

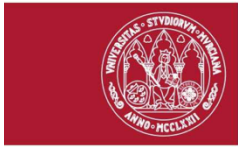


UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

**Efectos de la Diabetes en el
Movimiento Dentario Ortodónico**

D^a Miriam García López
2021



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

UNIVERSIDAD DE MURCIA

DEPARTAMENTO DE DERMATOLOGÍA, ESTOMATOLOGÍA Y
RADIOLOGÍA Y MEDICINA FÍSICA

Efectos de la diabetes en el movimiento dentario
ortodóncico

MIRIAM GARCÍA LÓPEZ

2020

DIRECTORES

ASCENSIÓN VICENTE HERNÁNDEZ

LUIS ALBERTO BRAVO GONZÁLEZ

ABREVIATURAS

AIAB: Área de interés del hueso alveolar.

AMPc: AMP cíclico.

Ca: Calcio.

CCL-2: Ligando de quimiocina 2.

CCL-5: Ligando de quimiocina 5.

CGRP: Péptido genéticamente relacionado con la calcitonina.

COX-2: Ciclooxygenasa 2.

CR: Cemento radicular.

CSF-1: Factor estimulador de colonias 1.

DAB: Diaminobencidina.

E: Encía.

EDTA: Ácido etildiaminotetraacético.

FDO: Factor de diferenciación osteoclástico.

FGF: Factor de crecimiento fibroblástico.

HAPD: Hueso alveolar propiamente dicho.

IFN γ : Interferón gamma.

IGF: Factor de crecimiento de insulina.

IL-1: Interleucina 1.

IL-11: Interleucina 11.

IL-13: Interleucina 13.

IL-14: Interleucina 14.

IL-18: Interleucina 18.

IL-1 α : Interleucina 1 α .

IL-1 β : Interleucina 1 β .

IL-2: Interleucina 2.

IL-3: Interleucina 3.

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

LP: Ligamento periodontal.

M1: Primer molar superior.

M2: Segundo molar superior.

M3: Tercer molar superior.

MDA: Malondialdehído.

ME: Metilencefalina.

MMP-1: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 1.

MMP-10: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 10.

MMP-11: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 11.

MMP-13: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 13.

MMP-14: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 14.

MMP-15: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 15.

MMP-16: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 16.

MMP-17: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 17.

MMP-2: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 2.

MMP-3: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 3.

MMP-7: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 7.

MMP-8: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 8.

MMP-9: Metaloproteinasa de la matriz extracelular 9.

MMPS: Metaloproteinasas de la matriz extracelular.

MPO: Mieloperoxidasa.

OCN: Codificador de osteocalcina.

OPG: Osteoprotegerina.

P: Fósforo.

PBS: Tampón fosfato salino.

PG: Prostaglandinas.

PG2: Prostaglandina 2.

PTH: Paratohormona.

RANK: Receptor activador para el factor nuclear kappa.

RANKL: Ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa.

SP: Sustancia P.

STZ: Estreptozotocina.

TGFβ: Factor de crecimiento beta.

TGFβ1: Factor de crecimiento beta 1.

TIMPS: Inhibidor de tejidos de metaloproteinasas.

TNFα: Factor de necrosis tumoral α.

UAC: Unión amelocementaria.

VIP: Péptido intersticial vasoactivo.

ZC: Zona de compresión.

ZT: Zona de tensión

ÍNDICE

	<u>Página</u>
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. EL PERIODONTO	2
2.1.1. LA ENCÍA	2
2.1.2. EL LIGAMENTO PERIODONTAL (LP)	3
2.1.3. EL CEMENTO RADICULAR	4
2.1.4. EL HUESO ALVEOLAR	4
2.2. BIOLOGÍA DEL MOVIMIENTO DENTARIO	5
2.2.1. APLICACIÓN DE UNA FUERZA ORTODÓNCICA	6
2.2.2. TEORÍAS DEL MOVIMIENTO DENTARIO.....	6
2.2.2.1. <i>Teoría de la presión y la tensión</i>	6
2.2.2.2. <i>Teoría de la deformación ósea</i>	8
2.2.2.3. <i>Teoría de las señales bioeléctricas</i>	8
2.2.3. FASES DEL MOVIMIENTO DENTARIO.....	9
2.2.4. REMODELADO ÓSEO Y DEL LP	10
2.3. BIOQUÍMICA DEL MOVIMIENTO DENTARIO	13
2.3.1. LOS NEUROTRANSMISORES EN EL MOVIMIENTO DENTARIO	13
2.3.2. EL PAPEL DE LAS CITOQUINAS.....	14
2.3.3. LAS PROTAGLANDINAS (PG).....	16
2.3.4. LOS FACTORES DE CRECIMIENTO	18
2.3.5. LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR (MMPS).....	18
2.3.6. ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MOVIMIENTO DENTARIO ORTODÓNCICO	21
2.4. DIABETES MELLITUS	22
2.4.1. LA DIABETES MELLITUS Y LA SALUD PERIODONTAL	24
2.4.2. PAPEL DE LA DIABETES MELLITUS EN EL REMODELADO ÓSEO	25
2.4.3. PAPEL DE LA DIABETES MELLITUS EN EL REMODELADO DEL LP	26
2.4.4. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DIABETES MELLITUS	27

3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	30
4.1. HIPÓTESIS.....	30
4.2. OBJETIVO GENERAL	31
4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
5. MATERIAL Y MÉTODOS.....	31
5.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	31
5.2. ALEATORIZACIÓN.....	32
5.3. INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO I	32
5.4. PROCEDIMIENTO ORTODÓNCICO	33
5.5. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA MIELOPEROXIDASA (MPO) Y DEL MALONDIALDEHÍDO (MDA)	34
5.6. MICRO-CT PARA EL ESTUDIO DEL MOVIMIENTO DENTAL.....	35
5.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL LP CON HEMATOXILINA-EOSINA	35
5.8. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO. CUANTIFICACIÓN DE MMP-8 Y MMP-9 ..	36
5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	38
6. RESULTADOS	38
6.1. ACTIVIDAD MPO Y MDA.....	38
6.2. MOVIMIENTO DENTARIO ORTODÓNCICO	40
6.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL LP	42
6.4. EXPRESIÓN DE MMP-8 Y MMP-9	43
7. DISCUSIÓN	46
8. CONCLUSIONES	54
9. BIBLIOGRAFÍA.....	55
10. ANEXOS.....	70

1. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la diabetes en el estrés oxidativo, en la orientación de las fibras del ligamento periodontal (LP) y en la expresión de las metaloproteinasas (MMPS) 8 y 9 durante el movimiento dentario ortodóncico en un modelo en ratas. Para ello, se colocó un aparato ortodóncico en 60 ratas Sprague-Dawley y se dividieron aleatoriamente en 3 grupos (n=20): 1) Normoglicémicas, 2) Diabéticas sin tratamiento y 3) Diabéticas tratadas con insulina. Las ratas fueron sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas, y a la semana de la activación del aparato. En cada uno de estos momentos en el tiempo, se cuantificó la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) y el malondialdehído (MDA) mediante espectrometría, el movimiento dentario fue evaluado por micro-CT, la orientación de las fibras del LP se evaluó a partir de su tinción con hematoxilina-eosina y la expresión de las MMP-8 y MMP-9 se determinó mediante tinción inmunohistoquímica y un análisis semicuantitativo “H-Score”. A las 24 horas, la actividad de MPO fue significativamente mayor en las ratas diabéticas no tratadas que en las normoglicémicas. A las 24 y 48 horas el nivel de MDA en las ratas diabéticas no tratadas fue significativamente mayor que en las normoglicémicas y en las ratas diabéticas tratadas con insulina. A las 72 horas y a la semana, las fibras del LP estaban orientadas de forma significativamente más irregular en las ratas diabéticas no tratadas que en las normoglicémicas. En todos los momentos en el tiempo, la expresión de MMP-8 y MMP-9 fue significativamente mayor en los dos grupos de animales diabéticos que en el grupo normoglicémico. Tras el segundo día, el movimiento dentario fue significativamente mayor en las ratas diabéticas sin tratamiento que en las tratadas con insulina y en las normoglicémicas. Por tanto, el estrés mecánico en las ratas diabéticas sin tratamiento produce más respuesta inflamatoria, estrés oxidativo, movimiento dental, desorganización del LP y una mayor expresión de MMP-8 y MMP-9 que en las ratas normoglicémicas. La insulina revierte en parte los efectos de la diabetes favoreciendo la reorganización del LP.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. EL PERIODONTO

Los tejidos que rodean al diente o periodonto se componen de la encía, el ligamento periodontal (LP), el cemento radicular y el hueso alveolar (Figura 1). Su función principal consiste en unir el diente al tejido óseo y en mantener la integridad en la superficie masticatoria, por ello también es conocido como aparato de inserción. Estos tejidos de sostén del diente constituyen una unidad de desarrollo biológica y funcional, en la que se producen cambios con la edad y modificaciones de forma, en función de las alteraciones funcionales y del medio al que se somete (Lindhe, Karring y Araújo, 2017). Durante la aplicación de fuerzas ortodóncicas, se producen una serie de alteraciones en el periodonto que van a variar en función de factores tales como, la magnitud de la fuerza, la dirección o la duración de esta (Thilander, Rygh y Reitan, 2017).

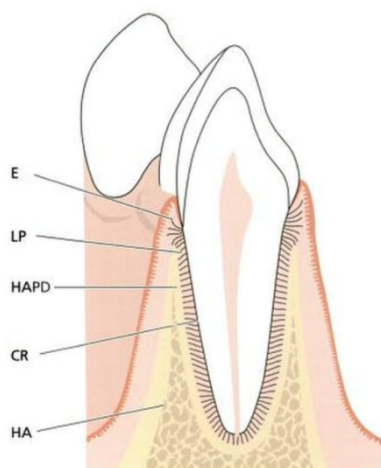


Figura 1. Elementos que componen el periodonto. E: Encía, LP: ligamento periodontal, HAPD: hueso alveolar propiamente dicho, CR: cemento radicular y HA: hueso o proceso alveolar. (Lindhe, Karring y Araújo 2017).

2.1.1. LA ENCÍA

Distinguimos entre encía libre, que en condiciones de salud se encuentra en contacto con el esmalte y entre 0,5-2 mm coronal a la unión amelocementaria (UAC); y la encía insertada, que se encuentra unida a través de fibras de tejido conjuntivo tanto al hueso como al cemento y se extiende desde la unión mucogingival hacia la mucosa alveolar (Thilander, Rygh y Reitan, 2017).

La encía está compuesta principalmente de tejido conjuntivo, donde un 55-60% de su volumen lo constituyen las fibras de colágeno, sobre todo del tipo I y III (Schroeder y Listgarten, 1997).

