

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FÍSICAS Y QUÍMICAS
ÁREA DE BIOESTRUCTURA**

**EXPRESIÓN DE LOS MARCADORES DE REMODELACIÓN TISULAR
TRAP Y MMP-14 DURANTE EL MOVIMIENTO DENTARIO EN RATAS**

María Paulina Rey Droghetti

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN
REQUISITO PARA OPTAR AL TÍTULO DE
CIRUJANO - DENTISTA**

**TUTOR PRINCIPAL
Prof. Dr. Patricio Smith Ferrer**

**TUTOR ASOCIADO
Prof. Dr. Alejandro Oyarzún Droguett**

Trabajo financiado con Proyecto de Investigación Fondecyt #1061065

**Santiago – Chile
2007**

INTRODUCCIÓN

El movimiento dentario implica la activación de una serie de cambios biológicos adaptativos en los tejidos periodontales que permiten el desplazamiento de los dientes a través del proceso alveolar y la reconstitución de un periodoncio funcional. Para esto, es necesario que ocurra una activa remodelación en los tejidos de inserción periodontal y por lo tanto de las moléculas constituyentes de la matriz extracelular (MEC) (1).

La aplicación de fuerzas sobre una pieza dentaria genera una serie de cambios tisulares en el tejido de soporte periodontal. En la zona del periodonto sometida a una fuerza compresiva (zona de presión), es posible identificar una activa degradación del tejido óseo. La remodelación de este componente tisular es llevada a cabo por osteoclastos que derivan de precursores presentes en la médula ósea hematopoyética (2, 3). Por otro lado, en la zona de tracción se distingue la aposición de tejido óseo por la actividad de osteoblastos presentes en el tejido (4). Esta combinación de síntesis y degradación de matriz permite el movimiento armónico de las piezas dentarias dentro de los huesos maxilares.

La remodelación de la MEC es ejecutada a través de diferentes cascadas de degradación en que participan una amplia familia de enzimas

proteolíticas (5). Estas cascadas han sido graficadas en la figura 1 y corresponden a 4 subgrupos: 1) Vía de las Metaloproteasas de Matriz (MMPs), 2) Vía del plasminógeno-plasmina, 3) Vía fagocítica y 4) Vía osteoclástica.

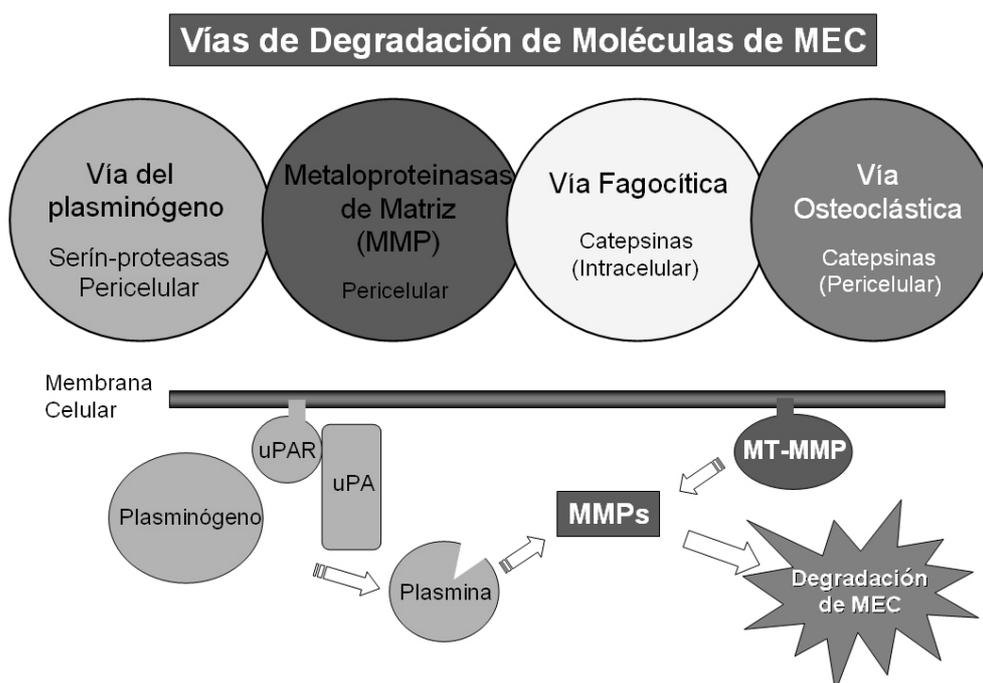


Figura 1: Esquema que representa la interacción de las diferentes cascadas proteolíticas que participan en la remodelación tisular. Se muestra que la vía de las MMPs puede interactuar con la vía del plasminógeno y las vías osteoclástica y fagocítica. La MMP-14 actúa como un activador asociado a la membrana celular que permite focalizar el proceso de degradación tisular a este nivel (5).

En el caso de la remodelación periodontal que ocurre durante el movimiento dentario, existen evidencias que varias de estas cascadas se encuentran activas o reguladas positivamente y se presume que participan en la degradación de componentes de la MEC periodontal (1, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12).

Las metaloproteinasas de la matriz (MMPs) o matrixinas corresponden a enzimas proteolíticas que participan en la remodelación de los tejidos conectivos a través del procesamiento proteolítico, tanto de moléculas estructurales de la matriz extracelular, como de citoquinas y factores de crecimiento que participan en la regulación de diferentes actividades celulares (1, 9). Las MMPs son producidas por una amplia variedad de células durante la remodelación tisular observada durante el desarrollo embrionario, enfermedades inflamatorias, patologías degenerativas articulares, invasión tumoral y reparación de heridas (13). La mayoría de ellas son secretadas como pro-enzimas, que deben ser activadas a través del procesamiento proteolítico de su prodominio y la consecutiva exposición de su dominio catalítico (9). Finalmente la actividad catalítica de estas proteasas es bloqueada por inhibidores específicos conocidos como TIMPs (13).

El ligamento periodontal está conformado principalmente por colágeno tipo I y III, cuya función es conectar el hueso alveolar con la raíz del diente,

dando así estabilidad mecánica a la posición dentaria (14). Durante el movimiento dentario, este tejido conectivo debe ser remodelado. La degradación proteolítica del colágeno fibrilar (tipo I y III) sólo puede ser ejecutada por un grupo restringido de enzimas proteolíticas conocidas como colagenasas. Se ha demostrado que el bloqueo farmacológico de la actividad de las MMPs es capaz de interferir en el movimiento dentario en animales de experimentación, lo que demuestra la importancia de esta familia de enzimas en el fenómeno de movilización dentaria (7).

