



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE MEDICINA

**“Impacto del tratamiento de Ortopedia Funcional en los biomarcadores RANK-RANKL y
OPG del fluido crevicular”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para

obtener el Grado de

Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta

Alicia Terán Alcocer

Dirigido por:

Dr. Juan Carlos Solís Sainz

Querétaro, Qro. Enero de 2020



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Medicina

Doctorado en Ciencias de la Salud

**“Impacto del tratamiento de Ortopedia Funcional
en los biomarcadores RANK-RANKL y OPG del fluido crevicular”**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias de la Salud

Presenta

Alicia Terán Alcocer

Dirigido por:

Dr. Juan Carlos Solís Sainz

Dr. Juan Carlos Solís Sainz
Presidente

Dra. Sandra Margarita Hidalgo Martínez
Secretaria

Dr. Pablo García Solís
Vocal

Dra. Ma. Luisa Leal García
Suplente

Dr. Salvador Arellano Rodríguez
Suplente

Enero de 2020

DEDICATORIAS

Con profundo amor:

A mi esposo Guillermo,

A mis hijos: Guillermo, Laura, Andrea y Diego.

A mis nietas Alicia, Catalina y Natalia.

A la memoria de mi querida madre Q.F.B. Alicia Alcocer Loyola, por la inmensa bendición que tuve al ser su hija.

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la maravillosa vida que me dio.

A la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro por la oportunidad de desarrollarme académicamente y profesionalmente.

A la Directora de la Facultad de Medicina, Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea por el gran apoyo para la realización de este trabajo.

A mi Director de Tesis, Dr. Juan Carlos Solís Sainz por su paciencia y soporte en el desarrollo de la misma. Mi agradecimiento.

Al Dr. Guillermo Leo Amador por su gran ejemplo como médico, investigador, maestro y amigo, piedra angular del Doctorado en Ciencias de la Salud. Mi admiración y respeto.

A la M.O. Mónica Clarisa Ortiz Villagómez por su valiosa asesoría clínica y a la Dra. Ana Alicia Sánchez Tusié por su ayuda en el desarrollo del estudio.

A mis compañeros del doctorado, por su amistad y tiempo compartido:

Alejandra Medina, Alicia Pons, Leticia Ávila, Nury Villaseñor, Alfredo Uribe y Guillermo Ortiz.

A los alumnos voluntarios de este estudio: Ana Sofía Vázquez del Real, Luis Eduardo Álvarez Porras, Carlos Alberto Cisneros Negrete, Manolo Acosta Bahena, Alejandra Abril Barrón Toledo y Karla Valencia Reséndiz.

INDICE

Contenido	Página
I. Introducción	1
a. Planteamiento del problema	1
b. Justificación	1
II. Antecedentes	4
a. Fluido crevicular	4
b. Principios de Ortopedia Maxilar	10
1) Exitación neural	12
2) Cambio de postura	13
3) Cambio de postura terapéutica	13
a. Remodelado óseo	14
b. Biomarcadores	22
III. Hipótesis	24
a. H_0	24
b. H_a	24
IV. Objetivos	24
a. Objetivo general	24
b. Objetivos específicos	24
V. Metodología	25
a. Definición de variables	25
b. Tamaño de muestra	26
c. Medición y análisis	26
d. Flujograma de actividades	28
e. Prueba piloto	29
f. Preparación de reactivos	29
g. Lecturas	31
h. Cronograma de actividades	34
VI. Resultados	35
a. Discusión	36
VII. Conclusiones	37
VIII. Referencias bibliográficas	40
IX. Anexos	46
a. Anexo 1. Niveles de RANK-RANKL y OPG en fluido crevicular	46
b. Anexo 2. Índice de O'Leary	47
c. Anexo 3. Periodontograma	48

INDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Definición de Variables y unidades de medida	25
Tabla 2. Valores de la prueba piloto	26
Tabla 3. Día "0".....	30
Tabla 4. Día 1	30
Tabla 5. Día 7.....	30
Tabla 6. Día 30.....	30
Tabla 7. Lecturas.....	35

INDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cambio de postura terapéutico	14

RESUMEN

El estudio de la proteómica del fluido crevicular ha sido empleado para detectar la presencia de biomarcadores de la respuesta inflamatoria de los tejidos periodontales de soporte tanto en la enfermedad periodontal como en el efecto de los tratamientos ortodónticos en relación a la presencia de biomarcadores del remodelado óseo. Este estudio pretendió identificar la cantidad de RANK- RANKL (ligando activador del receptor del factor nuclear kappa B y de OPG (osteoprotegerina) en fluido crevicular en respuesta al tratamiento de Ortopedia Funcional. Se realizó historia clínica y consentimiento informado a 11 voluntarios, 4 hombres y 7 mujeres, entre 19 y 21 años de edad. Se excluyeron 2 mujeres debido a padecer migraña y posteriormente a 1 hombre por presentar Gingivitis y altos porcentajes de presencia de placa dentobacteriana, registrados mediante el Índice de O'Leary. Se eliminaron del estudio 2 mujeres que no asistieron a las sesiones de toma de muestra. Este estudio fue cuasiexperimental, tuvo una muestra final de 6 voluntarios con salud periodontal que usaron el aparato ortopédico mínimo 16 horas diarias. El procedimiento consistió en toma de muestra de fluido crevicular introduciendo tiras de papel Perioparer® en surco de la cara mesial de los caninos, antes de colocar el aparato de ortopedia, a las 0 horas, 168 horas (7 días) y 28 días después de activar el aparato de pistas Planas de ortopedia funcional. Las tiras de papel fueron pesadas antes y después de cada toma de muestra. Para identificar la presencia de las citoquinas se siguió el protocolo del kit de la prueba de ELISA The Human TNFSF11 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (RANKL) (ab213841) que está diseñado para la medida cuantitativa del TNFSF11 humano en cultivos celulares sobrenadantes, lisados celulares, tejidos homogenados, suero y plasma. Resultados: no hubo evidencia de presencia de citoquinas en ninguna muestra concluyendo que el tratamiento ortopédico es mínimamente invasivo ya que la respuesta inflamatoria es muy leve y no presenta los niveles identificables por lo que se requiere más tiempo del tratamiento para evaluarlo.

(Palabras clave: fluido crevicular, RANKL, OPG, Ortopedia Funcional, Remodelado óseo).

Abstract

The study of the proteomics of the crevicular fluid has been used to detect the presence of biomarkers of the inflammatory response of the support periodontal tissues both in the periodontal disease and in the effect of orthodontic treatments in relation to the presence of biomarkers of bone remodeling. . This study aimed to identify the amount of RANK-RANKL (kappa B nuclear factor receptor activator ligand and OPG (osteoprotegerin) in crevicular fluid in response to Functional Orthopedics treatment. Clinical history and informed consent was made to 11 volunteers, 4 men and 7 women, between 19 and 21 years old, 2 women were excluded due to migraine and then 1 man for presenting Gingivitis and high percentages of presence of dentobacterial plaque, registered by the O'Leary Index. 2 women who did not attend the sampling sessions. This study was quasi-experimental, had a final sample of 6 volunteers with periodontal health who used the orthopedic device at least 16 hours a day. The procedure consisted of taking a sample of crevicular fluid introducing strips of Perioparer® paper in the groove of the mesial side of the canines, before placing the gold apparatus topedia, at 0 hours, 168 hours (7 days) and 28 days after activating the flat track device of functional orthopedics. The paper strips were weighed before and after each sampling. To identify the presence of cytokines, the protocol of the ELISA test kit The Human TNFSF11 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (RANKL) (ab213841) was used, which is designed for the quantitative measurement of human TNFSF11 in supernatant cell cultures, cell lysates, homogenous tissues, serum and plasma.

Results: there was no evidence of the presence of cytokines in any sample, so it is concluded that orthopedic treatment is minimally invasive, so the inflammatory response is very mild and does not present identifiable levels, so more treatment time is required to evaluate it.

(Keywords: crevicular fluid, RANKL, OPG, Functional Orthopedics, Bone Remodeling)

I. Introducción /Planteamiento del problema y justificación.

El remodelado óseo implica el acoplamiento de las fases de aposición y resorción óseas que están controladas por la interacción de las citoquinas RANK, receptor activador para el factor nuclear κ B y el ligando RANKL que activan la diferenciación, maduración y activación osteoclástica y la osteoprotegerina OPG, que inhibe la maduración y activación de los osteoclastos.

Estudios realizados de tratamientos con ortodoncia fija han demostrado la presencia de marcadores RANKL Y OPG en fluido crevicular (Nishijima y cols., 2006), pero no hay evidencia de estos marcadores en tratamientos con ortopedia funcional. La presencia y cantidad de estos marcadores en los tratamientos de ortopedia funcional pueden ser evidencia de la actividad y supresión osteoclástica, como manifestación del ciclo del remodelado óseo y el acoplamiento celular que está biológicamente controlado durante las fases de aposición y resorción óseas. Ante la falta de medición del proceso inflamatorio generado durante el remodelado óseo y el desconocimiento de los niveles de citoquinas que controlan el acoplamiento celular con el tratamiento ortopédico funcional, el cual es de mínima invasión, es importante conocer cuáles son los niveles de los biomarcadores en este proceso biológico. La mal posición dentaria ocupa el cuarto lugar entre las patologías bucodentales con mayor prevalencia en la población, debajo de caries, enfermedad periodontal, y de las anomalías dentofaciales. Después de las maloclusiones, siguen en orden descendente en prevalencia, cáncer, malformaciones, traumatismos y fluorosis (Higashida, 2009). En 2013, Silva Flores reportó en un estudio en escolares de Ciudad Victoria, Tamps. que la prevalencia de caries fue de un 87%, de gingivitis 63% y maloclusiones 33% (Silva-Flórez-Moreno,2013).

Sin embargo la presencia de maloclusiones con distintos grados de severidad se sigue incrementando. En un estudio de maloclusión en escolares en los municipios de Querétaro y San Juan del Río, Ortiz en 2005 concluye que la maloclusión tiene una prevalencia de 83% y de ésta, el 29% corresponde a apiñamiento dental, el 26% la Clase II de Angle, la Clase I molar con maloclusión anterior en 14%, mordida abierta 8% y el 6% de Clase III (Ortiz, 2005)

Las malposiciones dentarias, de dientes aislados o en grupo se manifiestan más frecuentemente como apiñamiento de los dientes, predominando como causa la discordancia entre el tamaño de los dientes y los maxilares, por lo que en la mayoría de los casos la falta de crecimiento de los maxilares no permite la posición armónica y/o funcional de los dientes en las arcadas. Los tratamientos ortopédicos son ideales para estimular el crecimiento maxilar y el remodelado óseo creando espacio y conduciendo la posición adecuada de los dientes, sin recurrir a la extracción dentaria. (Planas, P. 1997)

El fluido crevicular gingival es un exudado inflamatorio presente en el surco gingival que sigue un gradiente de concentración y su presencia se debe proporcionalmente al grado de inflamación y a la permeabilidad de los epitelios de unión y del surco. Su composición y naturaleza de formación fisiopatológica refleja el comportamiento de los tejidos periodontales de soporte. Por tal motivo, ha sido importante en la detección de marcadores en el diagnóstico y actividad de la enfermedad periodontal, así como el comportamiento de los tejidos periodontales en respuesta al tratamiento ortodóntico. (Schroeder, H.E & Listgarten, M.A., 1997) (Caires-Sobral de Aguiar, M., 2017)

El presente trabajo pretende cuantificar en el fluido crevicular los biomarcadores RANK-RANKL y OPG encargados del acoplamiento osteoclástico debido al efecto del tratamiento ortopédico en el remodelado óseo de los pacientes escolares, donde la aplicación de fuerzas funcionales es intermitente durante la deglución y el habla, siendo su principal cualidad el que estos aparatos actúan por presencia, sin aplicación de fuerzas, basándose en la función propioceptiva del ligamento periodontal.

El remodelado óseo inducido por el tratamiento con Ortopedia Funcional inicia con la fase de resorción ósea, la cual está controlada por la presencia de biomarcadores RANK-RANKL y OPG, siendo pertinente conocer el efecto del tratamiento en los niveles de estos biomarcadores y fortalecer la elección de este tratamiento para crear espacio para los dientes evitando la extracción indiscriminada de premolares.