La unidad mínima que constituye las fibras de colágeno es conocida como molécula de tropocolágeno, formada por haces de fibrillas de colágeno (Thilander, Rygh y Reitan, 2017). Estos haces de fibras están organizados dentro de la matriz junto a vasos y nervios, clasificándose según su orientación en fibras circulares, horizontales, oblicuas, apicales e interradiculares (Elley, Soory y Manson, 2012).

2.1.2. EL LIGAMENTO PERIODONTAL

Es una estructura de tejido blando vascular (tejido conjuntivo denso y fibroso) que une el cemento radicular con el hueso alveolar. Encima de la cresta alveolar se continúa con tejido conjuntivo de la encía y en el foramen apical con la pulpa.

Entre sus principales funciones, destaca en primer lugar la distribución de las fuerzas y protección ante cargas oclusales, manteniendo al diente durante su erupción y cambios de posición; además, se encarga de reparar el hueso y el cemento (Elley, Soory y Manson, 2012); y en último lugar, aportar los nutrientes y la vascularización necesaria al cemento, al hueso alveolar y al propio LP (Storey, 1973).

El LP conecta el cemento al hueso alveolar a través de fibras de colágeno conocidas como fibras de Sharpey, principalmente formadas por colágeno tipo I. Su anchura alrededor de la raíz en situaciones de homeostasis se encuentra entre 0,15-0,38 mm en función del tipo de diente (Jiang y cols., 2016). Se constituye principalmente de fibroblastos (50-60%) (Phipps, Borrello y Blieden, 1997), además también se observan osteoblastos, osteoclastos, elementos vasculares, terminaciones nerviosas y sustancia intercelular junto al fluido intersticial (Chaqués, 1998). Las fibrillas del LP se localizan dentro de la sustancia fundamental, la cual contiene polisacáridos, sales, agua y otras sustancias (Thilander, Rygh y Reitan, 2017).

Los osteoblastos están implicados en el movimiento dentario y proceden de una zona de la membrana periodontal, de manera que su origen es local a partir de las células mesenquimales indiferenciadas, al igual que sucede con los fibroblastos. Los osteoclastos son los responsables de la reabsorción ósea y a diferencia de los osteoblastos, su origen es hematopoyético. Estos se activan a partir de la paratohormona (PTH), las prostaglandinas (PG), vitamina D y calcitonina entre otros (Chaqués, 1998).

2.1.3. EL CEMENTO RADICULAR

El cemento radicular es un tejido conectivo duro que no contiene vascularización ni inervación y cubre las raíces dentales. Entre sus funciones se encuentra la de unir las fibras principales del LP a la raíz y ayudar a la reparación de lesiones. Las fibras de Sharpey se encuentran formando parte de su estructura (Nanci y Bosshardt, 2006).

El cemento radicular no se remodela, crece por aposición sin tener capacidad de remodelación y se deposita de forma continua aumentando su espesor (Thilander, Rygh y Reitan, 2017).

2.1.4. EL HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar rodea al diente desde su UAC hasta 1 mm por debajo del punto más apical de la raíz. Está formado por hueso trabeculado, con una lámina de hueso compacto adyacente al LP, conocida como lámina dura (Jiang y cols., 2016).

Este hueso es un tejido conectivo mineralizado formado por tejido mineral (23%), una matriz orgánica compuesta principalmente por colágeno tipo I (37%) y agua (40%) (Moss-Salentijn, 1997).

El hueso alveolar tiene capacidad de remodelación ante las demandas funcionales, como ocurre con otras estructuras anatómicas óseas, y ésta es muy rápida (Nanci y Bosshardt, 2006). Dicha remodelación se produce a partir de células como los osteoblastos y los osteoclastos, los cuales se localizan en las paredes del alveolo en dirección a la membrana periodontal, sobre la parte interna de hueso cortical (hacia

espacios medulares) y sobre la superficie de trabéculas óseas en el hueso esponjoso (Thilander, Rygh y Reitan, 2017).

2.2. BIOLOGÍA DEL MOVIMIENTO DENTARIO

El éxito de un tratamiento de ortodoncia se encuentra condicionado por diversos factores como la salud periodontal, la higiene oral y las fuerzas ortodóncicas aplicadas (Cardaropoli y Gaveglio, 2007).

La clave del movimiento dentario ortodóncico depende tanto de la capacidad de remodelación del hueso alveolar, como de la capacidad de regeneración y reparación del LP (Wise y King, 2008). Por este motivo, tanto el LP como el hueso alveolar son considerados dos tejidos críticos para entender el movimiento dentario (Jiang y cols., 2016).

En condiciones de homeostasis, el hueso es capaz de renovarse de forma continua en respuesta a las diversas demandas funcionales (Li y cols., 2018). El hueso está cubierto de periostio, cuyas células mesenquimales adquieren características de osteoblastos. Estas células están sujetas a la influencia mecánica, de manera que, si la presión supera ciertos límites, el aporte sanguíneo cesa y por tanto su proliferación (Huang, Williams y Kyrkanides, 2014). Sin embargo, si el periostio se somete a tracciones, responde depositando hueso. Se puede afirmar, que el periostio funciona como una zona osteogénica (Thilander, Rygh y Reitan, 2017).

Los osteoblastos y osteoclastos controlan el remodelado óseo. Durante este proceso, los osteoclastos producen la reabsorción ósea y los osteoblastos forman hueso (Huang, Williams y Kyrkanides, 2014). En las zonas de depósito óseo se puede observar como los osteoblastos producen osteoide (compuesto por fibras de colágeno y una matriz de proteoglicanos y glucoproteínas). La matriz ósea se mineraliza por depósito de calcio (Ca) y fósforo (P) que darán lugar a la hidroxiapatita. Cuando el hueso espesa y madura, algunas partes se reorganizan en hueso laminar con fibrillas finas en su matriz (Thilander, Rygh y Reitan, 2017).

Existen situaciones donde se rompe el equilibrio fisiológico de remodelado óseo, como sucede durante la enfermedad periodontal (donde se produce un desequilibrio de carácter patológico) o durante el movimiento dentario ortodóncico (donde el desequilibrio se produce de forma intencionada y controlada). Tras la aplicación de una fuerza ortodóncica, se produce una agresión a los tejidos dentarios y paradentarios, dando lugar a una inflamación aséptica en el LP, el cual responde estimulando e inhibiendo la remodelación ósea (Pérez Varela, 2003).

2.2.1. APLICACIÓN DE UNA FUERZA ORTODÓNCICA

Las reacciones tisulares que se producen durante la migración dentaria fisiológica y las que se producen durante la aplicación de una fuerza ortodóncica, no presentan grandes diferencias. La diferencia radica en que los cambios producidos tras la aplicación de fuerzas son más significativos y de mayor amplitud (Eugene Roberts, 2017).

Ante la aplicación de una fuerza ortodóncica de cualquier magnitud, se producen una secuencia de cambios tanto a nivel macroscópico como a nivel microscópico (Zainal Ariffin y cols., 2011).

2.2.2. TEORÍAS DEL MOVIMIENTO DENTARIO

La aplicación de una fuerza ortodóncica se traduce en una actividad biológica que se ha intentado explicar a través de tres teorías.

2.2.2.1. Teoría de la presión y la tensión

Los efectos de la aplicación de las fuerzas se pueden observar en dos regiones histológicas conocidas como zona de compresión (ZC) y zona de tensión (ZT) (Sandstedt, 1904; Schwarz, 1932; Oppenheim, 2007;) (Figura 2). Estas áreas son consecuencia del desplazamiento del diente en el espacio del LP (Krishnan y Davidovitch, 2006).

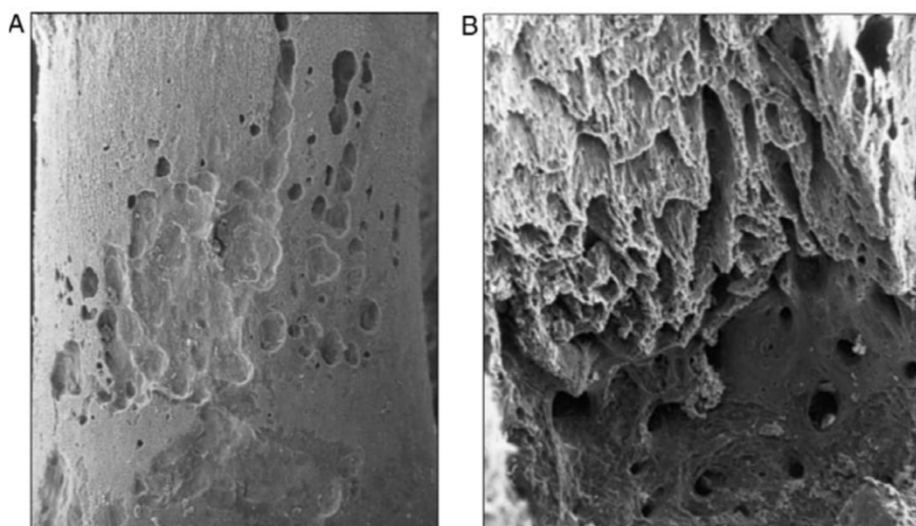


Figura 2. ZC y ZT en hueso alveolar de rata a los 5 días de la aplicación de la fuerza. (A) Reabsorción producida en el área adyacente a la ZC. (B) Osteogénesis con espículas óseas que se extienden en la ZT (Wise y King, 2008).

En la ZC, la presión hidrostática positiva produce tras la aplicación de la fuerza, una alteración que reduce la proliferación celular; teniendo lugar una oclusión y desintegración parcial de los capilares sanguíneos, lo que se traduce en isquemia. Estos cambios, generan una zona hialinizada y necrótica que detiene el movimiento dentario (Vandevska-Radunovic, 1999). Como consecuencia, aumentan las PG, se favorece la aparición de osteoclastos y se produce la reabsorción ósea. Además, se puede observar un aumento de la longitud y de la anchura del LP y un aumento del tamaño de las células con capacidad osteoclástica (Chaqués, 1998).

Por otro lado, en la ZT se genera una presión hidrostática negativa que favorece la proliferación celular. Como consecuencia, disminuye el tamaño de las células y de las áreas de inserción y se reduce la cantidad de reabsorción y de osteoclastos (Chaqués, 1998). Se produce, además, la distensión de las fibras periodontales, el aumento del número de osteoblastos activos en la superficie ósea (Tsuge, Noda y Nakamura, 2016) y la dilatación de los vasos sanguíneos; aumentando el flujo sanguíneo necesario para el remodelado del hueso y del LP (Vandevska-Radunovic, 1999).