Dentro de las MMPs capaces de degradar colágeno fibrilar se incluyen la MMP-1, MMP-8, MMP-13 y MMP-14 (MT1-MMP) (13). La participación de algunas de estas proteasas, tales como MMP-1, -8 y -13, ha sido demostrada durante el movimiento dentario ortodóncico en modelos animales y/o humanos (1, 8, 9, 11, 15). La MMP-14 corresponde a una metaloproteasa de transmembrana que posee actividad catalítica contra diferentes sustratos tales como colágeno tipo I, II y III, fibronectina, laminina 1 y 5, vitronectina, proteoglicanos (CD-44), Factor de Necrosis Tumoral-alfa (TNF- α) y Factor de Crecimiento de Tejido Conectivo (CTGF) (16,17). La MMP-14 puede a su vez activar a la pro-MMP-13 (17) y pro-MMP-2 a nivel de la superficie celular, y participa en la formación de un complejo trimolecular en conjunto con el TIMP-2 y la forma inactiva de MMP-2 (18). El TIMP-2 actúa como el principal inhibidor de la actividad proteolítica derivada de MMP-14 (18).

Una herramienta de gran utilidad en la identificación del papel que juegan estas proteasas en la remodelación tisular es el empleo de ratones knock-out. Es destacable que el ratón deficiente (knock-out) en MMP-14 manifiesta una serie de alteraciones en la degradación de colágeno fibrilar, lo que pone en evidencia la importancia de esta enzima proteolítica en la remodelación del colágeno fibrilar (19). Esta alteración en la producción de MMP-14 tiene importantes efectos en el crecimiento y desarrollo del esqueleto en general y en el desarrollo dentario y radicular (6, 19, 20, 21) (Figura 2).



Figura 2: La imagen muestra una radiografía de un ratón de 78 días knock-out para la MMP-14 (arriba), y el control correspondiente (abajo). Es posible notar una serie de alteraciones esqueléticas tales como dimorfismo craneal, hiperlordosis, hiperxifosis, y una marcada falta de crecimiento que ocurre en ausencia de la enzima (16).

Los osteoclastos son células multinucleadas encargadas de la reabsorción ósea formados *in situ* por la unión de monocitos-macrófagos. Las estructuras más abundantes en su citoplasma son los lisosomas, vesículas ricas en enzimas como la fosfatasa ácida. En el hueso se pueden identificar dos tipos de fosfatasa ácida. Ambas formas han sido caracterizadas bioquímicamente con respecto a su especificidad frente a diferentes sustratos y pH óptimo. Estas enzimas a su vez responden funcionalmente a hormonas osteotrópicas *in vitro*. La fosfatasa ácida tartrato sensible ha sido localizada en osteoblastos, osteocitos y osteoclastos, mientras que la Fosfatasa Ácida Tartrato Resistente (TRAP) se ubica únicamente en osteoclastos, y ha demostrado ser un marcador citoquímico para estas células (22).

Es importante destacar que, por un mecanismo aún no clarificado, la deficiencia en la expresión de MMP-14 en el ratón knock-out para esta enzima, se acompaña de un incremento en la expresión de la enzima TRAP y un incremento asociado en la diferenciación osteoclástica (16). Esto sugiere que la producción de ambas enzimas se encuentra de alguna forma coordinada y que la MMP-14 puede regular la diferenciación osteoclástica (Figura 3)



Figura 3: La fotografía muestra el cráneo de un ratón knock-out para MMP-14 (izquierda), comparado con un ratón normal (derecha). Nótese la fuerte expresión de la enzima TRAP, visualizada como un precipitado de color rojo, asociada a actividad osteoclástica, y la diferencia en tamaño de ambos cráneos, lo que refleja la importancia de MMP-14 en la formación ósea y homeostasis de las suturas craneales (16).

Para permitir la migración de los pre-osteoclastos y la formación de una laguna reabsortiva, es necesario que ocurra la remoción de matriz orgánica del tejido óseo. Recientemente, diferentes estudios han demostrado la participación activa de una serie de proteinasas, entre ellas catepsina K y MMP-14, durante la migración y anclaje de los osteoclastos, localizándose ésta última principalmente en las evaginaciones de la membrana celular o podosomas (17, 23). Es interesante destacar que catepsina K ha sido identificada durante la migración dentaria (12). Se ha

observado también que MMP-14 es sobreexpresada en la superficie de células cancerosas, donde su actividad proteolítica facilitaría el crecimiento e invasividad de las células tumorales a través de la matriz extracelular (17, 23, 24, 25).

Los antecedentes antes expuestos nos permiten suponer que TRAP y MMP-14 corresponderían a proteínas asociadas con la remodelación tisular de los tejidos periodontales durante el movimiento dentario.

HIPÓTESIS

Los marcadores de remodelación tisular TRAP y MMP-14 son expresados en los tejidos periodontales durante el movimiento dentario en ratas.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar la expresión de los marcadores de remodelación tisular TRAP y MMP-14 en los tejidos periodontales durante el movimiento dentario.

Objetivos Específicos:

- Relacionar la expresión de los marcadores de remodelación tisular TRAP y MMP-14 en función del tiempo durante el movimiento dentario.
- Identificar los tipos celulares productores de TRAP y MMP-14 durante el movimiento dentario.
- Caracterizar la distribución topográfica de la expresión de TRAP y MMP-14 durante el movimiento dentario.
- Observar cambios celulares e histológicos en los tejidos periodontales durante el movimiento dentario.
- Cuantificar la expresión de TRAP en los tejidos periodontales en relación con el tiempo durante el movimiento dentario.

MATERIALES Y MÉTODO

Selección y Procesamiento de la Muestra

Se utilizaron 10 ratas Sprague Dawley machos, adultas, de aproximadamente 200 grs. Ocho especímenes fueron anestesiados con Tiopental Sódico 1 gr. (Bestpharma S.A), al 0.5%, inyectado intraperitonealmente. A estos animales se les insertó entre los incisivos centrales superiores una banda elástica (UnitekTM Elastics, 3M, Bummer, 3/16", Heavy, 6 oz) la que fue fijada en su posición mediante técnica adhesiva con grabado total utilizando el Sistema Single Bond (3M, St Paul, MN, USA).

Los dos especímenes restantes sirvieron de control, por lo que no fueron sometidos a la intervención recién descrita. Durante el período postoperatorio, los especímenes fueron alimentados *ad libitum* y monitoreados periódicamente.

Los especímenes experimentales fueron sacrificados 1, 3, 5 y 7 días después de la intervención mediante una sobredosis de Tiopental Sódico.

Inmediatamente después del sacrificio, sus maxilares fueron removidos en bloque, e inmersos en una solución fijadora de formaldehído al 10%

tamponeado a pH 7.4, a 4°C durante 48 horas. Luego, las muestras fueron descalcificadas en una solución de EDTA al 10% a pH 7.4, a 4°C, durante 30 días.