II. Antecedentes.

Fluido Crevicular

El fluido gingival crevicular es un exudado inflamatorio que se presenta en el surco gingival siguiendo un gradiente osmótico con los tejidos locales. Fue descrito primero por Serres en 1817 y posteriormente por Black en 1920, pero fue hasta 1952 cuando con los trabajos de Waerhaug y posteriormente las investigaciones de Brill le atribuyeron una importancia real al fluido crevicular mediante estudios inmunoelectroforéticos (Brill, 1960). La cantidad de fluido aumenta directamente con el estímulo de la masticación de alimentos firmes o duros, con el cepillado dental, el masaje gingival, condiciones fisiológicas como la ovulación y el embarazo, la ingesta de algunas drogas y la inflamación gingival.

Las características y composición del fluido crevicular se empezaron a estudiar al considerarlo importante como indicador del estado de salud/enfermedad periodontal, debido a su capacidad para reflejar la respuesta celular en los tejidos periodontales mediante los componentes séricos y del fluido gingival. Por esto mismo, el fluido crevicular se considera un instrumento no invasivo para el diagnóstico y pronóstico de la periodontitis, basado en las características volumétricas y en los perfiles enzimáticos, proteómicos y de citocinas. El análisis proteómico del fluido crevicular ha identificado la presencia de 230 proteínas en el fluido gingival crevicular en diferentes condiciones periodontales, presentando marcadas diferencias, por lo que el conocimiento del papel que desempeñan las proteínas durante la etiopatogenia de la enfermedad periodontal puede dar origen a la determinación de biomarcadores (Orban, 1969; Silva-Borghossian, 2013; Baser, 2014; Buduneli, 2011). En 1980, Shapiro estudió las concentraciones de proteínas en el fluido del exudado gingival en casos con inflamación mínima y severa, donde los resultados de comparación entre los dos grupos no mostraron diferencias significativas. Ya que las concentraciones totales de proteínas no parecen reflejar con precisión el estado clínico de inflamación gingival, sugiere el estudio de componentes específicos de la molécula proteica (Shapiro, 1980)

En una serie de experimentos se comprobó la idea de que el fluido intersticial penetraba al surco gingival a través de su pared epitelial, demostrando que el

material marcado, fluoresceína sódica, administrado parenteral o per oralmente se podía recolectar del surco gingival y no de otros epitelios orales (Brill, 1962).

El fluido crevicular está constituido por: a) Electrolitos: sodio, potasio, calcio, fosfato y magnesio; b) Glucosa-hexosamina y ácido hexurónico; c) Proteínas: IgG, IgA, IgM, IL-1, C3, C4, albúmina, fibrinógeno (plasma). Dentro de las proteínas encontramos el grupo de enzimas como la fosfatasa ácida, beta-glucuronidasa, lisozima, catepsina D, proteasas, fosfatasa alcalina y dehidrogenasa láctica; d) Productos metabólicos y bacterianos: ácido láctico, urea, sustancias citotóxicas hidroxiprolina, endotoxinas, sulfuro de hidrógeno y e) Células: PMN, linfocitos, monocitos, epiteliales y bacterias (Cimasoni, 1983; Subbarao, 2019).

Como se mencionó anteriormente el fluido crevicular se ha estudiado desde hace muchos años como elemento de ayuda en el diagnóstico de la enfermedad gingival en estudios cuantitativos de electrolitos en fluido crevicular, observando que la concentración de sodio en fluido crevicular tiene valores similares al suero y que bajan con la inflamación. Así mismo, se reportó el incremento de los valores del potasio con la inflamación, el cual tiene niveles más altos que en el suero y su máxima concentración se presenta hacia el mediodía, así como el incremento en los niveles de calcio con la inflamación moderada. De acuerdo con Krasse y Egelberg (1962) el ratio sodio-potasio del fluido crevicular de bolsas inflamadas se incrementa hasta dos veces en relación al fluido de surcos sanos. (Mukherjee, 1983)

Cimasoni (1983) concluye en su estudio que en pacientes con periodontitis severa, los valores de sodio tienden a ser bajos, mientras que los de potasio son significativamente mayores.

Una correlación negativa y estadísticamente significativa fue encontrada entre los valores del ratio de sodio-potasio en el fluido crevicular y la profundidad media de las bolsas periodontales. El calcio contenido en el exudado crevicular no muestra correlación significativa con parámetros como el índice de cálculo, profundidad de la bolsa y porcentaje de pérdida ósea (Bang, J., 1973).

La formación del fluido crevicular gingival inicia mediante el estímulo por la presencia de macromoléculas bacterianas, ya sean toxinas (endotoxinas y amoniaco) o enzimas como hialuronidasa y colagenasa que alteran el epitelio del surco, la lámina basal y el tejido conjuntivo subyacente constituyendo un gradiente osmótico a nivel de la lámina basal. Las membranas basales de la encía humana encontradas en las uniones dento-epitelial, epitelio-tejido conjuntivo y endotelio-tejido conjuntivo, donde están adheridas de manera importante y funcionan como filtro. El epitelio de unión presenta una permeabilidad aumentada en relación a los otros epitelios gingivales debido a que sus células presentan pocos desmosomas y algunas gap junctions y que sus espacios intercelulares son más amplios. (Schroeder y Listgarten, 1997; Hashimoto, 1986).

La función de defensa del epitelio de unión se basa en su capacidad de señalización de la placa bacteriana patógena mediante la liberación de moléculas que atacan las bacterias como *Porphyromona gingivalis* y *A. actinomycetemcomitans* y sus productos y otras moléculas que estimulan la quimiotaxis de neutrófilos. (Bosshardt, 2005).

Se ha observado *in vitro* que la permeabilidad de la lámina basal del epitelio de unión y de la membrana basal del epitelio del surco se incrementa por su adelgazamiento o inclusive su perforación debido a la capacidad de las proteinasas derivadas de la placa y de la encía para degradar la colágena tipo IV, que es la proteína estructural más importante de las membranas basales. La degradación fue evaluada mediante el incremento de hidroxiprolina proveniente del sustrato insoluble y examinando el patrón peptídico del residuo por electroforesis en gel de poliacrilamida. Extractos salinos de especímenes de encía inflamada degradaron la colágena de la membrana basal en una forma soluble y productos de degradación similares a los producidos por extractos de leucocitos humanos. El fluido crevicular gingival recolectado de pacientes con Periodontitis del Adulto Severa también digirió el sustrato pero el patrón de degradación fue diferente al de las muestras de leucocitos y de extractos gingivales. El patrón se asemejaba estrechamente al producido por los extractos de placa bacteriana. Un tercer tipo de escisión se observó en la incubación de colagenasa del *Clostridium histolyticum* con colágena de membrana basal. El fluido crevicular y los extractos de encía, leucocitos y placa

bacteriana también contenían gelatinasa y elastasa con actividades de tipo enzimática que anteriormente habían mostrado potencia en la degradación de membrana basal. Se concluyó que las enzimas capaces de degradar la colágena de la membrana basal en gingivitis y enfermedad periodontal pueden originarse de la placa bacteriana y de leucocitos humanos. Consideraron que las enzimas mayormente responsables son la gelatinasa y la elastasa más que colagenasas específicas (Veli-Jukka, 1983; Veidal, 2011).

En base a estudios que sugerían que la actividad de la elastasa leucocitaria en exudados tisulares es un indicador de la enfermedad inflamatoria, se concluyó que la velocidad de flujo y la actividad de elastasa del fluido gingival parecen ser los indicadores relacionados con la inflamación pero la velocidad de flujo del fluido gingival puede ser más sensitiva en los cambios inflamatorios iniciales conduciendo a una gingivitis moderada (Darany, 1992).

Los estudios sobre la composición del fluido crevicular contribuyen a que se comprenda mejor el significado de las variaciones de sus componentes, pues las concentraciones de proteínas y enzimas son típicas de la inflamación. Los metabolitos del ácido araquidónico (PGE_2), citoquinas (interleucinas $I\beta$, $I\alpha$ e $IL6$), colagenasas, catepsinas y proteasas neutrales, β -glucuronidasa, aspartato aminotransferasa y fosfatasa alcalina son marcadores presentes en el fluido crevicular que pueden utilizarse como indicadores para un diagnóstico rápido de la actividad inflamatoria destructiva de la enfermedad periodontal (Bowers, 1989; Raed, 2014).

El mayor interés se ha enfocado en la PGE_2 , β -glucuronidasa y elastasa, marcadores de enzimas lisosomales liberadas por neutrófilos; el aspartato aminotransferasa es una enzima indicativa de necrosis celular. El análisis de los datos conduce hacia un número de conclusiones en relación al potencial diagnóstico significativo del fluido crevicular gingival: 1) una respuesta inflamatoria exuberante del hospedador está asociada con la enfermedad progresiva en pacientes con periodontitis; 2) la colección de fluido crevicular gingival usando pequeñas tiras precortadas es una técnica de colección reproducible y factible; 3) la cantidad total

de un mediador y la no concentración del mediador en la muestra de fluido crevicular gingival puede ser reportada cuando muestras cronometradas son recolectadas y 4) existencia de tecnología para pruebas base de diagnóstico del fluido crevicular gingival para realizarse en el consultorio y proveer al clínico de significados cuantitativos mejorados para evaluar al paciente y ofrecer criterios específicos para evaluar la efectividad del tratamiento (Lamster, 1997).

La naturaleza dinámica de los epitelios del surco y de unión, así como la permeabilidad de la lámina basal, permiten la salida de este exudado inflamatorio hacia el surco gingival. De acuerdo a datos hidráulicos y de coloides osmóticos, el gradiente de presión Starling favorece la filtración del intersticio gingival al espacio del surco, la cual es una condición opuesta a la observada en la encía sana, donde no hay filtración de fluido (Del Fabro, 2001).

Se ha demostrado la migración selectiva de los leucocitos polimorfonucleares a través del epitelio de unión. Esta migración de neutrófilos hacia sitios de infecciones en la mucosa se debe a la producción de citoquinas quimiotácticas dentro del epitelio y a la expresión de moléculas de adhesión. De cualquier modo, es conocido que los mecanismos involucrados en estos procesos clave se dirigen hacia el control de la placa bacteriana subgingival. En un estudio, los autores describen la expresión de células positivas de IL-8 mRNA y el establecimiento de un gradiente de receptores intercelulares de molécula de adhesión-1 (ICAM-1) dentro del epitelio de unión de la encía clínicamente sana. La expresión de ICAM-1 e IL-8 fue topográficamente asociada al área de migración de PMN, o sea, el epitelio de unión. Se incrementaron los niveles de expresión de ICAM-1 desde las células basales hacia la superficie del epitelio de unión y así hacia las áreas expuestas a los desafíos bacterianos. Las células positivas de IL-8 mRNA también se presentan en alta densidad en las capas más superficiales del epitelio de unión. La combinación de estímulo haptotáctico, resultante de la interacción de receptores integrina β 2 de PMN con el gradiente de expresión ICAM-1 y la presencia de células positivas de IL-8 mRNA consistente con el establecimiento de una discreta fuente quimiotáctica de PMN, puede jugar un importante papel fisiológico para hacer más eficiente la ruta

de los PMN hacia el surco gingival. Este proceso contribuye al mantenimiento del equilibrio local hospedador-parásito y a la limitación de PMN asociados al daño tisular (Tonetti, 1998).

En cuanto a la Periodicidad circadiana se considera que existe un aumento gradual del flujo entre las 6 a.m. y las 10 p.m. decreciendo después de esa hora. Sin embargo, existe una información relativamente limitada en relación a cuándo está sujeto el fluido crevicular gingival a la periodicidad circadiana. Sevim Günday y colaboradores (2014), estudiaron las posibles variaciones volumétricas diurnas del fluido crevicular con intervalos de cada 2 horas entre las 8:00 y las 18:00 horas, en 600 muestras de fluido crevicular gingival. No pudieron detectarse diferencias diurnas significativas en el fluido crevicular, sugiriendo que las variaciones del tiempo del día no tienen impacto en el volumen del fluido crevicular gingival y concluyen que en su metodología de muestreo no hay un aparente impacto entre la periodicidad circadiana y el fluido crevicular gingival.