Esta teoría del movimiento dentario ha sido ampliamente investigada, a través de estudios histológicos del periodonto, y postula que los cambios que se producen en la

anchura del LP son capaces de provocar cambios en la población celular y generar un aumento de su actividad (Krishnan y Davidovitch, 2006).

2.2.2.2. Teoría de la deformación ósea

Esta teoría fue postulada por Farrar (1888) y defiende que al activar por primera vez un aparato ortodóncico, las fuerzas repartidas al hueso se transmiten a sus tejidos más cercanos y son capaces de deformar el hueso, el diente y las estructuras sólidas del LP. Tras la deformación del hueso, se produce un reemplazo óseo y renovación celular a nivel biológico, que se ven acelerados en el caso de perpetuarse la deformación ósea (Krishnan y Davidovitch, 2006).

2.2.2.3. Teoría de las señales bioeléctricas

Bassett y Becker (1962) afirmaron que tras aplicar una fuerza mecánica se generan potenciales eléctricos en los tejidos, capaces de cargar macromoléculas que interactúan con zonas específicas de las células o movilizan iones a través de las membranas celulares.

La zona cóncava del hueso se encuentra cargada negativamente, lo que favorece la actividad osteoblástica. Mientras que la zona convexa, se encuentra cargada positivamente o de forma neutra, con gran actividad osteoclástica. Krishnan y Davidovitch (2006) confirmaron la relación física que existe entre la perturbación mecánica y la perturbación eléctrica del hueso.

Tras la aplicación de una fuerza ortodóncica se pueden distinguir dos áreas, el área de reabsorción y el área de aposición que se produce como consecuencia de la deformación ósea, de fibras, vasos sanguíneos y células. Esta deformación provoca un flujo de iones que desencadena una serie de señales eléctricas y una respuesta celular, actuando sobre los primeros mensajeros involucrados en el movimiento (Krishnan y Davidovitch, 2006).

Ninguna de estas tres teorías aporta conclusiones evidentes sobre cuál es la naturaleza del mecanismo biológico del movimiento dentario. Los estudios más recientes

afirman que tanto los fenómenos físicos como los fenómenos biológicos pueden estar involucrados en el movimiento dentario inducido ortodóncicamente (Krishnan y Davidovitch, 2006).

2.2.3. FASES DEL MOVIMIENTO DENTARIO

La aplicación de una fuerza provoca una agresión en los tejidos que desencadena en un proceso inflamatorio (Pérez Varela, 2003). Esto se traduce en una serie de eventos que concluyen en aposición ósea y/o reabsorción del hueso gracias a un complejo sistema de señales moleculares (Jiang y cols., 2016).

Los tejidos paradentales están diseñados para soportar fuerzas masticatorias de corta duración, menores a 1 segundo, y de alta intensidad. La unidad alveolar es un sistema hidrostático que funciona bajo las leyes de Pascal (Pérez Varela, 2003). Tras aplicar una fuerza de forma continua sobre un diente, se produce un movimiento dental dentro del hueso marcado por el estrechamiento del LP, sobretudo en su zona marginal (Eugene Roberts, 2017). El contenido del espacio periodontal pierde su capacidad de sellado y se exprimen sus fluidos al exterior (Pérez Varela, 2003).

El movimiento dentario producido como consecuencia de la aplicación de una fuerza tiene lugar en tres fases (Krishnan y Davidovitch, 2006).

En primer lugar, la fase inicial, ocurre entre las primeras 24-48 horas tras la aplicación de las fuerzas. Esta fase es consecuencia del desplazamiento del diente en el espacio periodontal, donde se produce un movimiento rápido e inmediato (Krishnan y Davidovitch, 2006). Durante este periodo la aplicación de la fuerza produce una compresión del LP que provoca la extravasación de células desde los vasos, atracción química de células inflamatorias y el reclutamiento de precursores de osteoblastos y osteoclastos (Moshabab, 2018), los osteoclastos se diferencian por toda la pared del hueso alveolar (Eugene Roberts, 2017).

En segundo lugar, la fase de reposo. Esta se caracteriza por la hialinización del LP en la ZC (Krishnan y Davidovitch, 2006). Durante esta fase no se produce movimiento dental, o este es mínimo hasta que las células hayan sido capaces de eliminar todo el

tejido necrótico (Kashyap, 2016). La hialinización tiene lugar cuando la compresión en zonas limitadas de la membrana impide la circulación vascular y la diferenciación de células, produciendo así una degradación de éstas, observándose al microscopio óptico como un tejido de aspecto vidrioso. Este proceso tiene lugar casi siempre y es inevitable en el periodo inicial, donde se produce una zona necrótica estéril de 1-2 mm de diámetro (Eugene Roberts, 2017). La degeneración se produce donde la presión es mayor y donde la membrana del LP se estrecha más. El tejido necrótico óseo y periodontal de la ZC son eliminados por macrófagos y osteoclastos entre otros (Krishnan y Davidovitch, 2006). Hasta que todo el tejido hialinizado no es eliminado, no se vuelven a diferenciar más osteoclastos para la reabsorción ósea directa, que tendrá lugar en la siguiente fase. Al finalizar esta fase, el tejido hialinizado ha desaparecido y se ha restablecido la inserción dentaria y el LP (Eugene Roberts, 2017). La duración de esta fase es variable, desde 0 a 35 días, independientemente de la fuerza aplicada, dependiendo de la densidad ósea o de la actividad metabólica del hueso o del LP (Pilon, Kuijpers-Jagtman y Maltha, 1996).

En último lugar, se ha descrito la tercera fase, donde la tasa de movimiento dental se ve aumentada tras el proceso de reparación tisular y tiene lugar aproximadamente a los 40 días desde la aplicación de la fuerza (Krishnan y Davidovitch 2006). Esta etapa es considerada la de mayor expresión de remodelado tanto óseo como del LP (Pilon, Kuijpers-Jagtman y Maltha, 1996). En este proceso, el LP se ensancha considerablemente, los osteoclastos actúan sobre el hueso y se produce una reabsorción ósea de forma directa. Además, se reestructura el aparato de inserción. En esta etapa, lo más importante es el depósito de hueso nuevo (osteóide) sobre la superficie alveolar en el lado de tracción (Eugene Roberts, 2017).

2.2.4. REMODELADO ÓSEO Y DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

El hueso alveolar y el LP son las dos principales estructuras sobre las que recaen los efectos de la aplicación de las fuerzas ortodóncicas.

La reabsorción ósea es un proceso esencial en el tratamiento ortodóncico que tiene lugar en la dirección del movimiento aplicado y cuyas células protagonistas son los osteoclastos (Krishnan y Davidovitch, 2009).

Los osteoclastos derivan de células madre en los órganos hematopoyéticos y de las cavidades del hueso alveolar, que alcanzarán su destino a través del torrente sanguíneo. Sus precursores son las colonias formadoras de granulocitos-macrófagos, que originan pro-monocitos, de ellos derivan los pre-osteoclastos y los osteoclastos tardíos; y finalmente darán lugar a los osteoclastos (Mundy y Roodman, 1987).

Una vez producida la diferenciación de los osteoclastos, la capa de osteoide de la superficie ósea, que es una capa de tejido desmineralizado, es eliminada por los osteoclastos de revestimiento que producen enzimas como las MMPS, las cuales tienen entre otras funciones inducir a los osteoclastos a llegar al hueso mineralizado (Krishnan y Davidovitch, 2009).

Tras el acceso de los osteoclastos al hueso mineralizado, se produce la polarización de estos y se unen a proteínas de la matriz del hueso extracelular, como son las osteopontinas; de manera que se originan en los osteoclastos unos bordes ondulados definidos. Después tiene lugar la activación de los osteoclastos por factores locales y sistémicos, y la producción de iones de hidrógeno (encargados de disolver el mineral) y enzimas proteolíticas (encargadas de degradar la matriz). En la degradación y disolución de la matriz, es importante el papel de dos tipos de enzimas, las proteinasas lisosomales cisteína (cathepsin B, L y K) y las MMPS. Finalmente, el factor de crecimiento beta ($TGF\beta$) estimula la apoptosis de los osteoclastos a través de la acción de factores como la PTH y la vitamina D3. La apoptosis de los osteoclastos bloquea la reabsorción ósea (Krishnan y Davidovitch, 2009).

Cuando los osteoclastos finalizan la eliminación ósea, se produce una fase reversa donde aparecen células mononucleares y se produce la degradación del colágeno, la deposición de proteoglicanos y la liberación de los factores de crecimiento para producir nuevo hueso, es entonces cuando comienza la activación de los osteoblastos. La formación de hueso se produce a partir de la diferenciación de células precursoras de osteoblastos derivadas de células mesenquimales, de la maduración de estos osteoblastos, y de la formación y la mineralización de la matriz. En primer lugar, tiene lugar una quimioatracción de osteoblastos a la zona donde se formará el hueso. Tras ello, se depositarán hasta que el daño se repare. De esta manera, se forman osteocitos, que son osteoblastos rodeados de matriz calcificada (Mundy y Roodman, 1987).

Durante el proceso de remodelado óseo, tiene lugar de forma simultánea el remodelado del LP. En las zonas de tensión se produce un ensanchamiento del LP y aumenta la actividad proliferativa (Krishnan y Davidovitch, 2006). El LP contiene una población mixta de células capaces de sintetizar y degradar el tejido óseo, el cemento y el propio LP. Los fibroblastos del LP localizados en las zonas de tensión expresan fenotipos de células secretoras de matriz. La mayoría de la actividad mitótica tiene lugar cerca del hueso y a mitad del ligamento, pero no se produce cerca de la raíz (Davidovitch, 1991). El desplazamiento de fluidos en el LP, como consecuencia de la aplicación de la fuerza ortodóncica, altera la forma celular de los fibroblastos y produce cambios en el canal de permeabilidad de iones. De este modo, los fibroblastos secretan nuevas fibras de Sharpey en el ligamento, a la vez que se produce depósito de nueva matriz en la pared ósea, parte de esas nuevas fibras colágenas se incorporan al nuevo osteoide (Krishnan y Davidovitch, 2006) mientras que la otra parte se inserta en el diente (Meikle, 2006).

A su vez, la distorsión del ligamento genera una liberación de neuropéptidos desde las terminaciones nerviosas, que son capaces de producir la vasodilatación de los capilares en el lado de tensión y así permitir que los leucocitos y macrófagos pasen a zonas extravasculares generando la síntesis y liberación de citoquinas, factores de crecimiento y PG, capaces de generar señales moleculares implicadas en el remodelado del hueso (Davidovitch, 1991).

En el lado de presión, hacia el lado donde es aplicada la fuerza, se produce un estrechamiento del espacio del LP y la compresión de este, predominando en esta zona los fenómenos de necrosis celular (Krishnan y Davidovitch, 2006).