Procesamiento Histológico:

Los especímenes se deshidrataron en etanoles de concentración ascendente, aclarados en xilol e incluidos en parafina. Se obtuvieron cortes seriados de 6 µm. de grosor, los que se montaron en portaobjetos xilanizados.

Detección Citoquímica de TRAP:

Cortes de 6 µm. de los especímenes, experimentales y control, se incubaron en un medio para la detección citoquímica de TRAP. Se disolvieron 4 mg. de Naftol AS-MX (Sigma, St. Louis, MO) en 0.25 ml. de N,N-dimetilformamida. Posteriormente se agregó 25 ml. de buffer acetato 0.2M (pH 5.0), 30 mg. de Fast Red como agente de acoplamiento. Como control, el sustrato fue omitido. Luego, se agregó 0.19 grs. de ácido tartárico L(+). Los cortes se incubaron durante 30 minutos a 37°C, y luego fueron

lavados en agua destilada.

Análisis Densitométrico:

Los cortes más representativos fueron observados y fotografiados en un microscopio de epifluorescencia convencional (Zeiss Axioscop) usando lentes objetivos de 10X, de acuerdo con la técnica de Espada, Horobin y Stockert (26). La fuente de iluminación fue una ampolleta de mercurio de 50 watts. La fluorescencia fue estudiada con un filtro de excitación a 490 nm. y un filtro de emisión a 520 nm. El espécimen que evidenció la fluorescencia más intensa fue usado para calibrar el tiempo de exposición para la estandarización del registro fotográfico (27). Las imágenes fueron registradas en positivo fotográfico Kodakchrome 100 ASA, los que fueron digitalizados en un Sprintsan 35 Plus Polaroid con una resolución de 800 DPI. Las imágenes fueron almacenadas como archivo JPEG.

Las fotografías fueron procesadas con el software Adobe Photoshop 7.0 para posterior análisis densitométrico utilizando el software Matrox Inspector (versión 1.71). Para el análisis, las imágenes se convirtieron a escala de grises y fueron seleccionadas 5 áreas de 200 x 200 pixeles (200.000 pixeles en total), desde el límite del cemento hacia el hueso

alveolar. Los gráficos obtenidos se convirtieron a valores numéricos y se calculó el promedio de la intensidad de la fluorescencia para cada área de 200 x 200 píxeles, se ordenó en tablas Excel (versión Office XP, Microsoft Corp.), y se les fue aplicada la prueba t de Student para muestras independientes con varianzas desiguales, considerando significativo un $p < 0.025$. (28)

Detección Inmunohistoquímica de MMP-14:

Los cortes fueron desparafinados en xilol e hidratados en PBS. Se realizó el desenmascaramiento antigénico con buffer Tris-HCl al 0.2%, a pH 8 durante 2 ciclos de 5 minutos cada uno con un microondas convencional en su máxima potencia (29). Posteriormente, se bloqueó la peroxidasa endógena en peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, durante 30 minutos. Los sitios inespecíficos fueron bloqueados con suero normal de cabra al 5% en PBS-BSA al 3% durante 30 minutos. Los cortes se incubaron durante 12 horas a 4°C en un anticuerpo monoclonal anti MMP-14 humana (Calbiochem Anti MMP-14 Ab-4) en una concentración de 15 µg/ml.

La inmunoreacción se detectó utilizando el sistema Biotina – Streptavidina – Peroxidasa – Diaminobenzidina (Histostain Plus). Como

control, algunos cortes se incubaron en suero de cabra no inmune. Se realizó una tinción de contraste nuclear con hematoxilina de Harris y con Fast Green FCF al 0.1%.

RESULTADOS

Experimentalmente se indujo la separación dentaria por medio de la inserción de una banda elástica entre los incisivos superiores. En la figura 1.A se muestra que la aplicación de este procedimiento logró una movilización dentaria efectiva al cabo de 7 días de iniciado el procedimiento.

A la observación microscópica y mediante la prueba citoquímica para la detección de TRAP, se evidenció una fuerte marcación para esta enzima en el área de presión y una marca débil en el área de tensión en los especímenes experimentales. Además, se observó una diferencia importante en la marca entre el control y cada espécimen experimental (Figura 1.B y C).

En la zona de tensión, fue posible notar un ligamento periodontal elongado, donde la marca para TRAP fue escasa (Figura 2.A). Contrariamente, en la zona de presión se pudo apreciar el ligamento periodontal comprimido, abundantes lagunas de reabsorción en el tejido óseo, y la presencia de la reacción citoquímica para TRAP en el espesor del ligamento periodontal (Figura 2.B).

La reacción citoquímica visualizada con microscopía de epifluorescencia se evidenció de un color rojo con intensidades variables en

las distintas zonas de los tejidos involucrados (Figuras 3.A, B, C, D y E). Se observó a la inspección visual que la intensidad de la fluorescencia en los especímenes experimentales es mayor que en el espécimen control, donde fue posible detectar un aumento desde el día 1 y un máximo de expresión en el día 3. A los días 5 y 7 se observó una leve disminución en la expresión del marcador en estudio.

El análisis densitométrico determinó que existe un aumento de la fluorescencia estadísticamente significativo respecto del control para los días 1, 3 y 7 ($p < 0.025$). En el día 5 la diferencia de la intensidad de la fluorescencia no fue estadísticamente significativa respecto del control.

La inmunomarcación para MMP-14 fue observada fundamentalmente en las áreas de compresión de los tejidos periodontales. Esta marca fue detectada principalmente en osteoclastos multinucleados y algunas células mononucleadas del ligamento periodontal vecino a las zonas de reabsorción ósea, compatibles con fibroblastos (Figura 4.A, B, C). En las muestras control negativo, donde se omitió el anticuerpo primario, no se detectó la inmunoreacción (Figura 4.D).

