Furman B, et al. Macrophage Cells Secrete Factors Including LRP1 That Orchestrate the Rejuvenation of Bone Repair in Mice. *Nat Commun* (2018) 9:5191. doi: 10.1038/s41467-018-07666-0
44. Salazar VS, Gamer LW, Rosen V. BMP Signalling in Skeletal Development, Disease and Repair. *Nat Rev Endocrinol* (2016) 12:203–21. doi: 10.1038/nrendo.2016.12
45. Chang MK, Raggatt LJ, Alexander KA, Kuliwaba JS, Fazzalari NL, Schroder K, et al. Osteal Tissue Macrophages are Intercalated Throughout Human and Mouse Bone Lining Tissues and Regulate Osteoblast Function In Vitro and In Vivo. *J Immunol* (2008) 181:1232–44. doi: 10.4049/jimmunol.181.2.1232
46. Weng Y, Wang H, Li L, Feng Y, Xu S, Wang Z. Trem2 Mediated SykDependent ROS Amplification is Essential for Osteoclastogenesis in Periodontitis Microenvironment. *Redox Biol* (2021) 40:101849. doi: 10.1016/j.redox.2020.101849
47. Yukun Jiang¹ , Yuzhe Guan¹ , Yuanchen Lan¹ , Shuo Chen¹ , Tiancheng Li¹ , Shujuan Zou¹ , Zhiai Hu¹ * and Qingsong Ye^{2,3} . Mechanosensitive Piezo1 in Periodontal Ligament Cells Promotes Alveolar Bone Remodeling During Orthodontic Tooth Movement. 1 State Key Laboratory of Oral Diseases, National Clinical Research Center for Oral Diseases, West China Hospital of Stomatology, Sichuan University, Chengdu, China, 2 Center of Regenerative Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan, China, 3 Center of Regenerative Medicine, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, United States.
48. Liu, J., Zhao, X., Pei, D., Sun, G., Li, Y., Zhu, C., et al. (2018). The promotion function of Berberine for osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells via ERK-FOS pathway mediated by EGFR. *Sci. Rep.* 8:2848. doi: 10.1038/s41598-018-21116-3
49. Maeda, H. (2020). Mass acquisition of human periodontal ligament stem cells. *World J. Stem Cells* 12, 1023–1031. doi: 10.4252/wjsc.v12.i9.1023
50. Yang, Y., Wang, B. K., Chang, M. L., Wan, Z. Q., and Han, G. L. (2018). Cyclic stretch enhances Osteogenic differentiation of human PDL cells via YAP activation. *Biomed. Res. Int.* 2018:2174824. doi: 10.1155/2018/2174824
51. Römer, P., Köstler, J., Koretsi, V., and Proff, P. (2013). Endotoxins potentiate COX2 and RANKL expression in compressed PDL cells. *Clin. Oral Investig.* 17, 2041–2048. doi: 10.1007/s00784-013-0928-0

52. Grant, M., Wilson, J., Rock, P., and Chapple, I. (2013). Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *Eur. J. Orthod.* 35, 644–651. doi: 10.1093/ejo/cjs057
53. Sachs, F. (2015). Mechanical transduction by ion channels: a cautionary tale. *World J. Neurol.* 5, 74–87. doi: 10.5316/wjn.v5.i3.74
54. Coste, B., Mathur, J., Schmidt, M., Earley, T. J., Ranade, S., Petrus, M. J., et al. (2010). Piezo1 and Piezo2 are essential components of distinct mechanically activated cation channels. *Science* 330, 55–60. doi: 10.1126/science.1193270
55. Wang, Y., and Xiao, B. (2018). The mechanosensitive Piezo1 channel: structural features and molecular bases underlying its ion permeation and mechanotransduction. *J. Physiol.* 596, 969–978. doi: 10.1113/jp274404
56. Wu, J., Lewis, A. H., and Grandl, J. (2017). Touch, Tension, and Transduction - The Function and Regulation of Piezo Ion Channels. *Trends Biochem. Sci.* 42, 57–71. doi: 10.1016/j.tibs.2016.09.004
57. Sugimoto, A., Miyazaki, A., Kawarabayashi, K., Shono, M., Akazawa, Y., Hasegawa, T., et al. (2017). Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells. *Sci. Rep.* 7:17696. doi: 10.1038/s41598-017-18089-0
58. Hayashi, M. et al. Osteoprotection by semaphorin 3A. *Nature* 485, 69–74 (2012).
59. Goodman, C. S., Kolodkin, A. L., Luo, Y., Püschel, A. W. & Raper, J. A. Unified nomenclature for the semaphorins /collapsins. *Cell* 97, 551–552 (1999).
60. Worzfeld, T. & Ofermanns, S. Semaphorins and plexins as therapeutic targets. *Nat. Rev. Drug Discov.* 13, 603–621 (2014).
61. Hirokazu Kamei, Takenobu Ishii* & Yasushi Nishii. Semaphorin 3A regulates alveolar bone remodeling on orthodontic tooth movement. Department of Orthodontics, Tokyo Dental College, Tokyo, Japan. *Scientific Reports* 2022.
62. Zhang, M. et al. Influence of mechanical force on bone matrix proteins in ovariectomised mice and osteoblast-like MC3T3-E1 cells. *In Vivo* 31, 87–95 (2017).
63. Yu, X. et al. Semaphorin 3A gets involved in the establishment of mouse tooth eruptive pathway. *J. Mol. Histol.* 50, 427–434 (2019)