En la mayoría de los estudios de análisis de los componentes del fluido crevicular obtenido mediante tiras de papel absorbente Periopaper®, se utiliza el Periotrón, que es un instrumento que cuantifica volúmenes de submicrolitros de las muestras del fluido en las tiras de papel. Se hizo una revisión sobre tres modelos de Periotrón y, en el caso del último, el Periotrón 8000 funciona bajo el principio de condensación midiendo la capacidad eléctrica de la tira de papel absorbente humedecido entre las mordazas del instrumento. El campo eléctrico creado por las cargas de oposición en las mordazas induce la polaridad de las moléculas, lo que reduce la diferencia de potencial entre las placas y aumenta la capacidad. Así, mientras mayor sea la cantidad de moléculas polares entre las placas del Periotrón, mayor es la capacidad y las puntuaciones del Periotrón. También los volúmenes desconocidos de fluidos absorbidos en las tiras de papel pueden determinarse mediante gráficos de calibración contruidos mediante cantidades de fluidos medidos con precisión. Esto se realiza mediante el software que contiene una base de datos de fluidos conocidos y un gráfico de calibración en un rango de volumen de 0-0,7 μl en incrementos de 0,1 μl trazados usando los valores de esta base de datos se puede

usar posteriormente para cuantificar volúmenes desconocidos aplicados en un papel de filtro. Las puntuaciones del Periotron se convierten en microlitros mediante el programa MLCONVRT (Ciantar y Caruana,1998).

Principios de Ortopedia Funcional

Ortopedia, etimológicamente deriva de orto y el gr. παιδεία, educación, en el sentido de corrección corporal. También el diccionario, la define como parte de la medicina que se ocupa de prevenir o corregir de forma mecánica o quirúrgica las deformaciones del cuerpo, especialmente de los huesos y los músculos. (Real Academia Española (2014). (Oceano Uno, 1994)

Las maloclusiones en México ocupan el tercer lugar de prevalencia dentro de las patologías bucodentales, constituyendo un problema de salud pública que impacta en la función y la estética, estando relacionada con factores étnicos y culturales (Mendoza,L.,2014)

Los factores de riesgo asociados a las maloclusiones son: genéticos, la alteración de espacios interproximales y pérdida dental prematura por caries impactando en el desarrollo de las denticiones primaria y permanente y hábitos perniciosos, dentro de los cuales se ha observado que la postura corporal influye en la presencia de malposiciones, y éstas a su vez, repercuten en las funciones de masticación, de la articulación témporomandibular y de la columna vertebral (Aguilar y Taboada, 2013).

Originalmente la Ortopedia Funcional de los Maxilares (OFM) formaba parte de la Ortodoncia, disciplina incluida dentro de la especialidad de Odontopediatría, sin embargo se ha constituido como especialidad debido a la variedad de nuevas tecnologías y como una opción clínica de tratamiento basada en la rehabilitación neuro-oclusal desarrollada por Pedro Planas. Por lo tanto, la Ortopedia Funcional como especialidad odontológica, previene, controla y trata las alteraciones del crecimiento y desarrollo de los maxilares, teniendo como objetivo lograr equilibrio y armonía oclusal para una eficiencia masticatoria dada por el sistema

estomatognático, conformado por 5 estructuras: los dientes y sus tejidos periodontales de soporte, músculos masticatorios y de la cabeza y cuello, maxila, mandíbula y huesos del cráneo y la cara, ligamentos y Articulación Témporomandibular y los componentes del sistema vascular nervioso y linfático. (Simões,W.,2004)^a

Cabe mencionar que dentro de la rehabilitación neuro-oclusal se considera el biotipo del paciente de manera importante para el diagnóstico y pronóstico del paciente así como la selección del tratamiento ya que, las características genéticas e inmutables del individuo determinarán diferencias en cuanto a la evolución de su padecimiento o perturbación y consecuentemente en la respuesta al tratamiento (Planas, P., 1997).

En general, esta terapéutica se fundamenta en aparatos ortopédicos funcionales que cambian la memoria muscular y mediante las inserciones de las matrices funcionales de tejidos blandos, es decir, músculos, aponeurosis, ligamentos, arterias, venas, fibras neurales, etc., inducen el remodelado óseo (Moss, 1997).

Desde hace muchos años se ha reconocido la influencia de la función de los músculos masticadores sobre la morfología y formación óseas. Se considera que el cambio en la posición ósea dentro del sistema muscular conduce a una restructuración de la distribución del estrés y la reorganización de la forma y la estructura interna. En un estudio realizado en monos se observó que la alteración crónica o continua de la posición mandibular dentro del ambiente neuromuscular, produce un remodelado condilar extenso y cambios en el tamaño mandibular. Periodos cortos de hiperactividad inducida en los músculos masetero y temporal se asociaron a síntomas de maloclusión. El exceso de actividad en el músculo temporal puede interferir con el remodelado óseo, mientras que menores niveles de actividad favorecen el remodelado óseo (Woodside y col., 1983).

El tratamiento ortopédico funcional actúa estimulando el sistema nervioso central mediante los propioceptores y terminaciones nerviosas libres del ligamento periodontal, llevando a cabo la transducción ósea, -que consiste en la

transformación de un estímulo físico-mecánico en un estímulo y respuesta biológica-basada en la generación de un proceso inflamatorio leve y continuo, estimulando los músculos masticadores: masetero, pterigoideos laterales, medios e internos modificando la posición mandibular y de la cabeza aplicando los principios de la ortopedia funcional. (Simões,W.,2004)^b

El ligamento periodontal es un tejido conjuntivo especializado que articula el diente con el hueso alveolar. Está constituido por una sustancia fundamental de proteoglucanos y glucoproteínas, un sistema de fibras colágenas tipo I,III, VII, elásticas, oxitalán y eluanina, células formativas (fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos y mesenquimatosas indiferenciadas), resortivas (cementoclastos y osteoclastos), vasos sanguíneos y linfáticos, terminaciones nerviosas libres amielínicas C y mielínicas A δ (Garant, 2003).

Las uniones gap intercelulares permiten a las células óseas realizar la transmisión intercelular de la información de la matriz funcional del periostio después de su mecanotransducción intracelular inicial. Además, las uniones gap, como sinapsis eléctricas,determinan la base de la organización del tejido óseo como una red celular conectada, por lo que todos los procesos de adaptación de hueso son multicelulares. Las características estructurales y operativas de este tipo de redes biológicas están definidas y los atributos específicos de las células óseas descritos. El hueso se sintoniza con las frecuencias de la actividad de los músculos esqueléticos. Los mecanismos intra e intercelulares de las células óseas y los procesos de mecanotransducción y la organización de hueso como una red celular biológica conectada permite la revisión de la hipótesis de matriz funcional, que establece que el efecto que causa inicialmente el estímulo de la contracción muscular determina en el hueso la respuesta del tratamiento de acuerdo al biotipo del paciente (Moss,1997).

Excitación Neural.

Los aparatos ortopédicos funcionales estimulan la excitación neural de articulaciones, mucosa, periostio, periodonto y músculos con un adecuado patrón de intensidad, tiempo y calidad para aprovechar la velocidad de conducción del

impulso nervioso. El estímulo neural de diferentes zonas del sistema estomatognático cambia la posición mandibular, la postura y el tono neuromuscular que es un elemento fundamental para el remodelado óseo. Las técnicas ortopédicas funcionales como la de W. Balters (Bionator), R. Frankel (Regulador de Función), Pedro Planas (Pistas de rodaje), H. P. Bimler (Modelador Elástico) así como W. Simões (Network's) aplican el principio de la excitación neural enfatizando el estímulo en diferentes estructuras aplicando una intensidad distinta de acuerdo a la actividad de cada región del sistema estomatognático para cambiar la posición mandibular hacia una posición terapéutica modulando la actividad muscular, la cual impacta de manera directa en el modelado óseo (Simões,W.,2004)^b

Cambio de Postura.

La postura y el movimiento dependen del sistema neuromuscular mediante reflejos, estímulos propioceptivos y mecanismos sensoriales que también regulan las funciones de masticación, respiración, deglución y fonación. La relación postural correcta presenta un espacio entre la mandíbula y la maxila de tal modo que no hay contacto dentario. Esta posición de reposo se da gracias al equilibrio muscular controlado por los músculos de apertura y cierre respondiendo a reflejos antigravitacionales y miotácticos de conducción nerviosa de aferencia y eferencia. Cuando no hay una relación postural correcta, los aparatos ortopédicos inducen a un mayor contacto incisivo causando la modificación en la postura mandibular estimulando la excitación neural. (Simões,W.,2004)^b

Cambio de Postura Terapéutico.

Está basado en la posición mandibular de reposo debido a que la sensibilidad estática aumenta y los propioceptores proporcionan mayor información al SNC. El cambio de postura terapéutico está dentro de los límites fisiológicos individuales y de acuerdo a lo publicado por Simões tiene un resultado más rápido si se logra el contacto incisivo, es decir, está dirigido al cambio de la postura mandibular mediante la obtención del contacto incisivo en Determinada Área, esto es, el contacto en el

tercio incisal palatino y vestibular entre los incisivos superiores e inferiores respectivamente. Fig. 1(Simões, 1983)



Fig. 1 El cambio de postura terapéutico puede ser horizontal y vertical. En el primero, la anatomía individual del paciente da referencias, pero en el vertical es muy importante lograr el contacto en DA, para obtener resultados más rápidos.

El cambio de postura terapéutico tiene distintas indicaciones posturales de acuerdo a Bimler, Balters y Fränkel y Planas. Las características principales del tratamiento ortopédico funcional son tres fundamentalmente: 1) que el soporte dentario de los aparatos no es indispensable y tienen retención bimaxilar, por lo que pueden estar sueltos dentro de la cavidad bucal; 2) el tratamiento precoz es más exitoso puesto que hay mejor respuesta neuromuscular y ósea mientras más joven sea el individuo y 3) disminuyen la necesidad de extracciones dentales, dependiendo naturalmente de cada caso. (Simões,W.,2004)_b

Remodelado Óseo

Normalmente, el esqueleto está en remodelación constante y cada ciclo de remodelado óseo tiene una duración entre 3 y 9 meses completándose cada 10 años. Es más activo en hueso trabecular que cortical y participan en este proceso los osteoclastos, osteoblastos y osteocitos para preservar la masa ósea. El modelado óseo se lleva a cabo durante la formación ósea y a diferencia del remodelado no presenta una fase previa de desmineralización. El ciclo de la remodelación implica una fase previa de resorción previa a la aposición ósea integrándose las unidades de formación óseas, las cuales contribuyen al mantenimiento de las propiedades mecánicas del hueso y del equilibrio mineral del

calcio y fósforo. En la formación ósea una vez depositado el osteoide, inicia la fase rápida de mineralización entre 5 y 10 días teniendo un límite máximo de 3 meses, mientras que la segunda fase mineralizante es más lenta y gradual llevando meses o hasta años. (Bala, Y.,2010)

El ciclo de remodelación ósea tiene prácticamente 2 fases: la de reabsorción, con una duración aproximada de 3 semanas y la de aposición o formación que se realiza aproximadamente de 3 a 4 meses. Ante un estímulo mecánico se estimula la respuesta de una unidad de remodelación ósea que migra hacia la superficie del hueso a una velocidad de $25\mu\text{m}/\text{día}$. El proceso de remodelado inicia con la fase de activación donde las células bordeantes se retraen y se degrada la superficie del hueso atrayendo a los preosteoclastos. Sigue la fase de reabsorción en la que los preosteoclastos fusionados dan origen a los osteoclastos que degradan la matriz ósea dejando la laguna de Howship. Posteriormente en la fase de inversión los osteoclastos se sustituyen por macrófagos que depositan la línea cementante que separa el hueso viejo del nuevo e inicia la aposición de cementoide por los osteoblastos, el cual posteriormente se mineraliza y así continúa hasta formar la unidad básica estructural u osteona constituyendo la fase de formación. En el control central y periférico del remodelado óseo hay tres vías principales: 1) la regulación neuronal que controla el Sistema Nervioso Simpático; 2) la regulación neuroendocrina hipotalámica que actúa sobre la hipófisis liberando las hormonas liberadora de gonadotropina, luteinizante, folículo estimulante, oxitocina, del crecimiento, etc. y 3) la secreción de péptidos hipotalámicos (CART y neuropéptido Y) que actúan directamente sobre el hueso (Levasseur, R., 2019)

Dentro de las características de la biología ósea normal la masa ósea máxima se presenta alrededor de los 30 años y está condicionado por factores hormonales, el ejercicio físico, aspectos nutricionales y genéticos como la raza y el género. La remodelación ósea es una función del hueso para repararlo o como respuesta a efectos mecánicos que efectúan una redistribución del mismo y participa en la aportación de calcio a la circulación, siendo este mecanismo indispensable en innumerables procesos celulares. Los osteocitos son las células reguladoras de la formación ósea por la liberación de proteínas que estimulan la mineralización y de

la resorción ósea estimulando el preosteoblasto, conduciendo a la producción, liberación y expresión de citoquinas activadoras del osteoclasto como las interleucinas 1 (IL-1) y 6 (IL-6), OPG, y ligando del receptor del activador del factor nuclear κ B (RANKL). La OPG se une a RANKL evitando su unión con RANK inhibiendo la función del osteoclasto. (Weber, T.J., 2017).