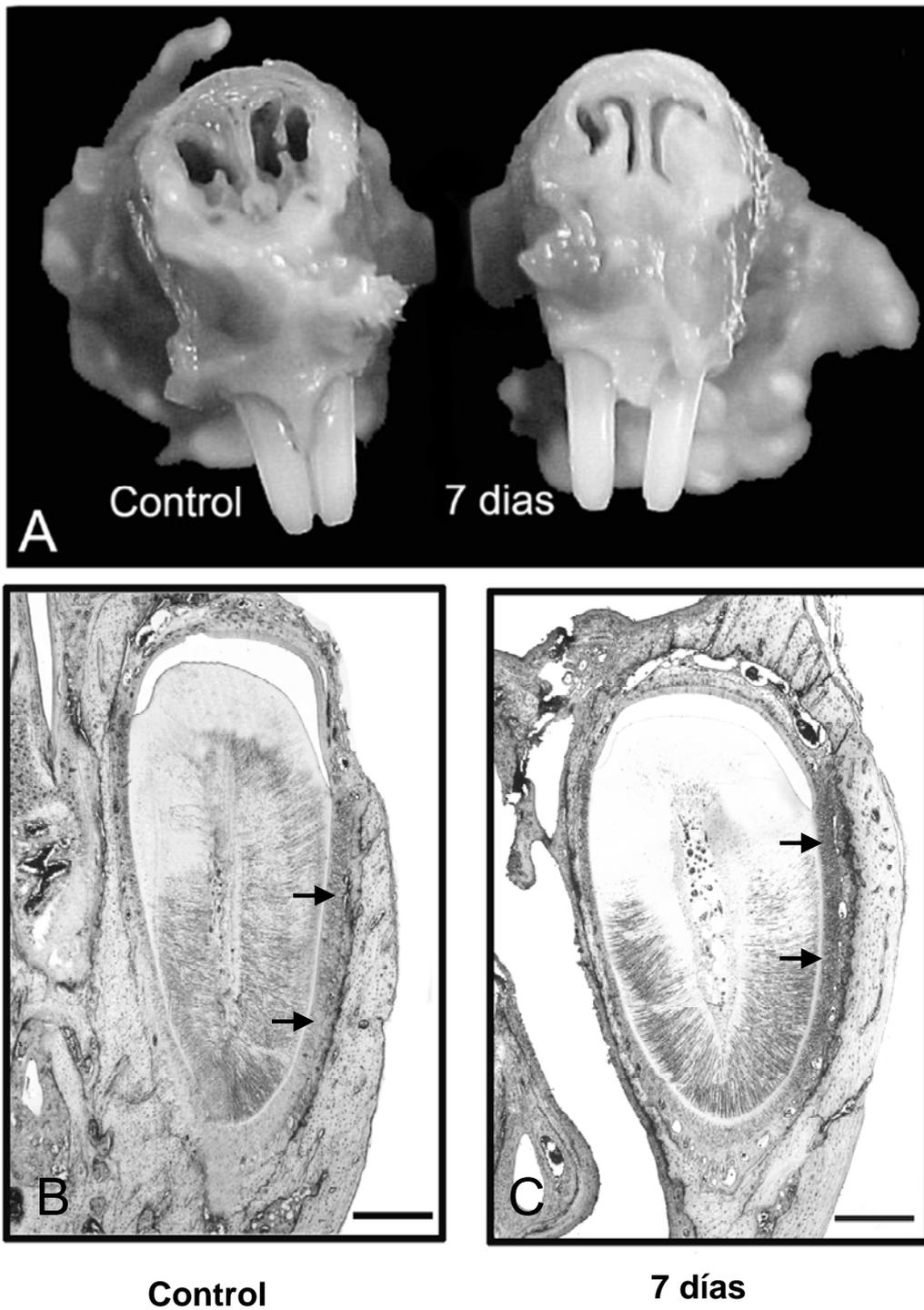


Figura 1

Leyendas de Figuras

Figura 1: Visión panorámica de especímenes experimentales a nivel macro y microscópico. **A:** Se observa la separación dentaria lograda mediante la inserción de una banda elástica entre los incisivos superiores de las ratas luego de 7 días de aplicada la fuerza. **B:** Corte transversal de un incisivo central de un espécimen control. **C:** Corte transversal de un incisivo central de un espécimen experimental sacrificado al día 7. Nótese la diferencia en la expresión de TRAP en el área distal (flechas). Barra: 250 μm .

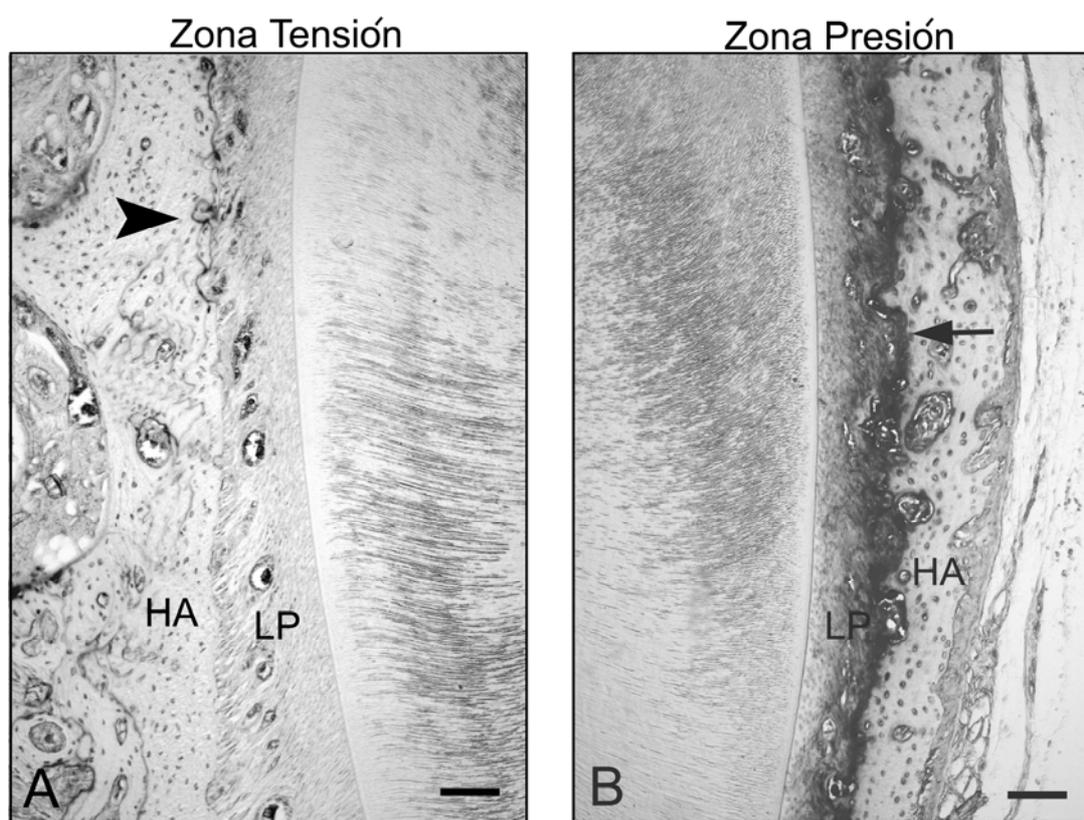
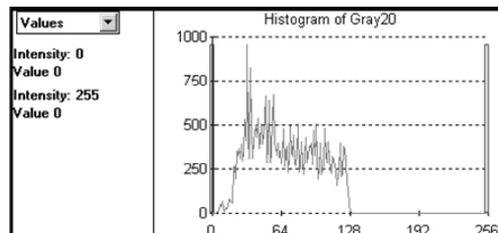