En resumen, las fuerzas ortodóncicas aplicadas, se transmiten a través de la matriz celular hasta las células locales tanto del LP como del hueso alveolar. Durante este proceso se produce la estimulación de agentes proinflamatorios, angiogénicos y osteogénicos y así se activa el proceso de remodelado del LP y del hueso alveolar adyacente. A su vez, en el hueso donde se ha aplicado una carga, se produce una alteración de las células y de su matriz extracelular, que varía el flujo de fluido mediando cambios en la expresión genética de las células (Figura 3). Esto tiene como resultado el inicio de la osteoclastogénesis y la diferenciación de células osteogénicas con la producción de

óxido nítrico, PG, osteocalcina, osteopontinas, fosfatasa alcalina y colágeno tipo I. Todo ello provocando finalmente la formación ósea y el remodelado (Feller y cols., 2015).

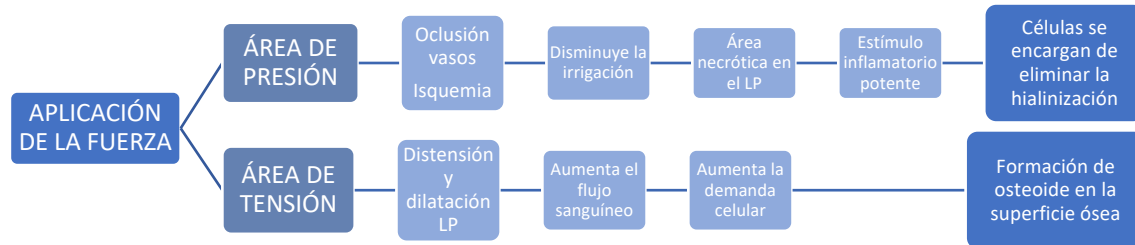


Figura 3. Efectos de la aplicación de la fuerza ortodóncica en el LP y hueso alveolar (Feller y cols., 2015).

2.3. BIOQUÍMICA DEL MOVIMIENTO DENTARIO

Cuando se aplica un estímulo físico, como es la fuerza ortodóncica, se produce un fenómeno de transducción donde la energía mecánica se convierte en una señal biológica capaz de determinar una respuesta de remodelado óseo (Chaqués, 1998).

2.3.1. LOS NEUROTRANSMISORES EN EL MOVIMIENTO DENTARIO

Los tejidos dentales y paradentales están inervados por neuronas del ganglio trigeminal, las cuales son capaces de cambiar su estructura ante un estímulo externo, como lo es la aplicación de una fuerza ortodóncica. El estímulo mecánico generado, puede estimular las terminaciones nerviosas libres de la membrana periodontal (Krishnan y Davidovitch, 2009).

El LP está inervado por dos tipos de terminaciones nerviosas, las terminaciones de Ruffini o mecanorreceptores y las terminaciones nociceptivas. Tras aplicar una fuerza, los mecanorreceptores de la porción apical de la raíz responden ante la mínima deformación del ligamento (en condiciones fisiológicas no son capaces de actuar), mientras que los nociceptores solo se activan ante fuerzas intensas, lesiones o mediadores de la inflamación. Una vez activados los mecanorreceptores, como sucede tras la aplicación de una fuerza ortodóncica, se produce la liberación de los neuropéptidos que se almacenan en las terminaciones periféricas y centrales (Krishnan y Davidovitch, 2009). Los

neuropéptidos liberados son el péptido intersticial vasoactivo (VIP), el péptido genéticamente relacionado con la calcitonina (CGRP), sustancia P (SP) (Davidovitch 1991), y metilencefalina (ME) (Yamaguchi y Kasai, 2005).

El aumento de estos neuropéptidos produce vasodilatación y un aumento de la permeabilidad vascular de forma rápida, lo que contribuye a la inflamación local, la extravasación del plasma y por último la extravasación de leucocitos (Yamaguchi y Kasai, 2005; Krishnan y Davidovitch, 2009).

2.3.2. EL PAPEL DE LAS CITOQUINAS

Tras aplicar una fuerza ortodóncica se produce una respuesta inflamatoria aguda, que como se ha comentado, es capaz de generar un aumento de la vasodilatación y de la permeabilidad del LP y producir así, desde los capilares, la migración de leucocitos y otras células.

Las células que migran a través de los capilares, entre ellas los leucocitos, producen varias citoquinas (proteínas extracelulares), las cuales son capaces de interactuar de forma directa o indirecta con una población completa de células nativas paradentales. Estas citoquinas, actúan de forma paracrina o autocrina junto a otras señales moleculares para favorecer la síntesis y la secreción de PG, factores de crecimiento y otras citoquinas, que son mediadores de la inflamación y responsables del remodelado (Krishnan y Davidovitch, 2006). También atraen leucocitos, estimulan fibroblastos, células endoteliales, osteoclastos y osteoblastos, que son capaces de favorecer la remodelación de los tejidos favoreciendo la reabsorción ósea e inhibiendo la formación (Krishnan y Davidovitch, 2009).

Las citoquinas que afectan al metabolismo óseo e intervienen en el movimiento dentario son las que se muestran en la Figura 4 (Krishnan y Davidovitch, 2006; Eugene Roberts, 2017).

Citoquinas participantes en el movimiento dentario	
Interleucina 1 alfa	IL-1 α
Interleucina 1 beta	IL-1 β
Interleucina 2	IL-2
Interleucina 3	IL-3
Interleucina 6	IL-6
Interleucina 8	IL-8
Interleucina 11	IL-11
Interleucina 14	IL-14
Interleucina 13	IL-13
Interleucina 18	IL18
Factor de necrosis tumoral alfa	TNF α
Interferón gamma	IFN γ
Factor de diferenciación osteoclástico	FDO
Ligando del receptor activador para el factor nuclear Kappa	RANKL
Receptor activador para el factor nuclear Kappa	RANK
Osteoprotegerina	OPG

Figura 4. Citoquinas involucradas en el movimiento dentario inducido ortodóncicamente (Krishnan y Davidovitch, 2006; Eugene Roberts, 2017).

La citoquina más potente es la interleucina 1 (IL-1), la cual es capaz de estimular directamente a los osteoclastos. Se distinguen dos IL-1, alfa (α) y beta (β); ambas tienen funciones biológicas similares, como la atracción de leucocitos y la estimulación de fibroblastos, células endoteliales, osteoclastos y osteoblastos (Krishnan y Davidovitch, 2009).

Otra citoquina proinflamatoria conocida y con un papel destacado en el remodelado óseo es el factor de necrosis tumoral (TNF α). El TNF α es capaz de desencadenar inflamación y estimular la reabsorción ósea, gracias a su estímulo directo sobre la diferenciación de precursores de osteoclastos en presencia de factores estimuladores de la colonia de macrófagos (Krishnan y Davidovitch, 2009). El ligando del receptor activador para el factor nuclear Kappa (RANKL), ligando del TNF, es el último regulador

de la formación de osteoclastos y a partir de su activación, muchas hormonas y citoquinas producen su acción reabsortiva (Alhashimi y cols., 2001).

La triada RANKL, receptor activador para el factor nuclear Kappa (RANK) y osteoprotegerina (OPG) presenta un papel importante en el remodelado. En el sistema óseo, el RANKL pertenece al linaje de células osteoblásticas y ejerce su función gracias a la unión con su receptor RANK, localizado en células de linaje osteoclástico. Una vez RANKL se une a RANK, se produce una diferenciación rápida de precursores osteoclásticos hematopoyéticos a osteoclastos maduros. La OPG actúa en este sistema como un receptor de reclamo que producen las células osteoblásticas y compite con el RANK por la unión al RANKL (Theoleyre y cols., 2004). A nivel biológico, la OPG inhibe la fase terminal de la diferenciación de osteoclastos, suprime la activación de osteoclastos de la matriz (Boyle, Simonet y Lacey, 2003) e induce la apoptosis. Por lo tanto, el remodelado óseo es controlado gracias al equilibrio entre la unión RANKL-RANK y la producción de OPG (Theoleyre y cols., 2004).

El interferón gamma ($\text{IFN}\gamma$) es un marcador temprano de la activación inmune que se produce durante la inflamación. Además, ayuda a aumentar la síntesis de otras citoquinas como la IL-1 y el $\text{TNF}\alpha$. Es capaz de sintetizar óxido nítrico, el cual es un potente activador del sistema osteoclastos– osteoblastos, donde primero los osteoclastos se adhieren al hueso para reabsorberlo y tras la fase de reabsorción, los osteoblastos se encargarán de la fase reparativa o de síntesis ósea. El $\text{IFN}\gamma$ tiene a su vez la capacidad de reabsorber el hueso a través de la apoptosis de células T (Krishnan y Davidovitch, 2006).

2.3.3. LAS PROSTAGLANDINAS

Las PG derivan del metabolismo del ácido araquidónico y ayudan en la mediación de la inflamación por medio de la vasodilatación, adhesión de células inflamatorias y permeabilidad vascular (Perkins y Kniss, 1997) (Figura 5).

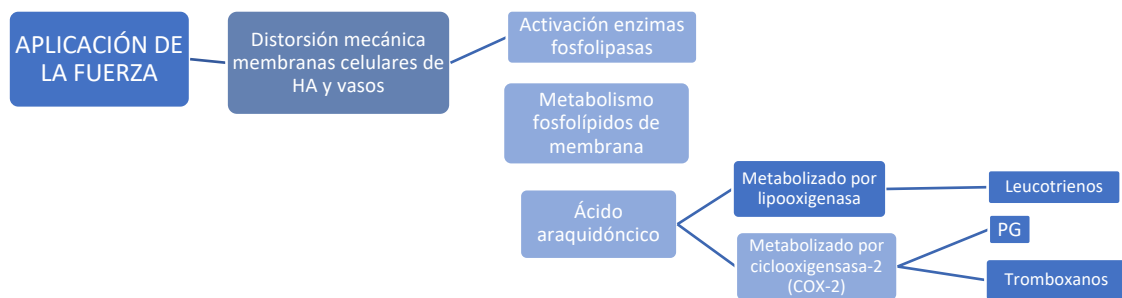


Figura 5. Efectos de la aplicación de la fuerza ortodónica sobre las membranas celulares y vasos sanguíneos. Hueso alveolar, ciclooxigenasa 2 (COX-2), PG (Sandy, Farndale y Meikle, 1993).

Las PG interactúan con los receptores de la membrana celular, de esta manera son capaces de estimular a segundos mensajeros como el AMP cíclico (AMPc) y el inositol fosfato. Esta reacción desencadena una respuesta durante la cual se producen los factores de crecimiento responsables de la formación ósea o aquellos responsables del reclutamiento y activación de osteoclastos (Roberts-Harry y Sandy, 2004), de manera que son capaces de activar la reabsorción ósea (Huang, Williams y Kyrkanides, 2014) (Figura 6).