El remodelado óseo durante el movimiento dentario generado por tratamientos ortodónticos y ortopédicos requiere el acoplamiento de las fases de resorción y aposición óseas controlados por señalizadores celulares parácrinos y endócrinos fundamentalmente (Moreno, J., 2016).

La información celular del exterior es recibida por proteínas de superficie o receptores. Existe un grupo de proteínas de señalización determinadas genéticamente que interactúan con receptores específicos para estimular la respuesta celular. Estas proteínas de señalización o ligandos de receptores, activan o inhiben los receptores celulares y están tipificadas como hormonas, neurotransmisores, citoquinas y factores de crecimiento. El remodelado óseo está regulado por una serie de factores sistémicos y locales. Entre los primeros, un papel principal es interpretado por las hormonas, como la hormona paratiroidea, metabolitos de la vitamina D, los estrógenos, la calcitonina y los glucocorticoides. Entre los locales, hay varios factores de crecimiento, (factor estimulante de colonias, factor de crecimiento transformador β , factor de crecimiento derivado de plaquetas, factor de crecimiento de fibroblastos 1, proteína morfogenética ósea, y el factor de crecimiento similar a la insulina 1 de macrófagos) así como el receptor de la osteoprotegerina activador del sistema ligando B factor nuclear κ y la esclerostina, juegan una función primordial. Las fases de remodelación pueden ser evaluados por la histomorfometría estática y dinámica. Además es importante el estímulo generado por la actividad física y el estrés mecánico (Bonucci y Ballanti, 2014).

El acoplamiento celular del remodelado óseo está controlado principalmente por un balance entre la vinculación RANK-RANKL y la producción de osteoprotegerina (OPG). Entre las citoquinas que participan en el acoplamiento del remodelado óseo,

el factor RANKL es esencial para la formación, fusión, activación y supervivencia osteoclástica conduciendo a la resorción y pérdida ósea. (Vega Damaris,2007).

La OPG codificada por un gen situado en el cromosoma 8q23-24, tiene varias funciones: actúa como receptor neutralizante soluble, inhibiendo las etapas terminales de la diferenciación y supresión de los osteoclastos, induciendo a la apoptosis. También varios ligandos de OPG pueden facilitar la supervivencia, movilidad y proliferación celular. Está relacionada con diferentes áreas de la biología vascular, ósea, inmune y de tumores. (Marc Baud'huin y col, 2013).

Estudios experimentales han demostrado que RANKL es expresado por los osteoblastos y células madre de la médula ósea, mientras que el receptor RANK es expresado por los preosteoclastos y otras células de este linaje. La interacción RANK- RANKL estimula la formación y diferenciación osteoclástica mediante la activación de varios factores de transcripción que regulan la osteoclastogénesis. La osteoprotegerina es expresada por los osteoblastos y actúa como un correceptor que compete con RANKL para RANK. Esta interacción inhibe la proliferación y diferenciación osteoclástica que consecuentemente inhibe la resorción ósea. La actividad de los osteoclastos está regulada por varias citoquinas, incluyendo IL-1, 6 y 11, factores estimuladores de colonias y hormonas calciotrópicas como la hormona paratiroidea, calcitonina y la dihidroxivitamina D₃ (Vega, 2007).

El ligando del activador receptor de factor nuclear kappa B (RANKL), que es un factor crítico de diferenciación osteoclástica, está expresado en linfocitos T en la enfermedad periodontal humana, determinado por análisis inmunohistoquímicos. La interferencia con RANKL por la administración sistémica de osteoprotegerina (OPG), receptor señuelo e inhibidor de RANKL, condujo a la anulación de la resorción ósea periodontal en el modelo de rata. Este hallazgo indicó que la resorción ósea mediada por células T es dependiente del ligando RANK. En otros experimentos, tratamientos de células T de ratas transferidas con Kaliotoxina, un veneno de escorpión inhibidor de canales de calcio, deprimió la expresión de RANKL en células T, disminuyendo la inducción de la osteoclastogénesis dependiente de RANKL, y la suspensión de la resorción ósea, implicando un papel

importante en la respuesta inmune-expresión de RANKL en osteoclastogénesis y resorción ósea. En otros experimentos, la transferencia adoptiva de un antígeno específico, la expresión de RANKL en células B e infección con el antígeno de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* elevan la resorción ósea periodontal, indicando que las células B también tienen la capacidad de mediar la resorción ósea, probablemente mediante la expresión de RANKL. En humanos ha sido identificado el predominio de linfocitos T en la enfermedad periodontal y los tejidos periodontales mostraron elevadas expresiones de RANKL mRNA codificante para la expresión de OPG mRNA. Células mononucleares de lesiones periodontales incluyendo células T y B de pacientes indujeron osteoclastogénesis *in vitro*. Como se mencionó anteriormente, el remodelado óseo en los vertebrados, es el proceso que mantiene una masa ósea constante mediante el acoplamiento entre las células formadoras de hueso, los osteoblastos y las células resorptivas de hueso, los osteoclastos. Se ha sugerido que el ligando RANK está involucrado en el remodelado óseo tanto durante los movimientos ortodónticos como en la resorción ósea inflamatoria en la enfermedad periodontal. La inmunidad mediada por linfocitos T cooperadores (CD4+) es un importante brazo de adaptación de la respuesta inmune. Estas células pueden diferenciarse en dos subgrupos mayores de células efectoras T: las células cooperadoras tipo 1 responsables de la inmunidad mediada por células, y las células cooperadoras tipo 2 que ayudan para la síntesis de anticuerpos (Taubman, et al, 2005). Se ha demostrado que ambos tipos celulares están involucrados en la respuesta inmune celular hacia las bacterias en pacientes con enfermedad periodontal (Kawai, et al, 2000).

Las fuerzas de compresión y tensión aplicadas durante el tratamiento ortodóntico inducen una respuesta inflamatoria en los tejidos periodontales gingivales y de soporte, generando modificación de la matriz del tejido conjuntivo gingival y del ligamento periodontal, activando la respuesta vascular y la liberación de mediadores de la inflamación como IL 1, IL6 e IL8, prostaglandinas, citoquinas y factor de necrosis tumoral, causando remodelado del cemento radicular y hueso alveolar (Tyrovola, 2008).

El Ligamento periodontal juega un papel primordial en las rutas de señalización de transducción, que incluye la reparación y recambio del cemento, ligamento y hueso alveolar por la presencia de células formadoras que son: células mesenquimatosas indiferenciadas, fibroblastos, cementoblastos, osteoblastos, osteocitos, condrocitos y células de defensa. Dentro de las células resortivas están los cementoclastos y los osteoclastos. La tensión generada en la matriz extracelular generada por los movimientos ortodónticos causa un desplazamiento de fluidos hacia los canaliculos del hueso alveolar, vasodilatación en el ligamento, inflamación aguda e inflamación mediada por nociceptores del dolor. El desplazamiento del fluido conduce a la activación fisiológica de osteocitos, osteoblastos, células de revestimiento óseo, células Osteoprogenitoras y fibroblastos. Los nociceptores de dolor estimulan las neuronas del ligamento y secretan neurotransmisores como la sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina (Wise, 2008 Henneman. S, 2008)

Estos neurotransmisores conjuntamente con la Prostaglandina E2 y otros factores humorales causan vasodilatación en el ligamento, lo que conduce a un incremento en la migración de células inmunes competentes por factores quimiotácticos como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) producido por células endoteliales y osteoblastos, el cual es esencial en la angiogénesis y el desarrollo óseo. El remodelado de la matriz extracelular es seguido por la reorganización citoesqueletal en osteoblastos, fosforilación de proteínas celulares como quinasas reguladas por señalización (ERK). Esto dispara la señal de transducción vía integrinas/fibronectina/kinasa. La comunicación intercelular ocurre mediante proteínas gap junction. En el lado de presión se incrementan algunas metaloproteinasas como la 3, 9, 13,1,8, generando un remodelado de colágena. La PGE 2, COX 2 y m RNA también se sobrerregulan. El factor estimulador de colonias de macrófagos M-CSF, producido por los osteoblastos regulan la diferenciación de pre osteoclastos en osteoclastos. La interacción de fuerzas de presión y tensión ortodónticas desencadenan la actividad biológica de los elementos estructurales de los tejidos periodontales, de tal modo que en el remodelado óseo intervienen citoquinas, factores de crecimiento, factores de transducción, metaloproteinasas, P2 X4, células óseas, fibroblastos, monocitos macrófagos, óxido nítrico, membranas

fosfolíplicas, y quimioquinas. Desde la perspectiva celular, todos los elementos antes mencionados, se enfocan en el acoplamiento de osteoblastos y osteoclastos para el remodelado óseo. La diferenciación y funciones de los osteoclastos está derivada del RANKL producido por los osteoblastos (Nayak, et al, 2013).

Yamaguchi en su estudio donde observó tejido periodontal sujeto a fuerzas ortodónticas concluyó que el sistema RANK/RANKL/OPG juegan un papel importante en el movimiento dentario ortodóntico debido a su participación en la formación fisiológica osteoclástica (Yamaguchi, 2009). También concluyó que el radio de presencia de RANK/OPG en fluido crevicular disminuye con la edad explicando el porqué el movimiento dental con los tratamientos de ortodoncia es menor en adultos (Kawasaki, 2006).

Los osteocitos mantienen la integridad estructural ósea y son células que juegan un importante papel en el modelado y remodelado óseo en el proceso de transducción ósea, el cual se inicia al percibir estímulos tensionales físicos y responden liberando mediadores químicos como prostaglandinas, óxido nítrico y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Buckwalter, 1987; De Baat, 2005).

Como se mencionó anteriormente, el movimiento dental desencadena una respuesta inflamatoria que también está regulada por fibras del sistema nervioso simpático. Actualmente se considera que los sistemas nervioso e inmune no son entidades independientes una de la otra, y, hay evidencia de que el sistema nervioso central no solo recibe mensajes del sistema inmune sino que también modula la función inmune (Elenkov, 2000).

Los nervios simpáticos posganglionares se unen al nervio trigémino a nivel del ganglio e inervan los dientes y las estructuras periodontales de soporte mediante las ramas maxilar y mandibular del trigémino. La noradrenalina (NA) es el neurotransmisor clásico en los nervios simpáticos perivasculares y su síntesis se debe al efecto de la tirosina hidrosilasa que convierte la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), y ésta como dopamina, se transforma en noradrenalina por efecto de la enzima dopamina- β hidroxilasa (DBH). El otro

mediador de las terminales nerviosas simpáticas es el Neuropeptido Y (NY), el cual es un neurotransmisor y neuromodulador del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico. El efecto de los nervios simpáticos está mediado por receptores adrenérgicos, que son miembros de los receptores acoplados de dominio transmembrana de la proteína G. Tanto la noradrenalina como el neuropeptido Y comparten efecto vasoconstrictor, son factores angiogénicos potentes, comparables con los factores de crecimiento fibroblástico y endotelial vascular. (Pons, et al, 2008).