Figura 2

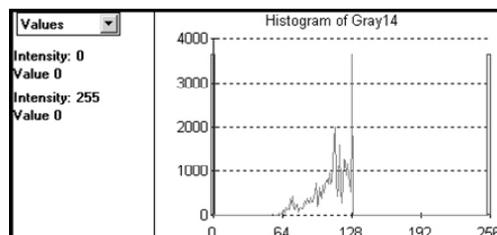
Leyendas de Figuras

Figura 2: Comparación de zonas de presión y tensión en un corte experimental del día 3. **A:** Nótese que la marca de TRAP (cabeza de flecha) en la zona de tensión se asocia con áreas reducidas, en la interfase con el hueso alveolar (HA) y ligamento periodontal (LP). Barra: 50 μ m.

B: Obsérvese que la marca para TRAP en color rojo (flecha), en el área de presión generada en distal del diente movilizado, ocupa grandes extensiones del ligamento periodontal y hueso alveolar. Barra: 50 μ m.

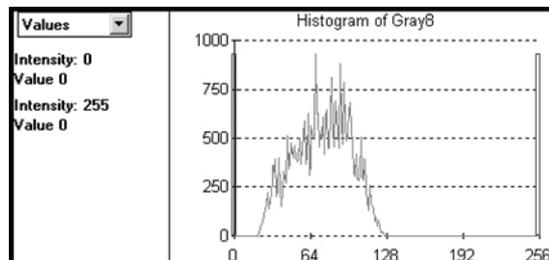
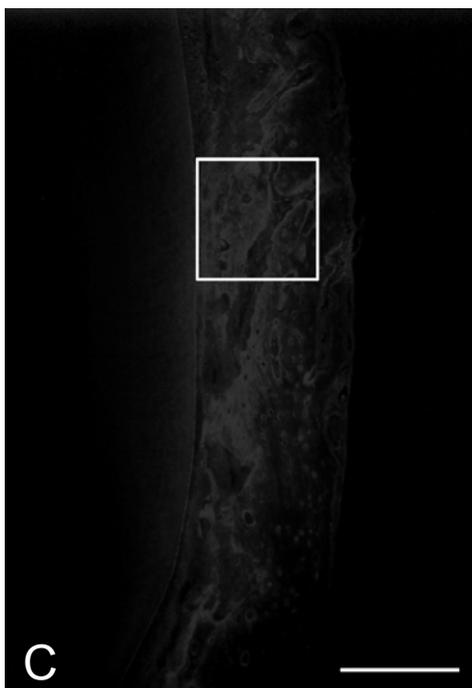


Día 1

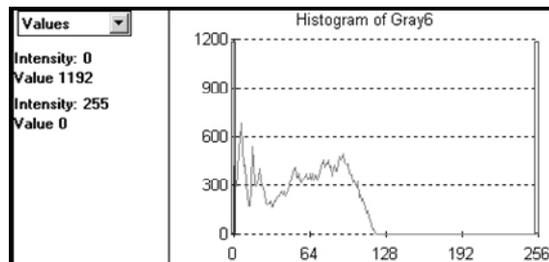


Día 3

Figura 3

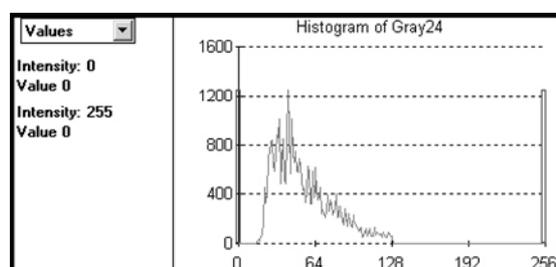


Día 5



Día 7

Figura 3



Control

Figura 3

Leyendas de Figuras

Figura 3: Cortes correspondientes a especímenes experimentales y control visualizados con epifluorescencia para detectar la expresión de TRAP evidenciada como una reacción de color rojo en el lado de presión de los dientes movilizados. Se acompaña el correspondiente histograma de la distribución de la fluorescencia del recuadro señalado en cada figura.

Barra: 250 μm .