64. Lallier, T. E. Semaphorin profiling of periodontal fibroblasts and osteoblasts. *J. Dent. Res.* 83, 677–682 (2004).
65. Saito, M., Saito, S., Ngan, P. W., Shanfeld, J. & Davidovitch, Z. Interleukin 1 beta and prostaglandin E are involved in the response of periodontal cells to mechanical stress in vivo and in vitro. *Am. J. Orthod. Dentofac. Orthop.* 99, 226–240 (1991).
66. Shimizu, N. et al. Cyclic-tension force stimulates interleukin-1 β production by human periodontal ligament cells. *J. Periodontal Res.* 29, 328–333 (1994). 30. Matsumoto, T., Imura, T., O
67. 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.* 114, 416–422 (2006).
68. Hyeran Helen Jeona; Chia-Ying Yangb ; Min Kyung Shinc ; Jingyi Wangd ; Juhin Hirenc Patelc ; Chun-Hsi Chungc ; Dana T. Gravesf. Osteoblast lineage cells and periodontal ligament fibroblasts regulate orthodontic tooth movement that is dependent on Nuclear Factor-kappa B (NF-kB) activation.
69. Luo JL, Kamata H, Karin M. IKK/NF-kappaB signaling balancing life and death—a new approach to cancer therapy. *J Clin Invest.* 2005;115(10):2625–2632.
70. Zuo J, Archer LA, Cooper A, Johnson KL, Holliday LS, Dolce C. Nuclear factor kappaB p65 phosphorylation in orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 2007;86(6):556–559.
71. Sakamoto M, Fukunaga T, Sasaki K, et al. Vibration enhances osteoclastogenesis by inducing RANKL expression via NF-kappaB signaling in osteocytes. *Bone.* 2019; 123:56–66.
72. Pacios S, Xiao W, Mattos M, et al. Osteoblast lineage cells play an essential role in periodontal bone loss through activation of Nuclear Factor-Kappa B. *Sci Rep.* 2015;5: 16694.
73. Mina M, Braut A. New insight into progenitor/stem cells in dental pulp using Col1a1-GFP transgenes. *Cells Tissues Organs.* 2004;176(1-3):120–133
74. E. E. Bumann, *, S. A. Frazier-Bowers. A New Cyte in Orthodontics: Osteocytes in Tooth Movement. *Orthod Craniofac Res.* 2017 June ; 20(Suppl 1): 125–128. doi:10.1111/ocr.12176.

75. Graber LW, Vanarsdall RL, Vig KWL. Orthodontics: current principles and techniques. 5th ed. Philadelphia, PA: Elsevier/Mosby; 2012.
76. Norton LA, Burstone CJ. The biology of tooth movement. Boca Raton, Fla.: CRC Press; 1989.
77. C. Rubin, S. Judex, M. Hadjiargyrou. Skeletal adaptation to mechanical stimuli in the absence of formation or resorption of bone. Department of Biomedical Engineering, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY, USA. J Musculoskel Neuron Interact 2002; 2(3):264-267