Los osteoclastos son únicos en cuanto a su capacidad de resorción ósea; la alteración de la diferenciación o función osteoclástica conduce a la pérdida de cavidades de médula ósea, una condición conocida con el término de osteopetrosis (Miyamoto, 2013).

La actividad osteoclástica es sobrerregulada después de una inyección seriada de factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF) que estimula la movilización hacia la periferia de las células madre hematopoyéticas periféricas. También fue reportado que los osteoclastos están involucrados en la regulación de nichos de Células madre hematopoyéticas (HSC) en la médula ósea (Miyamoto, 2013).

Durante la aplicación de fuerza mecánica, se liberan citoquinas producidas por las células Th1 como el factor de crecimiento de colonias de macrófagos (M-CGF), receptor activador del ligando del factor nuclear $\kappa\beta$ (RANKL), factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$), (TNFR1) Y (TNFR2) inducen la osteoclastogénesis, mientras que las IL-12, IL-18 e $INF\gamma$ tienen un efecto inhibitorio (Kitaura, H., 2014).

En el ligamento periodontal las fuerzas de compresión y tensión generan variaciones en la expresión de OPG por la vía de micro RNA 3198 (miR-3198), de tal modo que en la zona de presión se incrementa la presencia de miR-3198 que reduce la expresión de OPG permitiendo así la osteoclastogénesis estimulada por RANKL. En la zona opuesta, la tensión reduce niveles de miR-3198 sobrerregulando OPG (Kanzaki et al., 2019).

BIOMARCADORES

El término de “biomarcador” o marcador biológico, empezó a utilizarse en las ciencias biológicas a partir de la década de 1960, pero fue establecido formalmente en el año de 1987 por el Consejo Nacional de Investigación de los Estados Unidos (National Research Council, NRC) a través del Comité de Marcadores Biológicos. Esta definición considera como biomarcador a un evento (de estado conocido) que puede usarse como guía para la evaluación de sistemas biológicos. Es decir, una característica de señalización, en muestras o sistemas biológicos que pueda ser medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos normales o patogénicos (Schlenk, 1999).

Con el avance de la ciencia y la tecnología, el desarrollo de los instrumentos médicos y la identificación de los indicadores diagnósticos se han hecho más sofisticados y sensibles. Gracias al conocimiento de la genómica humana, se puede considerar que los nuevos biomarcadores se determinarán por el análisis de macromoléculas orgánicas como proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y carbohidratos que no solamente sean útiles en el diagnóstico de enfermedades, sino que también ayuden a identificar la susceptibilidad de los individuos a algunos padecimientos y su posible respuesta ante algunos procedimientos terapéuticos, conformando lo que actualmente se conoce como Medicina y Cirugía Genómica Personalizada, en base a los resultados genómicos obtenidos de cada uno de ellos (García, 2013).

Naturalmente, en la actualidad, el uso de biomarcadores en la práctica de la Medicina Genómica Personalizada tiene limitaciones importantes pues exige la realización de los análisis del genoma del paciente, cuyo costo es elevado; también la identificación de blancos proteómicos o genómicos (biomarcadores) de susceptibilidad o resistencia para que puedan utilizarse clínicamente y que desafortunadamente se conocen muy pocos; diseño y evaluación de métodos de identificación de biomarcadores avalados y aprobados por instituciones de salud; desarrollo de fármacos y terapias eficientes que tengan efecto sobre los blancos terapéuticos (Brunicardi, 2011).

Se han realizado estudios en saliva y fluido crevicular para detectar la presencia de los biomarcadores clave que determinan el remodelado óseo resultante de los movimientos dentarios ortodónticos. Sin embargo, la mayor atracción del fluido crevicular como un marcador diagnóstico es la naturaleza específica del sitio de la muestra. Este hecho conduce a investigaciones en laboratorio de los ingredientes del fluido crevicular gingival para ser ligados a las valoraciones clínicas en el sitio de colección de la muestra (Flórez-Moreno, et al. 2013; Nishijima, et al 2006).

El Factor Estimulador de Colonias de Macrófagos (M-CSF) y el receptor activador del ligando kappa B factor nuclear son citoquinas que juegan un papel crucial induciendo osteoclastogénesis. La pérdida de M-CSF, RANKL y c-FOS, un factor de transcripción requerido para la osteoclastogénesis, vía mutación o disparador genético en modelos animales, empareja la osteoclastogénesis y la formación de cavidades de la médula ósea y el fenotipo osteopetrótico (Bakiri, 2011).

En contraste, la Osteoprotegerina (OPG), un señuelo del receptor RANKL, que inhibe la osteoclastogénesis es una proteína esencial en el recambio óseo. Sin embargo, hay otros ligandos de osteoprotegerina que tienen varias funciones biológicas. La osteoprotegerina puede promover la supervivencia celular, la proliferación celular y facilita la migración mediante la unión al Factor de Necrosis Tumoral ligado a apoptosis, induciendo al ligando TRAIL, glucosaminoglucanos o proteoglucanos. Una gran cantidad de estudios in vitro, preclínicos y clínicos, proveen evidencias de que OPG está involucrada en la biología vascular, ósea, inmunológica y tumoral (Baud'huin, et al, 2013).

III. Hipótesis.

Las hipótesis de trabajo para el análisis de los biomarcadores de la resorción y remodelado óseo RANKL y OPG fueron:

- H_0 : La presencia de marcadores RANKL Y OPG manifiestan diferencia en fluido crevicular durante el tratamiento ortopédico funcional.
- H_A : La presencia de marcadores RANKL Y OPG no manifiestan diferencia en fluido crevicular durante el tratamiento ortopédico funcional.

IV. Objetivos.

Objetivo General.

Cuantificar el cambio de biomarcadores del remodelado óseo en fluido crevicular en pacientes con tratamiento ortopédico funcional.

Objetivos Específicos.

- 1.- Evaluar la salud periodontal de los pacientes mediante sondeo.
- 2.- Registrar cantidad de RANK- RANKL (ligando activador del receptor del factor nuclear kappa B en fluido crevicular a las 0, 24, 168 horas (7 días) y 28 días de activar el aparato.
- 3.- Registrar cantidad de OPG (osteoprogesterina) en fluido crevicular, a las 0, 24, 168 horas (7 días) y 28 días de activar el aparato.

V. Metodología.

Tabla1 Definición de Variables y Unidades de medida.

VARIABLE	Definición conceptual y operacional	Tipo y escala de variable	Unidad de medida	Operacionalización
Tiempo de uso del aparato	Periodo de presencia del aparato en la boca	Cuantitativa Categoría	16 horas por día	Categorías
RANK-RANKL	Citoquina y su ligando que inducen la diferenciación y activación osteoclástica	Cuantitativa	pmol/ml	Picomol es una medida de cantidad de sustancia. Equivale a 10 ⁻¹² moles. El mililitro es submúltiplo del litro. Medida de capacidad.
OPG	Citoquina inhibidora de diferenciación y activación osteoclástica	Dependiente	pmol/ml	Picomol es una medida de cantidad de sustancia. Equivale a 10 ⁻¹² moles. El mililitro es submúltiplo del litro. Medida de capacidad.
EDAD	Tiempo de vida transcurrido a partir del nacimiento	Independiente Cuantitativa Discreta	años	Un año consta de 365 días
GÉNERO	Condición sexual establecida genéticamente	Independiente Cualitativa Nominal	Masculino Femenino	

Prueba Piloto.

Se realizó prueba piloto con 2 pacientes voluntarios.

Se pesaron las tiras de papel absorbente Periopaper® antes y después de introducirlo en el surco gingival mesial de los caninos superiores e inferiores durante 1 minuto.

0 horas	Peso inicial	Promedio	Peso final	Promedio
1	0.028g		0.031g	
2	0.027g		0.030g	
24 horas	Peso inicial	Promedio	Peso final	Promedio
1	0.029/0.027/0.035	0.030g	0.035/0.032/0.033	0.033g
2	0.035/0.021/0.026	0.027g	0.029/0.034/0.039	0.034g
168 horas	Peso inicial	Promedio	Peso final	Promedio
1	0.027/0.029/0.030	0.028g	0.034/0.033/0.034	0.033g
2	0.025/0.028/0.027	0.026g	0.032/0.029/0.025	0.028g
30 días	Peso inicial	Promedio	Peso final	Promedio
1	0.029/0.026/0.030	0.028g	0.033/0.030/0.038	0.033g
2	0.031/0.028/0.030	0.029g	0.031/0.029/0.036	0.032g

Tabla 2. Muestras de la Prueba Piloto.

Los resultados de la prueba piloto no mostraron valores mínimos de absorvancia detectados por Elisa.

Tamaño de muestra.

Se inició el estudio con 10 pacientes voluntarios de los cuales 2 se excluyeron por padecer migraña y 1 por no presentar salud periodontal. Se eliminó un paciente que no acudió a las citas de toma de muestras.

- Muestra: 6 pacientes
- Descripción de las condiciones experimentales.

Medición y Análisis.

Previa autorización por parte de la autoridad de la Facultad de Medicina y del Comité de Bioética, en el laboratorio de Investigación de la FMUAQ se realizó la toma de muestras y se recolectó la información.

Se realizó Historia Clínica a los alumnos participantes y se les entregó el consentimiento informado donde se explica en qué consiste el estudio, la recolección de los resultados y el compromiso de confidencialidad del proceso.

A los participantes se les realizó profilaxis, pulido dental y evaluación periodontal para incluir únicamente los pacientes con buena salud periodontal y salud general. Se dieron instrucciones sobre la técnica de cepillado Stillman Modificada y del uso del hilo dental para la remoción adecuada de placa dentobacteriana.

Una vez seleccionados los participantes se les tomaron impresiones totales con alginato de fraguado rápido para elaborar los aparatos ortopédicos con pistas planas para iniciar el estudio.

La primera muestra se tomó antes de colocar el aparato y las siguientes a las 24 horas, 168 horas (7 días) y 30 días de activar el aparato, tanto para identificar niveles de RANK-RANKL como de OPG.

Muestreo del fluido crevicular gingival.

Las muestras fueron obtenidas de las caras mesiales de los caninos superiores e inferiores. Los criterios de selección de los sitios de la muestra son:

- 1) Profundidad de sondeo $\leq 2\text{mm}$
- 2) Nivel de adherencia clínica $\leq 1\text{mm}$
- 3) Ausencia de sangrado al sondeo.

Las tiras de papel filtro Periopaper® se pesaron en la báscula de precisión antes y después de ser introducidas en el surco gingival. Las superficies dentarias de los caninos fueron secadas y aisladas con rollos de algodón. Las tiras de Periopaper® se introdujeron gentilmente en el surco durante 2 minutos. Este procedimiento se realizó con cuidado para evitar trauma mecánico, ya que las tiras de papel contaminadas con sangre se descartaron.

Se utilizó el Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzimas TNFSF11 humano (Elisa) kit (RANKL) (ab213841) diseñado para la medición cuantitativa del TNFSF11 humano de cultivos celulares sobrenadantes, lisados celulares, tejidos Homogenados, suero y plasma (heparina, EDTA).

Flujograma de actividades

Se prepararon todos los reactivos, muestras y estándares según las instrucciones del fabricante.



Se agregaron 100 μ l de estándar o muestra a los pozos apropiados y se incubó a 37 ° C durante 90 minutos.



Se deshechó el contenido de la placa sin lavar los pozos. Se añadieron 100 μ L de anticuerpo biotinilado en todos los pozos y se incubó a 37 ° C durante 60 minutos.



Se lavó cada pocillo tres veces con 300 μ L 0.01M PBS (o TBS)



Se agregaron 100 μ L de solución de trabajo ABC. Incubar a 37 ° C durante 30 minutos.