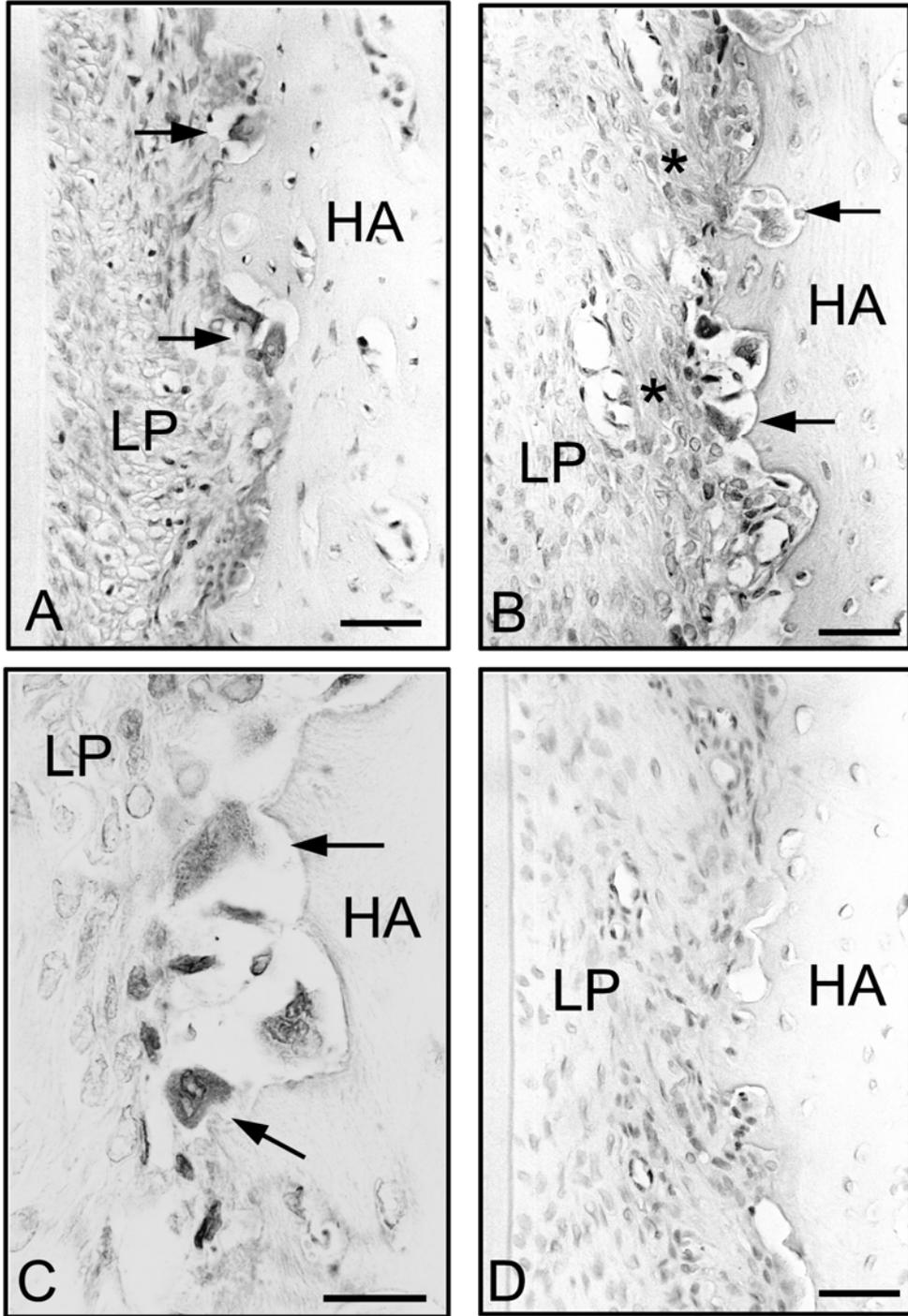


Figura 4

Leyendas de Figuras

Figura 4: Expresión de MMP-14 en el área de presión generada por la movilización dentaria. **A:** Zona de presión, donde se observa la presencia de osteoclastos (flecha) en la interfase entre el hueso alveolar (HA) y ligamento periodontal (LP). Tinción: Giemsa. Barra: 50 μ m. **B:** Inmunoreacción para MMP-14 en color café (asterisco), y la marca en relación con los osteoclastos (flecha). Barra: 50 μ m. **C:** Osteoclastos positivos para MMP-14 (flechas). Barra: 50 μ m. **D:** Control negativo, en el que se aprecia ausencia de marca para MMP-14. Barra: 50 μ m.

DISCUSIÓN

La movilización dentaria ortodóncica implica la activa remodelación del tejido periodontal y óseo adyacente a la pieza dentaria. A nivel histológico dos zonas pueden ser reconocidas en los tejidos periodontales; un área de reabsorción ubicada en la zona de compresión y otra de aposición ósea en la zona de tracción (4). En ambas áreas existe una activa remodelación de los tejidos periodontales, lo que implica la expresión de proteasas capaces de degradar macromoléculas estructurales de la matriz extracelular y el procesamiento proteolítico de factores de crecimiento y citoquinas que modulan de manera crítica diferentes respuestas celulares tales como diferenciación, migración, adhesión, proliferación y muerte celular (13). En el presente estudio hemos analizado la expresión de dos importantes enzimas involucradas en la remodelación tisular como son TRAP y MMP-14 durante el movimiento dentario.

Para la realización de este experimento se utilizó un modelo de movilización dentaria ortodóncica en ratas, en las que se provocó la separación de los incisivos centrales superiores mediante la inserción de una banda elástica entre ambos dientes. Posterior a la ejecución del procedimiento antes descrito, las ratas fueron monitoreadas y sacrificadas transcurridos 1, 3, 5 y 7 días luego de la inserción de la banda. Se pudo

constatar que el modelo de movilización dentaria fue exitoso, ya que fenotípicamente se observó la separación entre los incisivos superiores. A nivel histológico se observó la desorganización de las fibras del ligamento periodontal en la zona de compresión y la elongación de estas en el área de tensión. Además se verificó la presencia de múltiples lagunas de reabsorción ósea, y la aparición de células multinucleadas compatibles con osteoclastos en la zona de compresión. Estos antecedentes nos permiten concluir que el modelo de movilización dentaria utilizado en este caso fue efectivo en lograr un desplazamiento ortodóncico comparable al de estudios previos (3, 31, 32, 33, 34, 35).

La TRAP, por ser un importante marcador para osteoclastos (22), ha sido utilizada en múltiples estudios de movilización dentaria, donde se ha verificado la presencia de células TRAP positivas en el área de presión, asociadas a lagunas de reabsorción ósea. (31, 32, 33). En modelos de movimiento dentario en animales, se ha observado que la expresión de TRAP alcanza un nivel máximo en el día 3 posterior a la aplicación de fuerzas (3, 30, 36). Luego de esto la producción de esta enzima tiende a disminuir de manera significativa en el día 7 (34). Esta descripción es coincidente con la diferenciación osteoclástica, que alcanza su máximo nivel entre los días 3 y 5 luego de la aplicación de fuerzas ortodóncicas (34, 37). Estos antecedentes concuerdan con nuestros resultados en los cuales

podimos observar que los mayores niveles de expresión de TRAP ocurrieron en la zona de compresión en el día 3, posterior a la aplicación de la fuerza ortodóncica, observándose luego una disminución en la marca para TRAP en los días 5 y 7. En el día 5 se apreció una marca menor a la esperada, respecto del control, probablemente por defectos de la técnica o del procesamiento de la muestra. En el área de tensión se observó una baja reacción para TRAP, lo que se explica por la remodelación fisiológica y la migración distal que posee la especie en estudio (30, 38).

Producto de la movilización dentaria es posible observar la reabsorción de la superficie radicular como una de las secuelas más comunes en los pacientes luego del tratamiento ortodóncico (39). Se ha reportado que este proceso depende de una serie de factores biológicos y mecánicos, y está altamente asociada a la predisposición individual (39, 40). Se ha sugerido que la reabsorción radicular es resultado de una injuria local por sobrecompresión del ligamento periodontal, y la consecuente remoción del tejido necrótico de la zona hialinizada (41, 42, 43). La producción de TRAP ha sido vinculada a la generación de estas lesiones por reabsorción radicular. En estos estudios se ha observado la participación de células multinucleadas TRAP positivas en la remoción del tejido necrótico hialinizado generado por la aplicación de fuerzas excesivas. (41, 42, 43).