Figura 6. Efectos de las PG sobre el remodelado óseo (Roberts-Harry y Sandy, 2004).

En el área de compresión, se pueden observar altos niveles de COX-2, que es capaz de catalizar la producción de prostaglandina 2 (PG₂) gracias al metabolismo del ácido araquidónico (Huang, Williams y Kyrkanides, 2014). La PG₂ tiene un papel importante en la reabsorción ósea, tiene la capacidad de estimular la diferenciación de osteoclastos aumentando la concentración de AMPc (Krishnan y Davidovitch, 2006). Otros factores de crecimiento, hormonas como la PTH, interleucinas y otras citoquinas son también capaces de activar la producción de la PG₂ (Perkins y Kniss, 1997).

2.3.4. LOS FACTORES DE CRECIMIENTO

Los factores de crecimiento son producidos principalmente en el hueso. El hueso contiene grandes cantidades de conversor de TGF β y tiene la capacidad de actuar sobre el remodelado óseo permitiendo la diferenciación de osteoclastos a partir de células hematopoyéticas estimulados por el RANKL (Krishnan y Davidovitch, 2006). La clave de la regulación celular de este proceso son los osteoblastos, que presentan receptores para muchas hormonas y factores de crecimiento que facilitan el remodelado (Roberts-Harry y Sandy, 2004).

Otros factores de crecimiento conocidos son el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento de insulina (IGF). El IGF constituye una familia de polipéptidos que favorecen la proliferación y diferenciación de osteoblastos y síntesis de matriz ósea; además, tiene efectos metabólicos en la producción de la insulina. (Wildemann y cols., 2004). El hígado es el principal órgano productor de este factor de crecimiento en humanos. En las células óseas, su acción se regula por varios factores locales y sistémicos como son la hormona del crecimiento, la PTH, la vitamina D3, los corticoesteroides, el TGF β , la IL-1 y los factores de crecimiento derivados de las plaquetas (Krishnan y Davidovitch, 2009).

2.3.5. LAS METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACELULAR

Las MMPS constituyen una familia de enzimas proteinasas que juegan un papel importante en el remodelado, tanto de la matriz del LP como del hueso alveolar (tejido conectivo óseo) (Chang y cols., 2002).

Estas enzimas forman parte de una familia de endopeptidasas dependientes del Zinc que se expresan en niveles bajos en tejidos adultos normales y son capaces de regular el remplazo de la matriz extracelular de los tejidos conectivos (Nichols y cols., 2016).

Son producidas por fibroblastos (Chang y cols., 2002), osteoblastos y osteoclastos (Tsuge, Noda y Nakamura, 2016). Los osteoblastos, en respuesta a los factores de crecimiento, secretan MMPS capaces de eliminar la capa de osteoide no mineralizada, haciendo más fácil el acceso a la capa mineralizada a los osteoclastos. Por tanto, la secreción de las MMPS por parte de los osteoblastos permite que estas células jueguen

un papel importante en la reabsorción ósea. Los osteoclastos también producen estas proteinasas y junto a las proteinasas cisteína lisosomales (catpsin K), actúan en la degradación ósea (Vernillo y cols., 1994).

Las MMPS también están involucradas en la división y activación de otras MMPS (Capelli y cols., 2011).

Según su estructura molecular primaria, se clasifican en distintos grupos. Las MMPS más relevantes en el remodelado del LP son las collagenasas y las gelatinasas (ambas se complementan durante la degradación del colágeno fibrilar), también se han descrito las estromelisin, las matrilisin, MMPS tipo membrana y un grupo mixto (Şurlin y cols., 2014). Entre las collagenasas, encontramos las MMPS 1, 8 y 13. Las MMP-2 y MMP-9, se clasifican como gelatinasas. Las estromelisin, incluyen las MMPS 3, 10 y 11. Por otro lado, entre las MMPS de tipo membrana, encontramos las MMPS 14, 15, 16 y 17, y por último existe un grupo mixto de MMPs (Van Beurden y cols., 2005; Takahashi y cols., 2006).

Las MMPS actúan junto a sus inhibidores de tejidos (TIMPS), ambos son de gran importancia en el remodelado del LP. Los TIMPS son capaces de controlar la ruptura de la matriz extracelular llevada a cabo por parte de las MMPS, inhibiendo su actividad. En situaciones como la enfermedad periodontal se puede observar una alteración del equilibrio entre las MMPS y los TIMPS (Apajalahti y cols., 2003).

El fluido crevicular se encuentra en el margen gingival y se describe como un trasudado o exudado, cuya cantidad varía en función de la inflamación gingival, alcanzando niveles de 0,05 a 0,20 µl por minuto en casos de mínima inflamación (Krishnan y Davidovitch, 2006). La producción de MMPS y TIMPS se ve afectada tanto por la aplicación de la fuerza ortodóncica como por el tipo de fuerza aplicada (Cantarella, y cols., 2006); se han observado cambios en los niveles de estos en el fluido crevicular tras el movimiento ortodóncico. Los niveles de TIMP-1 parecen aumentar tanto en el lado donde se reabsorbe hueso como en el lado donde se deposita, teniendo un papel importante tanto en la aposición como en la reabsorción ósea (Bildt y cols., 2009).

Distintos autores han detectado la presencia MMP-3, MMP-7 y MMP-12 en el fluido crevicular de pacientes bajo tratamiento ortodóncico, tanto en zonas de tensión como en zonas de presión. Estas MMPS son capaces de catalizar la degradación inicial de la mayoría de la matriz extracelular del LP (Capelli y cols., 2011; Canavaro, Palmier y Capelli, 2013).

Otras MMPS que también han sido detectadas en fluido crevicular gingival, son MMP-1 y MMP-2, estas se han cuantificado en las primeras fases del movimiento dentario tanto en las zonas de tensión como en las zonas de presión y están implicadas en varias etapas del remodelado del colágeno, catalizando la degradación inicial de la mayoría de las proteínas extracelulares de la matriz (Apajalahti y cols., 2003; Cantarella y cols., 2006; Takahashi y cols., 2006; Canavaro, Palmier y Capelli, 2013). Las MMP-1 también se asocian al remodelado óseo fisiológico y son capaces de hidrolizar sobretodo colágeno tipo III (Apajalahti y cols., 2003).

Por otro lado, se ha sugerido que la MMP-8 tiene un papel importante en el remodelado temprano del LP que tiene lugar durante el movimiento ortodóncico. Su expresión se encuentra elevada en el fluido crevicular entre las 4 y 8 horas tras la aplicación de la fuerza (Apajalahti y cols., 2003; Canavaro, Palmier y Capelli, 2013). Su acción principal es sobre el colágeno tipo I, siendo de gran importancia en la destrucción y remodelado de la matriz, como ha sido comprobado tanto en estudios *in vitro* (Takahashi y cols., 2003) como *in vivo* (Ingman y cols., 2005). También actúa en la degradación del colágeno tipo II y III (Şurlin y cols., 2014).

La gelatinasa MMP-9, conocida como gelatinasa B, tiene la capacidad de degradar el colágeno y las gelatinas (Chen y cols., 2013) y juega un papel importante en la migración de osteoclastos y sus precursores durante la osteoclastogénesis (Xie, Kuijpers-Jagtman y Maltha, 2009). Esta MMPS aumenta su expresión de manera estadísticamente significativa durante el movimiento de ortodoncia en las zonas de compresión, manteniendo sus niveles de forma elevada desde las 4 horas hasta 7 días después de la aplicación de las fuerzas (Grant y cols., 2013). Otros estudios hablan de que se expresa a partir de la primera hora de aplicación de la fuerza y que sus niveles descienden trascurridas 24 horas (Cantarella y cols., 2006; Takahashi y cols., 2006; Capelli y cols., 2011).

La colagenasa MMP-13, también desempeña un importante papel en el remodelado, tanto del LP como del hueso alveolar, durante el movimiento ortodóncico. La expresión de los genes de esta MMP es inducida por las fuerzas de compresión y tensión que se producen (Takahashi y cols., 2006). Su función principal consiste en disolver el colágeno fibrilar, como sucede con el resto de las colagenasas (Canavaro, Palmier y Capelli, 2013).

2.3.6. ESTRÉS OXIDATIVO EN EL MOVIMIENTO DENTARIO ORTODÓNCICO

El estrés oxidativo se define como una alteración en el equilibrio de los procesos de oxidación-reducción, donde el cambio en el equilibrio se dirige hacia la oxidación (Halliwell y Gutteridge, 2007). Es decir, un desequilibrio entre algunas especies moleculares altamente reactivas y el mecanismo de defensa antioxidante (Betteridge, 2000; Valko, y cols., 2007).

Durante el tratamiento ortodóncico se produce una reacción inflamatoria que modifica el estado oxidante/antioxidante (Buzko, 2017) y este estado, a su vez, también favorece la expresión de citoquinas proinflamatorias, entre ellas el TNF α y IL-1 β (Gao y cols., 2015). Esta alteración provoca una producción excesiva de radicales libres de oxígeno muy reactivos, capaces de activar la peroxidación lipídica y de dañar proteínas, ácidos nucleicos, carbohidratos y otras moléculas orgánicas. Uno de los principales puntos de actuación del estrés oxidativo es el ADN, que puede ser modificado por este proceso (Reaven, 1988; Pilger y Rüdiger, 2006), interrumpiendo la correcta función celular (Padgett y cols., 2013; Reaven, 1988). Estas especies reactivas se originan principalmente a partir de polimorfonucleares, monocitos, linfocitos, plaquetas, osteoclastos y fibroblastos (Padgett y cols., 2013).

La inflamación se caracteriza por la infiltración de leucocitos, entre ellos, leucocitos polimorfonucleares. Los polimorfonucleares tienen gránulos que contienen mieloperoxidasa (MPO), esta enzima produce moléculas oxidantes que pueden originar la peroxidación lipídica. Su presencia aumentada indica daño oxidativo (Navarro-Palacios y cols., 2014). La MPO se ha podido cuantificar en fluido crevicular (Cao y Smith, 1989; Navarro-Palacios y cols., 2014; Fatima y cols., 2017).

El producto final del proceso de peroxidación lipídica es el malondialdehído (MDA), por lo que su cuantificación también determina el daño oxidativo causado a los lípidos debido a la acción de los radicales libres (Kara y cols., 2013). El MDA se ha cuantificado tanto en orina (Monea y cols., 2014) como en saliva (Sema y cols., 2014)

Por tanto, ambos, la MPO (Navarro-Palacios y cols., 2014) y el MDA (Atuğ Özcan y cols., 2014) son considerados marcadores biológicos para cuantificar la inflamación y, por tanto, el estrés oxidativo, que tiene lugar durante el movimiento ortodóncico.