Se lavó cada pocillo cinco veces con 300 μ L 0.01M PBS (o TBS). Se agregaron 90 μ L de agente de revelado de color TMB preparado. Se incubaron a 37 ° C en oscuridad durante 15-20 minutos.



Se agregaron 100 μ L de solución de parada TMB y se leyó la densidad óptica (OD) a 450 nm dentro de 30 minutos

- Microplaca 450nm
- Pipetas p/ 100 μ l y 300 μ l; tubos
- Buffer PBS o TBS 8.5g cloruro de sodio 1000 μ l H₂O destilada
 1.4g Na₂HPO₄
 0.2g NaH₂PO₄ pH 7.2-7.6

Tabla 3.

Día 0

Paciente	Peso inicial	Peso final
1	0.037/0.032/0.028	0.031/0.029/0.032
2	0.028/0.025/0.029	0.045/0.039/0.038
3	0.023/0.026/0.031	0.021/0.027/0.048
4	0.025/0.028/0.031	0.036/0.029/0.028
5	0.029/0.027/0.030	0.032/0.054/0.030
6	0.024/0.021/0.027	0.030/0.034/0.028

Tabla 4

Día 1

Paciente	Peso inicial	Peso final
1	0.031/0.026/0.026	0.032/0.030/0.029
2	0.033/0.024/0.025	0.037/0.037/0.037
3	0.032/0.033/0.032	0.028/0.041/0.040
4	0.029/0.028/0.028	0.040/0.034/0.030
5	0.032/0.030/0.030	0.030/0.032/0.034
6	0.029/0.023/0.028	0.037/0.039/0.034

Tabla 5

Día 7

Paciente	Peso inicial	Peso final
1	0.030	0.027/0.032/0.032
2	0.025/0.031/0.031	0.040/0.040/0.034
3	0.036/0.025/0.029	0.028/0.043/0.035
4	0.036/0.034/0.029	0.031/0.033/0.031
5	0.024/0.026/0.030	0.039/0.036/0.027
6	0.025/0.026/	0.032/0.028/0.030

Tabla 6

Día 30

Paciente	Peso inicial	Peso final
1	0.028/0.029/0.027	0.031/0.028/0.030
2	0.025/	0.038/
3	0.031/	0.037/0.037
4	0.028/0.024/0.027	0.035/0.035/0.035
5	0.029/0.029/0.025	0.029/0.033/0.035
6	0.026	0.030/0.032/0.028

Después de 1 minuto se colocaron en 250 µl del buffer de dilución y se guardaron a 4°C

Preparación de reactivos.

1.- Separar 17 pozos de la placa.

2.- Sacar un std 10 ng



1 ml disolvente de la muestra

10 minutos TA mezclar

10,000 pg/ml

3.- anti RANKL biotinado

100 µl/pozo X 18 = 1,800 µl

1:100

2ml



20 µl

1,980 µl buffer dilución de anticuerpos

2ml

4.- ABC 100 µl/pozo

2ml



20 µl

1,980 µl buffer de dilución a

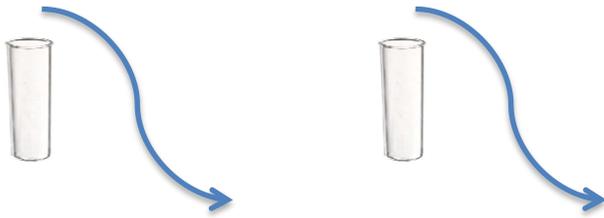
2ml

5.- Estándares

1	2	3	4	5	6
2,500pg	1250pg	625pg	312.5pg	156.25pg	78.125pg

10,000pg/ml

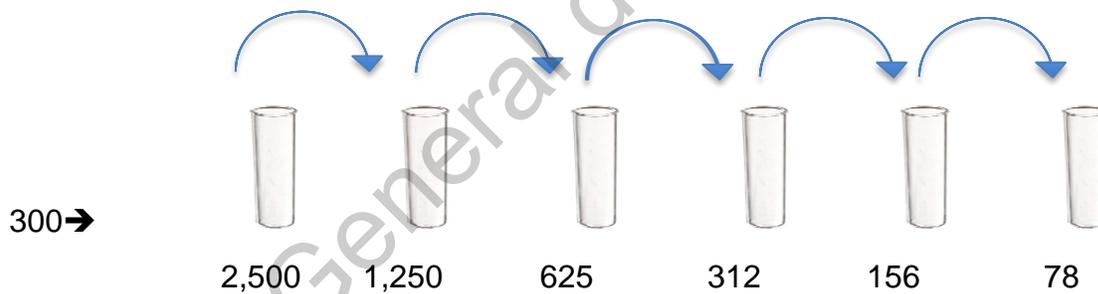
5,000pg/ml



Se tomaron 500 µl + 500 µl buffer

300

+300 µl



300 →

2,500

1,250

625

312

156

78

Se colocaron 300µl de buffer en cada uno.

Rank-L

PBS O TBS

azul amarillo

HRP / TMP

PEROXIDASAS AUDIN-BIOTIN- PEROXIDASE

ab ab biotilado



+



muestra

ab_

RANK-L ab

- 1) PREPARAR REACTIVOS, MUESTRAS, STOL
- 2) 100 ml STOL O MUESTRA.
- 3) INCUBAR 37°C 90 MIN.
- 4) DESECAR EL CONTENIDO. NO LAVAR
- 5) AGREGAR 100 ml ab BIOTINADO
- 6) 37°C 60 MIN. / PRECALENTAR EL ABC. $96(300\text{ml})(3)=864\text{ml}$
- 7) LAVAR 3 VECES C/300ml 00/M PBS O TBS
- 8) 100 ml, ABC INCUBAR 37°C 30 min. /precalentar el TMB
- 9) LAVAR CADA POZO C/ 300 ml PBS $96(300\text{ml}) = 28.8 \text{ ml}$ 100ml
- 10) 90ml TMB INCUBAR 37°C 15-20 MIN EN LA OBSCURIDAD 3-3:30 LEER
- 11) 100 ml TMB STOP SOLUTION

LEER 450 nm dentro de los 30 min.

1 bco 0 H martes (2) = 8 muestras

8 sld 1 H + 1 bco

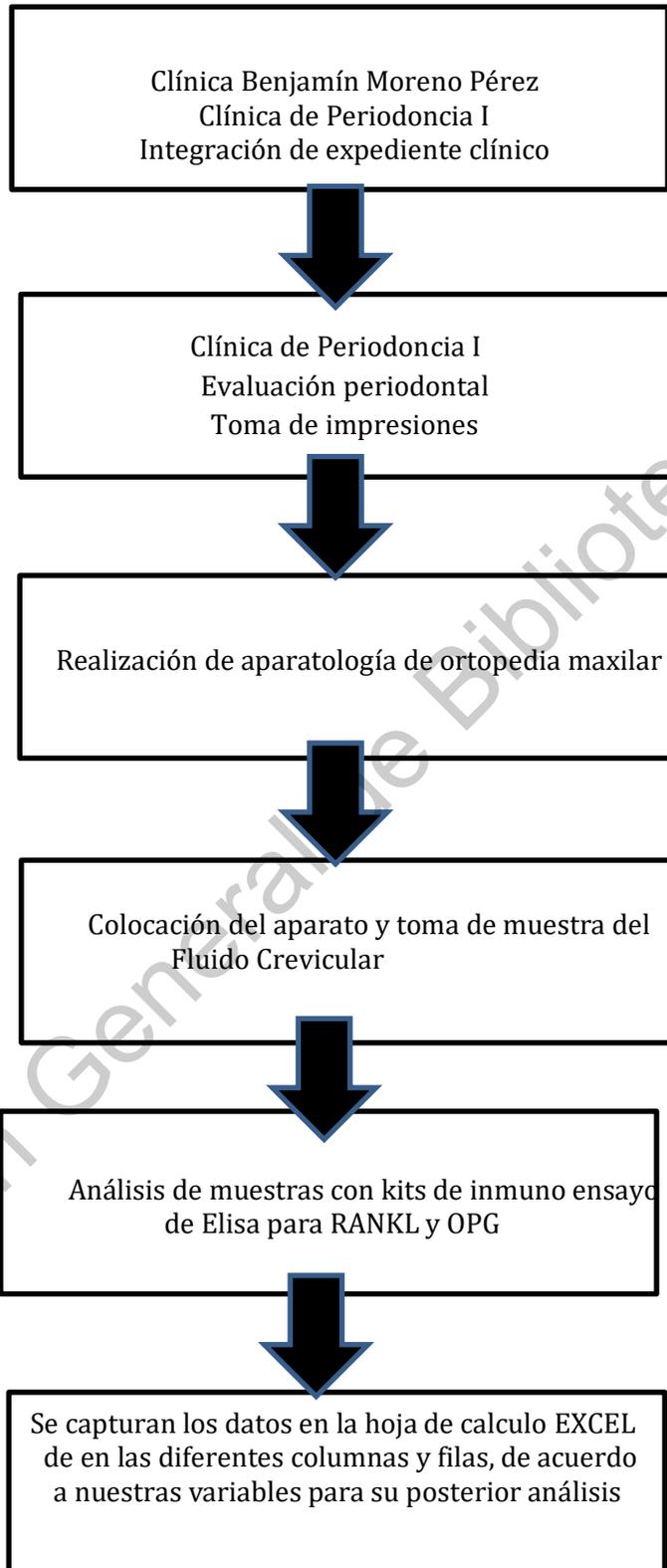
24 H miércoles 8 stol

48 H jueves 17

72 h viernes.

Toda la información se registró en hoja de recolección para niveles de RANKL .

Cronograma de actividades



INDICE

VI. Resultados

Una vez realizada la recolección de las muestras y realizar el análisis de Elisa no se observaron cambios de color en los pozos de las muestras. El color amarillo indicaría la presencia de RANKL.

Las cantidades de fluido crevicular recolectado con las tiras de papel Periopaper® se reflejan comparando el peso inicial y peso final de cada muestra en las tomas de los días 0,1,7 y 30. Tablas 3,4,5 y 6 respectivamente.

Lecturas

Tabla 7. Lecturas

	1	2	1	2
A	bco	1to	A bco 0.052	0.067 1T0
B	St 1	2to	B std1 4.172	0.062 2T0
C	Std2	1T24	C std2 2.801	0.065 1T 24h
D	Std3	2T24	D std3 1.604	0.072 2T 24h
E	4	1T168	E std4 0.925	0.061 1T 168h
F	5	2T168	F std5 0.537	0.061 2T 168h
G	6	1T30	G std6 0.351	0.064 1T 30días
H	7	2T30	H std7 0.162	0.065 2T 30días

Las coordenadas A-H de la columna 1 de la placa de ELISA indican la muestra blanco (A1) y los estándares incluidos en el kit de RANK(B1-H1). Las concentraciones obtenidas en esta curva indican el rango de concentración que puede detectar el ELISA utilizado, sin embargo las muestras analizadas (columna 2 A-H) no presentaron absorbancias que se encuentren dentro de la curva estándar. Es decir, el valor de absorbancia mínimo que el ELISA puede detectar es de 0.162 y las muestras analizadas presentaron absorbancias entre 0.061 y 0.072 similares a las absorbancias obtenidas en la muestra blanco, por lo tanto no nos es posible cuantificar la cantidad de RANK en las muestras mediante esta técnica.

Las evidencias de los resultados del presente estudio sostienen la casi nula presencia de biomarcadores de la resorción ósea durante el tratamiento ortopédico funcional.

En base a los resultados obtenidos se rechaza la Hipótesis nula.

Discusión.

En el presente estudio, se pretendió valorar la presencia en fluido crevicular gingival de las citoquinas RANK-L y OPG relacionadas con la activación y supresión de la actividad osteoclástica durante el remodelado óseo posteriormente a la colocación de Aparatología Ortopédica Funcional.