Utilizando inmunohistoquímica, se pudo observar que la producción de MMP-14 se encuentra asociada a fibroblastos de la zona de compresión del ligamento periodontal y osteoclastos involucrados en la degradación de tejido óseo de la misma región. No se logró observar la producción de MMP-14 en la zona de tensión del ligamento periodontal. Estudios previos han permitido identificar la producción de MMP-14 en fibroblastos de piel y encía, macrófagos infiltrantes de placas ateromatosas, células tumorales, y osteoclastos (17, 23, 44). La expresión de MMP-14 ha sido localizada en los podosomas de osteoclastos, lo que ha permitido vincular la actividad de esta enzima con la migración celular (17, 23). Dentro de los sustratos que podría degradar la MMP-14 asociados a la migración encontramos a colágeno tipo I y el proteoglicano CD-44. En células cancerosas la degradación de CD-44 desde la superficie celular puede potenciar la migración e invasión tumoral (25, 45, 46). Estos datos permiten argumentar que la degradación de estas macromoléculas por MMP-14 podría estar potenciando positivamente la migración de células clásticas a través de la matriz ósea.

La deficiencia de MMP-14 en ratones induce un incremento en la producción de TRAP y en el número de osteoclastos. Además el tejido óseo de estos animales manifiesta marcados signos de osteopenia. (19, 20). Uno de los reguladores claves de la diferenciación osteoclástica es la citoquina Activador del Receptor de Ligando de NF-kB (RANKL) (47). Esta citoquina

es una proteína de transmembrana cuya actividad biológica puede ser regulada a través de su procesamiento proteolítico y liberación desde la membrana celular (48). Utilizando cultivos primarios de osteoblastos y osteoclastos, se ha observado que la MMP-14 podría participar regulando negativamente la osteoclastogénesis a través del procesamiento proteolítico, y aparente inactivación de la citoquina RANKL (48). Estos antecedentes permiten proponer que la producción de MMP-14 en osteoclastos podría estar controlando negativamente el fenómeno de osteoclastogénesis durante el movimiento dentario.

La reabsorción ósea, tanto *in vitro* como *in vivo*, es estimulada por TNF α , una citoquina pro-inflamatoria producida principalmente por monocitos, macrófagos, fibroblastos y también por osteoblastos (49). Estudios en humanos han evidenciado un aumento en los niveles de TNF α en el fluido gingival crevicular durante el tratamiento de ortodoncia, y se ha demostrado en modelos animales que TNF α juega un papel importante en la movilización dentaria en una etapa tardía. (32). Es destacable que estudios recientes han demostrado que la MMP-14 puede regular la actividad biológica de TNF- α a través de su procesamiento proteolítico (50). Sin embargo, no está claro si esta modificación proteolítica ocasiona cambios en la actividad biológica de TNF- α . Una de las citoquinas que estimulan la producción de MMP-14 es TNF- α (50), y a través de este mecanismo se

podría estar potenciando de manera autocrina la producción de esta enzima proteolítica. Estudios futuros deberán comprobar si es que TNF- α está regulando la producción de MMP-14 durante la movilización dentaria.

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten confirmar la hipótesis planteada, dado que los marcadores de remodelación tisular TRAP y MMP-14 se expresan en los tejidos periodontales durante la movilización dentaria en el modelo utilizado.

Conclusiones

1. TRAP y MMP-14 son marcadores de remodelación tisular expresados en los tejidos periodontales del modelo utilizado en esta investigación.
2. El uso de incisivos de erupción continua de rata es un modelo útil para el estudio de la remodelación de los tejidos periodontales durante el movimiento ortodóncico, dado que la expresión de los marcadores biológicos analizados en el tiempo es equivalente a la expresión de los mismos marcadores en molares de la misma especie.

Resumen

La movilización dentaria ortodóncica involucra una serie de cambios en los tejidos que rodean la pieza dentaria. Para que esto ocurra es necesario que exista una activa remodelación de los tejidos de soporte periodontal. En el presente estudio hemos analizado la expresión del marcador de osteoclastos TRAP y de la proteasa MMP-14 durante la movilización dentaria ortodóncica en ratas. La producción de TRAP fue identificada principalmente en osteoclastos ubicados en la zona de compresión del ligamento periodontal en el día 3, luego de la aplicación de la fuerza ortodóncica. La producción de MMP-14 fue observada en fibroblastos de la zona de compresión del ligamento periodontal y osteoclastos ubicados en esta misma región.

Referencias

1. Apajalahti, S. *et al.* "The *in vivo* levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during Initial orthodontic tooth movement", J Dent Res 2003, 82(12):1018-1022.
2. Tsay, P. *et al.* "Osteoclast activation and recruitment after application of orthodontic force", Am J Orthod Dentofacial Orthop 1999; 115:323-30.
3. Rody, W. *et al.* "Osteoclast recruitment to sites of compression in orthodontic tooth movement", Am J Orthod Dentofacial Orthop 2001; 120:477-89.
4. Melsen, B. "Tissue reaction to orthodontic tooth movement – a new paradigm". Eur J Orthod 2001; 23: 671-81.
5. Birkedal-Hansen H, *et al.* "Matrix metalloproteinases. A review", Crit Rev Oral Biol Med 1993, (4): 197-250.
6. Beertsen, W., *et al.* "On the role of MT1-MMP, a matrix metalloproteinase essential to collagen remodelling, in murine molar eruption and root growth", Eur J Oral Sci 2002; 110:445-451.

7. Bildt, M.M., *et al.* "CMT-3 inhibits orthodontic tooth displacement in the rat", *Arch Oral Biol.* 2006 Dec 14.
8. Cantarella, G., *et al.* "Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement", *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2006 Nov; 130(5):568.e11-6.
9. Takahashi, I., *et al.* "Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats", *J Dent Res* 2003 Aug; 82(8):646-51.
10. Takahashi, I., *et al.* "Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement", *J Mol Histol.* 2006 Nov; 37(8-9):333-42.
11. Ingman, T., *et al.* "Matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a pilot study during 1 month of follow-up after fixed appliance activation", *Eur J Orthod.* 2005 Apr; 27(2):202-7.

12. Domon, S., *et al.* "In situ hybridization for matrix metalloproteinase-1 and cathepsin K in rat root-resorbing tissue induced by tooth movement", *Arch Oral Biol.* 1999 Nov; 44(11):907-15.
13. Parks W.C., Wilson C.L., López-Boado, Y.S. "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity", *Nat Rev Immunol* 2004: 617-629.
14. McCulloch, C.A., Lekic, P., McKee, M.D. "Role of physical forces in regulating the form and function of the periodontal ligament", *Periodontol* 2000 Oct; 24:56-72.
15. Tsubota, M., *et al.* "Expression of MMP-8 and MMP-13 mRNAs in rat periodontium during tooth eruption", *J Dent Res.* 2002 Oct; 81(10):673-8.
16. Holmbeck, K., Bianco, P., Yamada, S., Birkedal-Hansen, H. "MT1-MMP: a tethered collagenase", *J Cell Physiol* 2004, 200: 11-19.
17. Linsuwanont-Santivong, B., *et al.* "Expression of MT1-MMP during deciduous tooth resorption in odontoclasts", *J Bone Miner Metab.* 2006; 24(6):447-53.
18. Sato, H., *et al.* "A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells", *Nature* 1994, 370: 61-65.