2.4. DIABETES MELLITUS

La diabetes es una enfermedad crónica que constituye un problema de salud pública debido a su alta prevalencia a nivel mundial. La prevalencia de esta enfermedad se ha visto incrementada en las últimas décadas, desde 1980 el número de diabéticos se ha duplicado, alcanzando a un 9,3% de la población mundial. Unos 463 millones de personas son diabéticas (IDF diabetes atlas, 2019).

La diabetes mellitus supone una alteración en la tolerancia a la glucosa o en el metabolismo de lípidos y carbohidratos, debido a una deficiencia en la producción de insulina o una alteración en la insulina que se produce (Asociación Americana Periodoncia, 2000). Banting, Campbell y Fletcher (1923) demostraron el papel de la insulina en el metabolismo de la glucosa, pero no fue hasta 1930 cuando se distinguió por primera vez entre dos tipos de diabetes, clasificadas entonces como diabetes sensible a la insulina y diabetes no sensible a la insulina. En los siguientes años, estas observaciones clínicas pudieron ser corroboradas, aportando diferencias tanto fisiopatológicas como bioquímicas entre estos dos tipos de enfermedad. En 1979 se acuñaron los términos diabetes mellitus tipo I (insulinodependiente) y diabetes mellitus tipo II (no insulinodependiente) (Zaccardi y cols., 2016).

En ambos tipos de diabetes la característica principal es la hiperglucemia, ya sea por la incapacidad de segregar insulina, la incapacidad de la insulina para actuar o ambas (Kerner y Brückel, 2014). La más prevalente es la diabetes mellitus tipo II, constituyendo entre el 85 y el 90% de los casos (WHO, 2016). Las diferencias entre la diabetes mellitus tipo I y la diabetes mellitus tipo II radican en su fisiopatología. En la diabetes mellitus

tipo I se produce una destrucción de las células β de los islotes de Langerhans, localizadas en el páncreas, que provoca una deficiencia absoluta de insulina; normalmente esta entidad está mediada por mecanismos inmunes y su aparición suele darse a una edad temprana. La diabetes mellitus tipo II se puede presentar de dos formas: como una resistencia predominante a la insulina con escasa deficiencia de ésta como una secreción deficiente de insulina, además de resistencia a ella; es decir, el cuerpo no es capaz de responder a la cantidad de insulina que se produce y frecuentemente se asocia a otros problemas metabólicos (Kerner y Brückel, 2014).

La insulina tiene un papel importante en la regulación de la glucosa en sangre, se sintetiza por las células beta del páncreas y se secreta rápido al torrente sanguíneo como respuesta a los picos de azúcar en sangre, manteniendo así la homeostasis de la glucosa. Además de su papel en el metabolismo de la glucosa, también estimula la lipogénesis y disminuye la lipólisis, aumentando el transporte de aminoácidos en las células para que éstos se transformen en triglicéridos y reservas proteicas (Lalla y D'Ambrosio, 2001). Los niveles de glucosa en sangre normales se mantienen entre los 60 y los 150 miligramos por decilitro a lo largo del día. La diabetes puede ser detectada mediante diversas pruebas. Por un lado, se puede calcular la glucosa en el plasma sanguíneo en cualquier momento del día, si su cifra es igual o mayor de 200 mg/dl y además se presentan síntomas, nos encontramos ante diabetes. Otra forma es cuantificar la glucosa en plasma en ayunas, tras 8 horas sin ingesta de alimento, en este caso la diabetes será positiva si sus niveles son mayores o iguales a 126 mg/dl. Por último, se puede medir la glucosa postprandial, tras la ingesta de comida; aunque este método no es el mejor para detectar la diabetes, se considera positivo cuando sus valores superen los 200 mg/dl (Asociación Americana Periodoncia, 2000).

Por lo general, los signos y síntomas que caracterizan a la diabetes mellitus incluyen poliuria, polidipsia y polifagia, además de pruritis en lugares como la piel, el recto o la vagina, debilidad general y fatiga (Rees, 1994). Se trata de una enfermedad con diversas complicaciones, pudiendo afectar a distintas partes del cuerpo y ocasionando problemas de corazón, derrames cerebrales, alteraciones de la cicatrización, fallos renales (nefropatías), pérdida de visión (retinopatías) y daños a nivel nervioso (neuropatías) (WHO, 2016); estas alteraciones son debidas principalmente a los trastornos

microvasculares y macrovasculares que se producen como consecuencia de esta enfermedad (Kerner y Brückel, 2014).

2.4.1. LA DIABETES MELLITUS Y LA SALUD PERIODONTAL

La enfermedad periodontal es una condición inflamatoria crónica que se caracteriza por la destrucción de tejidos de soporte dental (el LP y el hueso alveolar). Es más prevalente y severa en pacientes diabéticos, siendo una de sus posibles complicaciones de salud (Løe, 1993). Según la Asociación Americana de Periodoncia (2000), la diabetes mellitus no controlada médicamente aumenta el riesgo de enfermedad periodontal tanto por la mayor susceptibilidad a la infección de estos pacientes, como por su mayor tendencia a sufrir problemas micro y macro vasculares, pérdida ósea y pérdida de tejidos de soporte. Se puede considerar que su relación es bidireccional (Mealey, 1999), la diabetes incrementa el riesgo de periodontitis, y la inflamación periodontal afecta negativamente al control de la glucemia (Preshaw y cols., 2012).

El estado inflamatorio es clave en la asociación entre la diabetes y la enfermedad periodontal (Mealey y Oates, 2006). Tanto en la enfermedad periodontal como en la diabetes mellitus se produce una respuesta inflamatoria caracterizada por la secreción descontrolada de mediadores de la inflamación como la IL-1 β , la IL-6, la IL-12, la IL-18, el TNF α , la PG2, el RANKL y las MMPS -8, -9 y -13 (Dandona, Aljada y Bandyopadhyay, 2004; Preshaw y Taylor, 2011). Además, en los pacientes diabéticos, se puede observar una disminución de la quimiotaxis de los polimorfonucleares, que aumentan sus niveles en los tejidos periodontales, lo que favorece la liberación continua de MMPS y especies reactivas de oxígeno, las cuales provocan destrucción de tejidos (Naguib y cols., 2004). Otro elemento que juega un papel importante en los pacientes diabéticos son los productos de glicosilación avanzada, su acumulación en los tejidos periodontales influye en la inflamación periodontal. La unión de estos a su receptor produce mediadores de la inflamación. La formación de los productos terminales de glicosilación avanzada produce un aumento de las especies reactivas de oxígeno que aumentan el estrés oxidativo y puede complicar los síntomas de la diabetes mellitus y además puede producir alteraciones en el metabolismo óseo (Vlassara, 2001).

Es por ello, por lo que se considera que el tratamiento ortodóncico en estos pacientes puede ser complicado debido a la mala salud periodontal que puedan presentar.

2.4.2. PAPEL DE LA DIABETES MELLITUS EN EL REMODELADO ÓSEO

Muchos estudios sugieren una asociación entre la diabetes, la osteopenia y la osteoporosis; siendo esta última, una complicación frecuente de esta enfermedad. Se ha demostrado que en la diabetes mellitus se producen grandes alteraciones en el metabolismo óseo y mineral (Giglio y Lama, 2001).

La diabetes mellitus puede comprometer la microarquitectura ósea, ya que da lugar a una alta tasa de apoptosis de osteoblastos, disminución de su diferenciación y un aumento de la reabsorción ósea mediada por osteoclastos (Vianna, Sanches y Barreto, 2017). Se ha podido comprobar que la diabetes mellitus no controlada médicamente afecta a la arquitectura y altera la tasa de formación de hueso mandibular dando lugar a osteopenia, como consecuencia de un desequilibrio entre la formación y la reabsorción del hueso (Abassy, Watari y Soma, 2010).

El remodelado óseo es un proceso esencial durante el movimiento dentario, este se controla por el equilibrio que existe entre la unión RANK con su ligando RANKL y la OPG (Krishnan y Davidovitch, 2009). El aumento de RANKL y el descenso de la OPG permite la diferenciación de los osteoclastos y, por tanto, el inicio de la reabsorción (Krishnan y Davidovitch, 2006). Tras analizar las concentraciones en plasma de marcadores del metabolismo óseo en pacientes con diabetes mellitus tipo I, se observó que existía una menor concentración de osteocalcina, una menor ratio RANKL/OPG y una menor cantidad de OPG (Lappin y cols., 2009). En la diabetes mellitus tipo II también se ha observado una disminución de la OPG y un aumento de RANKL, lo que produce mayor reabsorción ósea (Nuche-Berenger y cols., 2009).

Existe controversia en cómo la diabetes influye en el movimiento dentario inducido por ortodoncia. Autores como Arita y cols. (2016) y Santamaria-Jr y cols. (2019) afirmaron que el movimiento dentario en condiciones de salud era significativamente mayor, por tanto, había una pérdida de efectividad cuando este se asociaba a diabetes. Sin embargo, Braga y cols. (2011) y Mena Laura y cols. (2019), afirmaron que existía una

mayor cantidad de movimiento dentario en presencia de diabetes mellitus. Mientras que Lopes Ferreira y cols. (2018) no encontraron diferencias significativas en la cantidad de movimiento dentario en presencia o ausencia de diabetes.

Cuando la diabetes mellitus no está controlada medicamente, se ha recomendado que el paciente no debe recibir tratamiento ortodóncico, puesto que hasta que no se normalice su estado metabólico, la aplicación de fuerzas puede ocasionar efectos deletéreos, como la aceleración de la degradación del ligamento periodontal (Villarino, Lewicki y Ubios, 2011). Por ello, la regulación de los niveles de glucosa en sangre mediante la administración de insulina puede reducir estas respuestas dañinas ante la aplicación de fuerzas ortodóncicas (Arita y cols., 2016).

2.4.3. PAPEL DE LA DIABETES MELLITUS EN EL REMODELADO DEL LIGAMENTO PERIODONTAL

La diabetes mellitus es una enfermedad de tipo inflamatoria donde se produce la expresión elevada de MMPS, de hecho, son consideradas biomarcadores de esta enfermedad (Yaras y cols., 2008; Preshaw y cols., 2012). Las MMPS tienen un papel importante en el remodelado del LP (Şurlin y cols., 2014). En la diabetes se pueden observar niveles aumentados de las MMP-2 (Gharagozlian y cols., 2009), MMP-7, MMP-8 (Hardy y cols., 2012), MMP-9 (Smith y cols., 2004; Şurlin y cols., 2014) y MMP-13. Estas MMPS también se encuentran elevadas en pacientes con enfermedad periodontal (Şurlin y cols., 2014).