Numerosas publicaciones en investigación muestran el análisis del fluido crevicular gingival como indicador de cambios en el tejido conjuntivo periodontal tanto en casos de la Enfermedad Periodontal Inflamatoria asociada al biofilm (Silva-Boghossian y col.,2013), (Raed AlRowis, 2014), (Shuo Yang, 2019); en estudios dirigidos en la búsqueda de marcadores de la inflamación como metaloproteinasas principalmente MMP8 (Almehmadi,2018) , MMP 9 (Shuo Yang, 2019) y citoquinas proinflamatorias para diagnóstico predictivo (Stuti Gupta y col.,2018); en pacientes con condiciones sistémicas hormonales y enfermedad periodontal (Pinar Gümüş y col., 2013) (Sorapan Smuthkochorn y col., 2017) así como el reflejo de la respuesta de los tejidos peridontales de soporte ante los estímulos mecánicos de presión y tensión generados durante los tratamientos de ortodoncia. (Yimei Zhang y col., 2016) (Andrade; Taddei y Souza, 2012) (Cristiane Canavarro y col., 2012) (Livia Nunes, 2017)

Ante la falta de reportes sobre la presencia del sistema clave del remodelado óseo, RANK-L/OPG en fluido crevicular como respuesta al tratamiento de Ortopedia Funcional, se consideraron los estudios de tratamientos de Ortodoncia como reflejo de la presencia de las citoquinas del remodelado óseo ante las fuerzas de presión

y tensión generadas en el ligamento periodontal durante los tratamientos ortodónticos. (Nishijima,2006), (Kapoor y col., 2014).

La metodología de este trabajo para identificar la presencia de las citoquinas RANKL/OPG del remodelado óseo como respuesta a tratamiento ortopédico funcional está basado en el análisis del fluido crevicular con reactivos de ELISA. El fluido crevicular gingival, es un exudado inflamatorio presente en el surco gingival ante diferencias de gradientes de concentración y se considera con sensibilidad aceptable para la identificación de diversos biomarcadores que reflejan estados inflamatorios ante situaciones sistémicas de crecimiento, de enfermedad o incluso de respuesta a tratamientos que estimulan los tejidos periodontales. (Caires Sobral de Aguiar Mariana y col., 2017).

VII. Conclusiones.

Existen numerosas publicaciones que evidencian la presencia de las citoquinas RANKL-OPG biomarcadores del remodelado óseo en fluido crevicular como respuesta a la aplicación de fuerzas ortodónticas, sin embargo, para el presente estudio no se encontraron antecedentes de estos biomarcadores en fluido crevicular como respuesta al tratamiento ortopédico funcional.

El tratamiento de Ortopedia Funcional se considera mínimamente invasivo debido a que se colocan en los pacientes aparatos removibles mucodentosoportados y actúan por presencia, de tal modo que la activación de los aparatos ejerce una presión muy leve sobre los dientes, la cual es percibida por el ligamento periodontal iniciando así principalmente una respuesta inflamatoria leve y la transducción hacia los tejidos periodontales de soporte teniendo como consecuencia la estimulación de la circulación periodontal y la liberación de citoquinas y mediadores bioquímicos del movimiento dentario como los neuropéptidos (primeros mensajeros) y calcio, AMPc y GMPc (segundos mensajeros).

Este estudio pretendió identificar la presencia de las citoquinas RANKL y OPG, que constituyen la unidad reguladora del remodelado óseo, en fluido crevicular gingival

como respuesta al tratamiento ortopédico funcional. Se utilizó para la identificación de las citoquinas el kit de ELISA (RANKL) (ab213841) diseñado para la medición cuantitativa del TNFSF11 humano. No se observó cambio de color amarillo para identificar la presencia de RANKL, a pesar que clínicamente los voluntarios mencionaron sentir la presencia de dolor leve después de activar el aparato y percibieron cambio en la posición de algún diente. El tratamiento ortopédico funcional al considerarse mínimamente invasivo libera bajas expresiones de citoquinas estimuladoras de la resorción ósea, la cual se realiza de manera muy conservadora. Para estudios posteriores, sería recomendable tomar las muestras de fluido crevicular del surco del diente que haya modificado su posición de manera notable.

La no evidencia de la presencia de estos biomarcadores del remodelado óseo en las muestras recolectadas de fluido crevicular puede deberse a la corta duración del estudio, el cual fue de 1 mes para observar el comportamiento de las citoquinas ante un ciclo del tratamiento y también a la baja concentración de estas citoquinas ante un proceso inflamatorio leve. Es valioso considerar el uso del Periotrón 8000 que es el instrumento especial para la detección de concentraciones de las citoquinas de interés en volúmenes de décimas de μl .

En relación a la sensibilidad biológica de la prueba es $<10\text{pg/ml}$. El rango es 78pg/ml - 5000pg/ml por lo que la probable baja presencia de biomarcadores en la respuesta inflamatoria de este tratamiento mínimamente invasivo no permitió que se detectaran en este estudio. Otro punto importante es que por la naturaleza del propio estudio, al no poder controlar totalmente las variables en cuanto al tiempo de duración del aparato en boca por parte de los voluntarios esto constituye un sesgo importante en cuanto a la efectividad del aparato. Esta situación se refleja también clínicamente en pacientes con tratamientos de ortopedia funcional donde el resultado depende en gran medida de la colaboración del paciente usando sus aparatos por lo menos 16 horas al día incluyendo la noche. La edad de los voluntarios no representa un problema importante, aunque el hueso en los jóvenes

no es tan plástico como en los niños en la etapa del recambio de denticiones, como el tiempo de uso del aparato en boca.

No obstante, la falta de evidencia de los biomarcadores del remodelado óseo en fluido crevicular como respuesta al tratamiento ortopédico funcional, este es un estudio que puede establecer las bases de otras investigaciones similares durante más tiempo de duración pretendiendo estimular una respuesta inflamatoria más duradera y sostenida considerando cubrir el periodo sigma óseo.

Ante la falta de valores de absorvancia mínima que ELISA pueda detectar y siendo imposible cuantificar la cantidad de RANK en este estudio, por causas técnicas y ante la necesidad de equipo computarizado especializado (Periotrón) los reactivos para OPG no se emplearon, por lo que se utilizarán en estudios futuros.

INDICE

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguilar, N. Taboada, O.A. (2013). Frecuencia de maloclusiones y su asociación con problemas de postura corporal en una población escolar del Estado de México. *Bol Med Hosp Infant Mex*, 70(5), 364-371.

Almehmadi H., Faisal Alghamdi (2018) Biomarkers of alveolar bone resorption in gingival crevicular fluid: A systematic review. *Archives of Oral Biology* 93: 12–21.

Andrade, I. Jr, Silvana R. A. Taddei, Souza, PEA. (2012). Inflammation and Tooth Movement: The Role of Cytokines, Chemokines and Growth Factors. *Seminars in Orthodontics*, 18 N° 4, 257-269.

Bakiri L, Reschke MO., y col. (2011). Functions of Fos phosphorylation in bone homeostasis, cytokine response and tumourigenesis. *Oncogene*. Vol. 31;30 (13):1506-1517.

Bala, Yohann.,Farlay, Delphine., Delmas, Pierre D.,Meunier, Pierre J.,Boivin, George (2010). Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes. *Bone*, 46 N° 4, 1204-1212.

Bang J., Cimasoni G., Rosenbusch Ch., Duckert A. (1973). Sodium, Potassium and Calcium Contents of Crevicular Exudate: Their Relations to Gingivitis and Periodontitis. *J. Periodontol*, vol 44 Num 12, 770-774.

Baser U, Oztekin G, Ademoglu E, Isik G, Yalcin F. (2014). Is the severity of periodontitis related to gingival crevicular fluid and serum high-sensitivity C-reactive protein concentrations? *Clin Lab*. 60(10):1653-8. PubMed PMID:25651710.

Baud'huin M, et al. (2013). Osteoprotegerin: multiple partners for multiple functions. *Cytokine Growth Factor Rev*. Vol. 24(5): 401-409.

Bonucci E., Ballanti P. (2014). Osteoporosis, Bone Remodeling and Animal Models. *Toxicol Pathol*, Vol. 42:, 957-969.

Bosshardt D.D., Lang N.P. (2005). The Junctional Epithelium: from Health to Disease. *J Dent Res* , 84, 9-20. Veli-Jukka U. (1983). Degradation of Basement Membrane Collagen by Proteinases From Human Gingiva, Leukocytes and Bacterial Plaque. *Journal of Periodontology*, 54, 740-745.

Bowers M. R. Fisher L. W., f John D. (1989). Connective Tissue-Associated Proteins in Crevicular Fluid: Potential Markers for Periodontal Diseases. *Journal of Periodontology*, Vol. 60, No. 8, 448-451.

- Brill, N., Bronnestam, R. (1960). Immunoelectrophoretic Study of Tissue Fluid from Gingival Pockets. *Acta Odont. Scand*,
- Brill, N. (1962). The Gingival Pocket Fluid. Studies of Its Occurrence, Composition, and Effect. *Acta Odont. Scand.*, 20, 32.
- Brunicardi, FC. (2011). Overview of the development of personalized genomic medicine and surgery. *World Journal of Surgery*. Vol. 35 (8): 1693-1699.
- Buckwalter JA, Cooper RR. (1987). Bone structure and function. *Instr Course Lect*, Vol. 36, (27-48).
- Buduneli N., Kinane D. (2011). Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J Clin Periodontol*, 38 (Suppl. 11), 85-105.
- Caires Sobral de Aguiar, M. et al.. (2017). The Gingival Crevicular Fluid as a Source of Biomarkers to Enhance Efficiency of Orthodontic and Functional Treatment of Growing Patients. Hindawi, 2017, 1-7.
- Canavarro, C., Palmier Teles, R., Capelli Jr J... (2012). Matrix metalloproteinases – 1, -2, -3, -7, -8, -12, and -13 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a longitudinal randomized split-mouth study. *European Journal of Orthodontics*, 10, 1-7. September, 2012, De <http://ejo.oxfordjournals.org> Base de datos.
- Ciantar, M., Caruana, D.J.. (1988). Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *Journal of Periodontal Res*, 33, 259-264.
- Cimasoni G. Crevicular fluid updated. *Monogr Oral Sci*. 1983;12:III-VII, 1-152. PubMed PMID: 6348520.
- Darany, D., Beck M., Walters J. D. (1992). The Relationship of Gingival Fluid Leukocyte Elastase Activity to Gingival Fluid Flow Rate . *Journal of Periodontology*, Vol. 63, No. 9, 743-747.
- De Baat P, Heijboer MP, de Baat C. . (2005). Development, physiology, and cell activity of bone. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. Vol. 112(7):258-263.
- Del Fabro M., Fancetti L., Bulfamante G., Cribiù M., Misericocchi G., Weinstein R. L. (2001). Fluid Dynamics of Gingival Tissues in Transition From Physiological Condition to Inflammation. *J Periodontol*, Vol.72, 65-73.
- Elenkov IJ., Wilder RL., Chrousos GP., Vizi ES. (2000). The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev*. Vol. 52:595-638.

- Flórez-Moreno, G.A., Isaza-Guzman DM., Tobon-Arroyavec SI. (2013). Time-related changes in salivary levels of the osteotropic factors sRANKL and OPG through orthodontic tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. Vol.143(1):92-100. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
- Garant, P.R. DMD. (2003). Capítulo 6. *Oral Cells and Tissues* (153-173). España: Quintessence Publishing Co, Inc . Págs. 153-177.
- Garcia I., Kuska R., Somerman M.J. (2013). Expanding the Foundation for Personalized Medicine: Implications and Challenges for Dentistry. *Journal of Dental Research*. Vol. 92(7 Suppl): 3S-10S.
- Günday S., Topcu A. O., Ercan E., Yamalik N. (2014). Analysis of Daytime Variations in Gingival Crevicular Fluid: A Circadian Periodicity? *Journal of Periodontology*, Vol. 85, No. 3, 47-56.
- Gümüşx, P., Buduneli, E., Bıyıkoglu, B., Aksu, K., Saracx, F., Nile, C., Lappin, D., Buduneli, D. (2013) Gingival Crevicular Fluid, Serum Levels of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B Ligand, Osteoprotegerin, and Interleukin-17 in Patients With Rheumatoid Arthritis and Osteoporosis and With Periodontal Disease. *J Periodontol*. Vol. 84: 1627-1637.
- Hashimoto S, Yamamura T, Shimono M . (1986). Morphometric analysis of the intercellular space and desmosomes of rat junctional epithelium. *J. Periodontal Res* , 21: 510-520.
- Henneman S, Von den Hoff JW, Maltha JC. Mechanobiology of tooth movement. *Eur J Orthod*. 2008;30(3):299-306.
- Higashida, B.Y. (2009). *Odontología Preventiva*, 2ª Ed. México, DF. Editorial McGraw-Hill. Págs. 274-286.
- Kanzaki, H. et al.. (2019). Compression and tension variably alter osteoprotegerin expression via miR-3198 in periodontal ligament cells. *BMC Molecular and Cell Biology*, 20:6, 1-10.
- Kapoor, P. et al.(2014) Effect of orthodontic forces on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid: a systematic review. *Prog Orthod*. 15(1): 65.
- Kawai T, Eisen-Lev R, Seki M, Eastcott JW, Wilson ME, Taubman MA. (2000). Requirement of B7 costimulation for Th1-mediated inflammatory bone resorption in experimental periodontal disease. *Journal of Immunology*, Vol.164:, 2102-2109.