19. Holmbeck, K., *et al.* "MT1-MMP-deficient mice develop dwarfism, osteopenia, arthritis, and connective tissue disease due to inadequate collagen turnover". *Cell* 1999 Oct 1; 99(1):81-92.
20. Holmbeck, K., *et al.* "MT1-MMP-dependent, apoptotic remodeling of unmineralized cartilage: a critical process in skeletal growth", *J Cell Biol.* 2003 Nov 10; 163(3):661-71.
21. Bartlett, J.D., *et al.* "Delayed tooth eruption in membrane type-1 matrix metalloproteinase deficient mice", *Connect Tissue Res.* 2003; 44 Suppl 1:300-4.
22. Cole, A.A. y Walters, L.M. "Tartrate-resistant acid phosphatase in bone and cartilage following decalcification and cold embedding in plastic", *J Histochem Cytochem.* 1987 Feb; 35(2):203-6.
23. Sato, T., *et al.* "Identification of the membrane-type metalloproteinase MT1-MMP in osteoclast", *J Cell Sci.* 1997 Mar; 110 (Pt 5):589-96.
24. Dong, Z., *et al.* "Matrix metalloproteinase activity and osteoclasts in experimental prostate cancer bone metastasis tissue", *Am J Pathol.* 2005 Apr; 166(4):1173-86.

25. Itoh, Y., Seiki, M. "MT1-MMP: A potent modifier of pericellular microenvironment", *J Cell Physiol* 206: 1-8, 2006.
26. Espada, J., Horobin, R., Stockert, J. "Fluorescent cytochemistry of acid phosphatase and demonstration of fluid-phase endocytosis using an azo dye method", *Histochem Cell Biol* 1997; 108:481-7.
27. Vento, P., y Soinila, S. "Quantitative comparison of growth-associated protein GAP-43, neuron-specific enolase, and protein gene product 9.5 as neuronal markers in mature human intestine", *J Histochem* 1999, 47:1405-1415.
28. Mosedale, D, Metcalfe, J., Grainger, D. "Optimization of immunofluorescence methods by quantitative image analysis", *J Histochem Cytochem* 1996, 44:1043-1050.
29. Kinoh, H., *et al.*"MT-MMP, the cell surface activator of pro-MMP-2 (progelatinase A), is expressed with its substrate in mouse tissue during embryogenesis", *J Cell Sci* 1996, 109, 953-59.

30. Kobayashi, K., *et al.* "Alterations in Ultrastructural localization of growth-associated Protein-43 (GAP-43) in periodontal Ruffini endings of rat molars during experimental tooth movement", *J Dent Res* March 1998; 77(3):503-17.
31. Bonate-Oliveira, L., *et al.* "Ultrastructural and histochemical examination of alveolar bone at the pressute areas of rat molars submitted to continuous orthodontic force", *Eur J Oral Sci*, 2003 Oct; 111(5): 410-6.
32. Yoshimatsu, M., *et al.* "Experimental model of tooth movement by orthodontic force in mice and its application to tumor necrosis factor receptor-deficient mice", *J Bone –miner Metab* (2006) 24:20-7.
33. Kowarizadeh, A., *et al.* "Correlation of stress and strain profiles and the distribution of osteoclastic cells induced by orthodontic loading in rat", *Eur J Oral Sci* 2004; 112:140-7.
34. Gu, G., Lemmery, S., King, G. "Effect of appliance reactivation after decay of initial activation on osteoclasts, tooth movement, and root resorption", *Angle Orthod.* 1999 Dec; 69(6):515-22.

35. Jäger, A., *et al.* "Soluble cytokine receptor treatment in experimental orthodontic tooth movement in the rat", *Eur J Orthod* 2005 Feb; 27(1):1-11.
36. Keeling, S.D, *et al.* "Serum and alveolar bone phosphatase changes reflect bone turnover during orthodontic tooth movement" *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 1993 Apr; 103(4):320-6.
37. Konoo, T., *et al.* "Intermittent force in orthodontic tooth movement" *J Dent Res* 2001; 80(2):457-60.
38. Ren, Y., Maltha, J.C, Kuijpers-Jagtman, A.M. "The rat as a model for orthodontic tooth movement - a critical review and a proposed solution", *Eur J Orthod.* 2004 Oct; 26(5):483-90.
39. Pizzo, G. *et al.* "Root resorption and orthodontic treatment. Review of the literature", *Minerva Stomatol.* 2007 Jan-Feb;56(1-2):31-44.
40. Al-Qawasmi, R.A., *et al.* "Root resorption associated with orthodontic force in inbred mice: genetic contributions", *Eur J Orthod* 2006 Feb; 28(1):13-9.

41. Lu, L.H., *et al.* "Histological and histochemical quantification of root resorption incident to the application of intrusive force to rat molars", *Eur J Orthod* 1999 (21); 57-63.
42. Brudvik, P., Rygh, P. "Root resorption beneath the main hyalinized zone", *Eur J Orthod* 1994 (16); 249-263.
43. Brudvik, P., Rygh, P. "Transition and determinants of orthodontic root resorption-repair sequence", *Eur J Orthod* 1995 (17); 177-188.
44. Rajavashisth, T., *et al.* "Membrane type 1 matrix metalloproteinase expression in human atherosclerotic plaques: evidence for activation by proinflammatory mediators", *Circulation*. 1999 Jun 22; 99(24):3103-9.
45. Itoh, Y., Seiki, M. "MT1-MMP: an enzyme with multidimensional regulation", *Trends Biochem Sci*. 2004 Jun; 29(6):285-9.
46. Mori, H., *et al.* "CD44 directs membrane-type 1 matrix metalloproteinase to lamellipodia by associating with its hemopexin-like domain", *EMBO J*. 2002 Aug 1; 21(15):3949-59.

47. Yamaguchi, M., *et al.* "RANKL increase in compressed periodontal ligament cells from root resorption", *J Dent Res* 2006 Aug; 85(8):751-6.
48. Hikita, A., *et al.* "Negative regulation of osteoclastogenesis by ectodomain shedding of receptor activator of NF-kappaB ligand", *J Biol Chem.* 2006 Dec 1; 281(48):36846-55.
49. Zhang, D., *et al.* "Effect of soluble receptors to interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha on experimentally induced root resorption in rats", *J Periodont Res* 2003; 38; 324-332.
50. Tam, E., *et al.* "Membrane protease proteomics: Isotope-coded affinity tag MS identification of undescribed MT1-matrix metalloproteinase substrates", *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 May 4; 101(18):6917-22.