El movimiento dentario inducido ortodóncicamente se asocia al remodelado del colágeno en el LP (Li y cols., 2010), en parte atribuido a la modulación de fibroblastos por parte de proteasas como la MMP-1 (Redlich y cols., 2004). En condiciones de salud, sin patología diabética previa, se observa que tras la aplicación de una fuerza ortodóncica se produce un aumento de la MMP-1. La MMP-1 tiene la función de degradar el colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Más tarde, para regular la degradación del colágeno, el inhibidor de la MMP-1 (TIMP-1) aparece y se encarga de detener la degradación y establecer así el equilibrio (Zhang, Li y Bi, 2011).

La actividad de las MMPS y sus inhibidores TIMPS se ven alterados tanto en la enfermedad periodontal como en la diabetes. Zhang, Li y Bi (2011) comprobaron que tras aplicar una fuerza ortodóncica en un paciente con diabetes mellitus, se observaba un desequilibrio entre la MMP-1 y su inhibidor TIMP-1, donde los niveles de MMP-1 aumentaban de forma excesiva y el TIMP-1 era incapaz de inhibir su función. Este desequilibrio producía una destrucción de colágeno tipo I en el LP de forma sostenida. Como consecuencia de este desequilibrio, la acción de los osteoclastos se retardaba, lo que concluía en una degradación y remodelación del LP de forma prolongada (Li y cols., 2010).

Los pacientes diabéticos son, por tanto, más susceptibles al daño tisular inducido por el estrés mecánico de la aplicación de una fuerza ortodóncica (Zhang, Li y Bi, 2011). Es por ello importante considerar a este tipo de pacientes a la hora de comenzar un tratamiento ortodóncico, puesto que su estado de hiperglicemia produce un déficit del metabolismo proteico capaz de aumentar la ruptura del colágeno e incluso retardar la curación (Abbassy y cols., 2015).

2.4.4. EL ESTRÉS OXIDATIVO Y LA DIABETES MELLITUS

El estrés oxidativo ha sido considerado un punto de unión entre enfermedades sistémicas y orales (Li y cols., 2000), de manera que presenta un papel importante en la patogénesis de muchas de estas alteraciones (Valko y cols., 2007). Existen muchas secuencias metabólicas asociadas a la hiperglicemia capaces de incrementar las especies reactivas de oxígeno (Yamamoto y cols., 2004).

La hiperglicemia de los pacientes con diabetes provoca un aumento de los niveles de glucosa tanto en sangre, como en los fluidos orales (saliva y fluido crevicular). En estos casos, también se produce un aumento en la concentración de los productos finales de glicosilación avanzada y cuando estos interactúan con sus receptores son capaces de mediar los efectos a largo plazo de la expresión de citoquinas y factores de crecimiento; produciéndose finalmente una respuesta inflamatoria inducida por estos productos que puede degradar el tejido conectivo y por tanto el periodontal (Soell y cols., 2007).

Tanto los niveles de MPO como de MDA en fluido crevicular, se han utilizado como biomarcadores para determinar el grado de inflamación y el estrés oxidativo, ambos se encuentran alterados en los pacientes diabéticos. En cuanto a la MPO, se observa mayor actividad en los pacientes diabéticos que en los pacientes normoglicémicos, ya que la diabetes altera la respuesta inflamatoria y aumenta la expresión de marcadores de la inflamación (Santamaria-Jr y cols., 2019). Los niveles de MDA, también se ven aumentados (Draper y Hadley, 1990; Patil y cols., 2016) lo que sugiere un aumento de la peroxidación lipídica y una alteración local del mecanismo de defensa antioxidante (Monea y cols., 2014).

3. JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo I es una enfermedad autoinmune crónica donde la deficiencia de insulina desemboca en hiperglicemia (DiMeglio, Evans-Molina y Oram, 2018). Esta afección puede provocar una alta tasa de complicaciones y en determinados casos puede incluso derivar en mortalidad, si su diagnóstico es equivoco y no se administra la insulina necesaria (IDF diabetes atlas, 2019). Este tipo de diabetes aparece con mayor incidencia en la infancia (Kerner y Brückel, 2014), entre los 10 y los 14 años (Forga y cols., 2013). Los pacientes con diabetes mellitus tipo I deben ser vigilados de cerca cuando entran en la adolescencia, momento en el que incluso los cambios de estilos de vida o el cuidado de la salud pueden afectar al estado de su enfermedad (Monaghan, Helgeson y Wiebe, 2015). Aunque su aparición es más común en jóvenes, la diabetes mellitus tipo I también puede aparecer en adultos (DiMeglio, Evans-Molina y Oram, 2018).

En las últimas décadas, la diabetes mellitus ha visto aumentada considerablemente su prevalencia a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud en el año 2000 el número de individuos diabéticos registrados era de 151 millones, mientras que en el año 2019 se registraron 463 millones de personas diabéticas. Esto supone que un 9,3% de la población padece esta enfermedad, con un aumento exponencial en tan solo 20 años.

De los 463 millones de casos con diabetes a nivel mundial, la diabetes mellitus tipo I supone un 10% (IDF diabetes atlas, 2019). En las últimas décadas, se han producido

cambios en los estilos de vida y en los hábitos de la población, que han derivado en un aumento de la incidencia y prevalencia de esta enfermedad (Mobasseri y cols., 2020). Así, el consumo de una dieta basada fundamentalmente en alimentos procesados favorece tanto el sobrepeso como la carencia de vitaminas como la D, la cual se considera un factor protector gracias a su influencia en la regulación del sistema inmune y de las rutas metabólicas relacionadas con la diabetes (Rewers y Ludvigsson, 2016). Además, estas alteraciones de la dieta pueden derivar en la disminución de la diversidad de la microbiota intestinal, la cual está implicada en la modulación de inmunopatologías extra-intestinales como la diabetes mellitus tipo I (Fenneman y cols., 2020). Por otro lado, estos cambios en los estilos de vida saludables, unidos a la propia evolución del ser humano, desembocan en el desarrollo precoz y rápido crecimiento de los niños, el cual se produce cada vez a edades más tempranas, factor que también se asocia con el desarrollo de esta entidad (Rewers y Ludvigsson, 2016). También, se ha determinado que el aumento del estrés psicológico, condicionado por el estilo de vida al que estamos sometidos en la sociedad actual puede haber influido en el aumento en la incidencia de esta enfermedad (Rewers y Ludvigsson, 2016).

En el movimiento dentario ortodóncico el estrés biomecánico producido por la aplicación de las fuerzas genera una respuesta inflamatoria que aumenta el estrés oxidativo (Betteridge, 2000) y provoca el remodelado óseo y del LP (Takahashi y cols., 2013). En la diabetes mellitus tipo I, se producen modificaciones del metabolismo que alteran la resolución de la inflamación y la reparación de los tejidos. Los pacientes diabéticos, incluso aquellos tratados con insulina presentan alteraciones del metabolismo óseo. Por esta razón, a menos que la diabetes esté bien tratada, se acepta que habrá un riesgo real de degradación acelerada del LP durante el tratamiento ortodóncico (Villarino, Lewicki y Ubios, 2011).

Las MMPS tienen un papel crucial en el remodelado de la matriz extracelular del LP y del hueso alveolar. La MMP-8 se incluye entre las colagenasas y es capaz de degradar el colágeno intersticial de los tipos I, II y III. Una mayor expresión de esta MMP ha sido observada en la encía de pacientes diabéticos al ser comparada con individuos sanos, asociándose su expresión a la enfermedad periodontal (Şurlin y cols., 2014). La MMP-9, conocida como gelatinasa B, tiene la capacidad de degradar el colágeno y las gelatinas (Chen y cols., 2013), jugando también un papel esencial en la migración de los

osteoclastos y sus precursores durante la osteoclastogénesis (Xie, Kuijpers-Jagtman y Maltha, 2009). Una expresión intensa de MMP-9 ha sido observada en pacientes con diabetes y periodontitis (Şurlin y cols., 2014).

Tanto el estrés oxidativo (Buzko, 2017) como la expresión de las MMP-8 (Apajalahti y cols., 2003; Canavaro, Palmier y Capelli, 2013) y MMP-9 (Grant y cols., 2013), han sido estudiados durante el movimiento ortodóncico. Sin embargo, hasta dónde nosotros conocemos, la posible alteración de estos parámetros durante el movimiento dentario ortodóncico en pacientes diabéticos no ha sido evaluada. Esto, sumado a la alta demanda de tratamientos ortodóncicos en niños y adolescentes (población más afectada por la diabetes mellitus tipo 1), y al aumento de su incidencia y prevalencia en las últimas décadas, hace necesario investigar los efectos de la diabetes en el movimiento dentario ortodóncico. De esta forma, el ortodoncista podrá conocer las implicaciones clínicas de realizar un tratamiento de ortodoncia en pacientes con esta enfermedad.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1. HIPÓTESIS

El movimiento dentario inducido por una fuerza ortodóncica se produce como consecuencia de una respuesta inflamatoria que da lugar al remodelado del hueso alveolar y del LP. Dado que la diabetes mellitus es una enfermedad en la que se encuentra alterada tanto la capacidad de resolución de la inflamación como de reparación del daño tisular, nos planteamos las siguientes hipótesis:

Hipótesis nula: “La diabetes no altera la respuesta inflamatoria derivada de la aplicación de una fuerza ortodóncica, ni el remodelado de los tejidos periodontales; así como tampoco influye en la cantidad de movimiento dentario que se produce”.

Hipótesis alternativa: “La diabetes altera la respuesta inflamatoria derivada de la aplicación de una fuerza ortodóncica, así como el remodelado de los tejidos periodontales; influyendo en la cantidad de movimiento dentario que se produce”.

4.2. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la influencia de la diabetes mellitus en la respuesta inflamatoria, el estrés oxidativo, la cantidad de movimiento dentario y el remodelado del LP periodontal tras la aplicación de una fuerza ortodóncica.

4.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar la actividad MPO en muestras gingivales tomadas alrededor del primer molar maxilar derecho a las 24, 48, 72 horas y a la semana de la aplicación de una fuerza ortodóncica.
- Determinar el nivel de MDA en muestras gingivales tomadas alrededor del primer molar maxilar derecho a las 24, 48, 72 horas y a la semana de la aplicación de una fuerza ortodóncica.
- Cuantificar el movimiento dentario mediante micro-CT a las 24, 48, 72 horas y a la semana de la aplicación de una fuerza ortodóncica.
- Evaluar la orientación de las fibras del LP mediante un análisis histológico con tinción de hematoxilina-eosina a las 24, 48, 72 horas y a la semana de la aplicación de una fuerza ortodóncica.
- Determinar mediante tinción inmunohistoquímica la expresión de las MMP-8 y MMP-9 a nivel del LP a las 24, 48, 72 horas y a la semana de la aplicación de una fuerza ortodóncica.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El protocolo de estudio de este proyecto fue aprobado por el Comité de Bioética (281/2016) y la autoridad local competente (A13170704) de la Universidad de Murcia, y se siguieron las guías de la Unión Europea para la experimentación animal (EU/63/2010) (Anexo 1). El estudio fue llevado a cabo siguiendo los requisitos de actuación de investigación animal: guías de experimentos In Vivo (ARRIVE).