- Kawasaki K., Takahashi T., Yamaguchi M., Kasai K. (2006). Effects of aging on RANKL and OPG levels in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Orthodontic Craniofacial Research*. Vol. 9(3): 137-142.
- Kitaura, H et al. (2014). Interface Oral Health Science Innovative Research on Biosis-Abiosis Intelligent Interface. **23**:269-275. Sendai, Miyagi, Japan: Springer Open.
- Krasse, B., Egelberg, J. The relative proportions of sodium, potassium and calcium in gingival pocket fluid. *Acta Odontol Scand*. 1962 Jun;20:143-52. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14459378#>
- Lamster I.B., (1997). Evaluation of Components of Gingival Crevicular Fluid as Diagnostic Tests. *Annals of Periodontology*, Vol. 2, No. 1, 123-137.
- Levasseur, R. (2019). Fisiología del tejido óseo. *Aparato Locomotor*. Volumen 52, Número 2, Páginas 1-25. Copyright © Elsevier Masson SAS.
- Livia Nunes, Luciana Quintanilha, Giuseppe Perinetti, Jonas Capelli Junior. (2017). Effect of orthodontic force on expression levels of ten cytokines in gingival crevicular fluid. *Archives of Oral Biology*, 76, 70-75.
- Marc Baud'huin, Laurence Duplomb, Stéphane Teletchea, François Lamoureux, Carmen Ruiz-Velasco, Mike Maillason, Françoise Redini, Marie-Françoise Heymann, Dominique Heymann. (2013). Osteoprotegerin: Multiple partners for multiple functions. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 24, 401-409.
- Mendoza, L., Meléndez, A., Ortiz, R., Fernández, A.. (2014). Prevalencia de las maloclusiones asociada con hábitos bucales nocivos en una muestra de mexicanos. *Revista Mexicana de Ortodoncia*, 2 Núm.4, 220-227.
- Miyamoto T. (2013). Role of osteoclasts in regulating hematopoietic stem and progenitor cells. *World J Orthop*. Vol. 18; 4(4): 198–206.
- Moreno, J., Covarrubias, M., & García, E. (2016). Movimiento dentario ortodóntico: factores modificantes y alteraciones tisulares, revisión bibliográfica. *Revista Latinoamericana de Ortodoncia y Odontopediatría*. <https://www.ortodoncia.ws/publicaciones/art-16>
- Moss-Salentijn, L., Melvin L. (1997). Moss and The Functional Matrix. *Journal Dental Research*, Vol. 76, 1814-1817.
- Moss, M. (1997). The role of an osseous connected cellular network. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, Volume 112, Issue 2, 221–226.

- Mukherjee, S. (1983) An improved method for determination of cations in micro-sample volumes of gingival crevicular fluid in the dog. Archives of oral biology, Volume 28, Issue 1,45-49 Pages 45-49.
- Nayak BN., Galil KA, Wiltshire W, Lekic PC. (2013). Molecular Biology of Orthodontic Tooth Movement. Journal of Dentistry and Oral Health, Vol 1:101, 1-6.
- Nishijima Y., Yamaguchi M, et al. (2006). Levels of RANKL and OPG in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement and effect of compression force on releases from periodontal ligament cells in vitro. Orthod Craniofac Res. Vol. 9(2):63-70.
- Oceano Uno, (1994) Diccionario enciclopédico Ilustrado. Santa Fe de Bogotá, Colombia. Ed. Oceano.
- Orban J. E., Stallard R. E. (1969). Gingival Crevicular Fluid: A Reliable Predictor of Gingival Health?. Journal of Periodontology, 40, 231-235.
- Ortiz, G., Cárdenas, M.. (2005). Prevalence of types of occlusion in 6 to 11 year old school children, in the municipalities of Querétaro and San Juan del Rio, Querétaro, México. International Journal of Jaw Funtional. Orthopedics, Vol. I, N°4, 361-369.
- Planas Pedro. (1997). Justificación de la "rehabilitación neuro-oclusal". En Rehabilitación Neuro-Oclusal (RNO)(1-12; 61-67). Barcelona: AMOLCA.
- Pons J., Kitlinska J., et al. (2008). Interactions of multiple signaling pathways in neuropeptide imediated bimodal vascular smooth muscle cell growth. Can J Physiol Pharmacol, Vol. 86(7): 438–448.
- Raed AlRowis, Hani S AlMoharib, Abdulrahman AlMubarak, Jagankumar Bhaskardoss, R S Preethanath, Sukumaran Anil. (2014). Oral Fluid-Based Biomarkers in Periodontal Disease – Part 2. Gingival Crevicular Fluid. Journal of International Oral Health, 6(5), 126-135.
- Real Academia Española. (2014). Diccionario de la lengua española (Dictionary of the Spanish Languaje) (23nd ed.) Madrid, Spain: Author.
- Schlenk, D. (1999). Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. Marine Pollution Bulletin, N° 99 (1-12):48-53.
- Schroeder HE, Listgarten MA. (1997). The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. *Periodontol 2000* , 13, 91-120.
- Shapiro L., Novaes A., Fillios L., Simons G., Goldman H. M. (1980). Sulcular

Exudate Protein Levels as an Indicator of the Clinical Inflammatory Response. *Journal of Periodontology*, 51, N° 2, 86-87.

Silva-Boghossian Carina M., Colombo A. V., Tanaka M., Rayo C., Xiao Y., Siqueira W. (2013). Quantitative Proteomic Analysis of Gingival Crevicular Fluid in Different Periodontal Conditions. *PLOS ONE*, 8, 1-15.

Silva Flores X.D., *et al.* (2013). Prevalencia de caries, gingivitis y maloclusiones en escolares de Ciudad Victoria, Tamaulipas y su relación con el estado.

Simões, W.A. Functional Jaw Orthopedics. Better oral neurophysiology information gives better clinical results. *J. Pedodontics*. 8(1): 108-115, 1983

Simões, W. (2004).^a *Ortopedia Funcional de los Maxilares a través de la Rehabilitación Neuro-Oclusal*. São Paulo, Brasil: Artes Médicas Ltda. Págs.55-66.

Simões, W. (2004).^b *Ortopedia Funcional de los Maxilares a través de la Rehabilitación Neuro-Oclusal*. São Paulo, Brasil: Artes Médicas Ltda. Págs.67-74.

Shuo Yang, MD; Bin Gu, PhD; Lisheng Zhao, PhD; Quan Shi, PhD; Juan Xu, PhD; Ning Wen, PhD (2019) Meta-analysis of the association between serum and gingival crevicular fluid matrix metalloproteinase-9 and periodontitis. *JADA* 2019;150(1):34-41

Sorapan Smuthkochorn,^a J. Martin Palomo,^b Mark G. Hans,^b Corey S. Jones,^c and Leena Palomod. (July 2017). Gingival crevicular fluid bone turnover biomarkers: How postmenopausal women respond to orthodontic activation. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 152, 33-37.

Stuti,G., Shivjot, Ch., Sachit, A. (2018). A systematic review of biomarkers of gingival crevicular fluid: Their predictive role in diagnosis of periodontal disease status. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 8, 98-104.

Subbarao, K. *et al.* (Mayo, 2019). Gingival Crevicular Fluid: An Overview. *J Pharm Bioallied Sci*, 2, 135-139.

Taubman M. A., Valverde P., Han X., Kawai T. (2005). Immune Response: The Key to Bone Resorption in Periodontal Disease. *Journal of Periodontology*, Vol.76: 2033-2041.

- Tonetti M. S., Imboden M. A., Lang N. P. (1998). Neutrophil Migration Into the Gingival Sulcus Is Associated With Transepithelial Gradients of Interleukin-8 and ICAM-1. *Journal of Periodontology*, Vol. 69, Nº10, 1139-1147.
- Tyrovola JB., Spyropoulos MN., Makou M., Perrea D. (2008). Root resorption and the OPG/RANKL/RANK system: a mini review. *J Oral Sci.* Vol. 50(4): 367-76.
- Vega D., Maalouf N. M., Sakhaee K. (2007). The Role of Receptor Activator of Nuclear Factor- κ B(RANK)/RANK Ligand/Osteoprotegerin: Clinical Implications. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, Vol. 92(12):, 4514–4521.
- Veidal, et al. (2011). Assessment of proteolytic degradation of the basement membrane: a fragment of type IV collagen as a biochemical marker for liver fibrosis. *Fibrogenesis & Tissue Repair*, Vol.4:2-11.
- Veli-Jukka,U. (1983). Degradation of Basement Membrane Collagen by Proteinases From Human Gingiva, Leukocytes and Bacterial Plaque *Journal of Periodontology*, Vol.54.12: 740-745.
- Weber, T.J. (2017) en Levasseur, R. (2019). Fisiología del tejido óseo. *Aparato Locomotor*. Volumen 52, Número 2, Páginas 1-25. Copyright © Elsevier Masson SAS.
- Wise GE, King GJ. Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 2008;87(5):414-34.
- Woodside D.G., Altuna G. E., Harvold M., Herbert A. (1983). Primate experiments in malocclusion and bone induction. *American Journal of Orthodontics*, Volume 83, Issue 6, 460–468.
- Yamaguchi, M. (2009). RANK/RANKL/OPG during orthodontic tooth movement. *Orthodontic Craniofacial Research*. Vol. 12(2):113-119.
- (2012, 01). Perfiles básicos de salud de países en las Américas. Organización Mundial de la Salud. Obtenido 05, 2016, de Organización Panamericana de la Salud. www.paho.org/spanish/dd/ais/cp_604.htm
- Yimei Zhang, Xiaoxing Koua, Nan Jiangb, Yan Liua, Franklin R. Tayc,, Yanheng Zhou. (2017). Effect of intraoral mechanical stress application on the expression of a force-responsive prognostic marker associated with system disease progression. *Journal of Dentistry*, 57: 57-65.

INDICE

IX. ANEXOS

Anexo 1

Hoja de Recolección de datos

Fecha _____

Nombre: _____

—

Edad: _____

Género _____

Niveles de RANK-RANKL en fluido crevicular

Diente	0 hr	1 hr	24 hr	168 hrs	30 días
13					
23					
33					
43					

Niveles de OPG en fluido crevicular

Diente	0 hr	1 hr	24 hr	168 hrs (7 días)	30 días
13					
23					
33					
43					

Anotaciones. _____

Anexo 3

Ficha Periodontal

Nombre: _____

Edad: _____

Género: _____

SUPERIOR																
	1.8	1.7	1.6	1.5	1.4	1.3	1.2	1.1	2.1	2.2	2.3	2.4	2.5	2.6	2.7	2.8
Implante																
Movilidad o individual																
Furca																
Supuración																
Placa																
chura encía																
Vestibular																
Palatino																
Placa																
Supuración																
Furca																
INFERIOR																
Nota																
Furca																
Supuración																
Placa																
Lingual																
Vestibular																
chura encía																
Placa																
Supuración																
Furca																
Individual																
Movilidad																
Implante																
	4.8	4.7	4.6	4.5	4.4	4.3	4.2	4.1	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8