Para calcular un tamaño de la muestra representativo, se requirió una potencia del 80% (nivel alfa 5%).

Un total de 60 ratas adultas Sprague-Dawley macho, con un peso entre los 246 y 254 gramos (media de peso de 250 gramos), fueron incluidas en este estudio prospectivo randomizado que tuvo lugar entre enero de 2018 y octubre de 2019.

Las ratas se almacenaron en jaulas ventiladas individuales, con ciclos 12/12 horas de luz/oscuridad, y se alimentaron y bebieron a voluntad. Las ratas fueron alimentadas con una nutrición completa, alta en carbohidratos, diseñada para ratas y ratones de experimentación (Pb Panlab, Barcelona, España), previamente triturada (Robot Coupe® Borgoña, Francia) con el fin de proporcionarles una dieta semiblanda. Las ratas fueron aclimatadas durante una semana antes de comenzar el estudio.

5.2. ALEATORIZACIÓN

La aleatorización fue llevada a cabo usando el servicio online <http://www.randomization.com>.

Las ratas fueron distribuidas aleatoriamente en tres grupos (n=20 por grupo):

Grupo 1: Normoglicémicas.

Grupo 2: Diabéticas sin tratamiento.

Grupo 3: Diabéticas tratadas con insulina.

5.3. INDUCCIÓN DE LA DIABETES MELLITUS TIPO I

La diabetes mellitus tipo I fue inducida en los Grupos 2 y 3 (n=40) mediante la administración de una única dosis intraperitoneal de estreptozotocina (STZ) (Sigma-Aldrich Chemistry, S.A., Madrid, España) de 55 mg/kg disuelta en 0,5 ml de tampón citrato (50 mM; pH 4,5), manteniendo la preparación en la oscuridad hasta el momento de la administración (Nascimento-Saba, Breitenbach y Rosenthal, 1997). Para prevenir la posibilidad de hipoglucemia causada por la presencia de altos niveles de insulina en sangre debido a la destrucción de las células pancreáticas β , se añadió glucosa al agua de

los animales (60 gramos de glucosa por cada 500 ml de agua). 10 días después de la administración intraperitoneal de STZ, los niveles de glucosa en sangre fueron monitorizados a través de una punción realizada en la vena de la cola de cada rata, midiendo los niveles de glucosa con el sistema Accu-Chek® Performa Nano (Roche, Barcelona, España). Los animales que presentaron niveles de glucosa superiores a 200 mg/dl fueron considerados diabéticos. Los niveles de glucosa fueron comprobados regularmente y de forma continua para asegurar que presentaban diabetes tipo I durante todo el estudio (Barbirato, 2018).

En los animales del Grupo 3 la administración de insulina comenzó 11 días después de la inyección de STZ (una vez comprobado que los niveles de glucosa eran >200 mg/dl). Se les inyectó diariamente insulina humana subcutánea (Sigma-Aldrich Química, S.L, Madrid, España), ajustando la dosis a los requerimientos de cada animal. A los grupos 1 y 2 se les inyectó una solución salina.

5.4. PROCEDIMIENTO ORTODÓNCICO

Todos los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina al 50% (Ketamidor®, RitcherPharma AG, Wels, Austria) y xilazina al 50% (Xilagesic®, Laboratories Calier S.A, Barcelona, España) administrada mediante una inyección intraperitoneal, utilizando una dosis de 0,1 ml/100 gramos del peso corporal.

Cuando se consiguió la anestesia general, se colocó una ligadura metálica de 0,012” de diámetro alrededor del primer molar superior (M1) derecho, la cual se encontraba ligada a un muelle (200 gramos, muelle cerrado Ni-Ti 0,010” x 0,030”, bobina 21”. Imperortho® Alcira, Valencia, España) que fue activado mediante otra ligadura de metal de 0,012” de diámetro que se ligó a su extremo libre y se fijó a los incisivos mediante ligado. Con el fin de asegurar la retención de la ligadura, se aplicó sobre ella y a su alrededor el autograbante Transbond Plus Self Etching primer (3M Unitek, Monrovia, California, EE.UU.) y la resina de composite Transbond XT (3M Unitek, Monrovia, California, EE.UU.) (Figura 7). El muelle liberaba una fuerza de 0,2 N.

Cinco ratas de cada grupo fueron sacrificadas a través de la inhalación de CO₂ a las 24 horas, 48 horas, 72 horas y a la semana tras la colocación del aparato ortodóncico.



Figura 7. Fotografía del aparato ortodóncico usado para mesializar el M1 derecho.

5.5. MEDICIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA MPO Y DEL MDA

Se obtuvieron dos muestras gingivales de alrededor del primer molar maxilar derecho utilizando un bisturí circular de 3 mm de diámetro (biopsia tipo punch) (Laboratorios Stiefel, Madrid, España), y se introdujeron en una solución tampón fosfato (PBS), congelándose a -80° C hasta ser procesadas.

Tras descongelar las muestras en un baño único tras un ciclo de descongelado (Trevisan y cols., 2001; Block y cols., 2002; Tsimikas, 2006), se midieron los niveles de MPO y MDA, siendo ambos biomarcadores de la inflamación y del estrés oxidativo.

Para la cuantificación de los niveles de MPO en las muestras gingivales, el tejido fue procesado mediante la técnica descrita por Souza y cols. (2003). Las muestras fueron homogeneizadas en dos volúmenes de solución tampón para congelarlas (0,1 mol/l de NaCl; 20 mmol/l NaPO₄; 15 mmol/l NaEDTA) con un pH de 4,7 y se centrifugó a 0,8 g durante 15 minutos. El precipitado se sometió a lisis hipotónica (solución de 900 µl de 0,2% NaCl durante 30 segundos y después un volumen equivalente de 1,6% NaCl, añadiendo un 5% de glucosa). Tras centrifugar una segunda vez, el precipitado quedó resuspendido en 50 mmol/l de tampón NaPO₄ a un pH de 5,4, conteniendo un 0,5% de

bromuro de hexadeciltrimetilamonio, siendo otra vez re-homogeneizado y centrifugado a 9,3 g durante 15 minutos a 4° C. La actividad MPO en el precipitado resuspendido fue cuantificada mediante espectrofotometría, midiendo los cambios en absorbancia a 450 nm usando una solución de tetrametilbezidina (1,6 mmol/l) y peróxido de hidrógeno (0,5 mmol/l). La concentración de MPO fue expresada en nmol/g de tejido.

Para la cuantificación de los niveles de MDA en las muestras gingivales, el tejido fue procesado usando la técnica descrita por Araújo y cols. (2013). Las muestras fueron homogeneizadas (0,25 ml de tejido tisular folicular al 10% preparado en 0,15 mol/l de cloruro sódico) y se añadió a una solución de ácido tiobarbitúrico (1,5 ml de H₃PO₄ al 1% y 500 µl de ácido tiobarbitúrico al 0,6% ambos en solución acuosa), se colocaron las muestras en un baño de agua y se calentaron a 100°C durante 45 minutos. Tras ello, 2 ml de PA n-butanol fue añadido a las muestras que fueron homogeneizadas y centrifugadas a 40,816 g durante 15 minutos a 4° C. La absorbancia de la capa de butanol fue medida a 520 nm (A1) y 535 nm (A2). La concentración de MDA fue calculada como la diferencia entre A2 y A1, expresada en nmol/g de tejido.

5.6. MICRO-CT PARA EL ESTUDIO DEL MOVIMIENTO DENTAL

El análisis de imagen se llevó a cabo utilizando el escáner Albira SPECT/PET/CT tri-modal preclínico (Bruker®, Billerica, MA, EE. UU.). Las imágenes tridimensionales de la hemimaxila derecha fueron reconstruidas y el movimiento dental fue medido usando un software médico para el análisis de imágenes (Volview 3.4, Kitware, Clifton Park, NY, EE. UU.). El movimiento dental fue definido como la distancia entre el primer y segundo molar maxilar, medido desde el punto mas mesial de la corona del segundo molar al punto más distal de la corona del primer molar. Las medidas fueron realizadas dentro del plano sagital más próximo al movimiento dental, localizando el plano de la imagen que mostraba la mayor parte de estructura de la raíz (Kalajzic y cols., 2014; Murphy y cols., 2014).

5.7. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL LP CON HEMATOXILINA-EOSINA

Tras el análisis con micro-CT, todos los maxilares (n=60) se fijaron en una solución tampón de formalina al 10% durante 72 horas. Los maxilares fijados fueron lavados con

agua destilada durante 5 minutos y sumergidos en una solución descalcificante al 10% (w/v) de ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)/solución tampón fosfato salina (PBS) con un pH de 7,4 a 25°C. Las muestras se mantuvieron sumergidas en la solución descalcificante entre 10 y 12 días, bajo constante agitación, remplazando el EDTA cada 3 días. Tras embeberlas en parafina, los bloques de parafina fueron orientados de manera que los maxilares fuesen cortados perpendicularmente al plano oclusal de los molares. Las muestras se cortaron en secciones de 5 µm de grosor. La hematoxilina y la eosina fueron usadas para identificar los cambios en las fibras del LP tras el movimiento dentario ortodóncico en los tres grupos, usando la variable dicotómica utilizada por Zhang, Li y Bi (2011): colágeno con orientación normal o colágeno con orientación irregular.

5.8. ANÁLISIS INMUNOHISTOQUÍMICO. CUANTIFICACIÓN DE MMP-8 Y MMP-9

Las MMP-8 y MMP-9 fueron identificadas usando como anticuerpos primarios, un anticuerpo monoclonal de conejo para la MMP-8 y un anticuerpo policlonal de conejo para la MMP-9 (Abcam, EE. UU.). El procedimiento inmunohistoquímico fue llevado a cabo en secciones de 3µm de las muestras fijadas en formalina y embebidas en parafina. Tras desparafinar y rehidratar, las muestras se sumergieron en una solución de EDTA con un pH 9,0 (Dako, Dinamarca) a 98°C durante 30 minutos. Las secciones fueron entonces incubadas con H₂O₂ al 0,5% en metanol durante 20 minutos para bloquear la peroxidasa endógena y para prevenir alteraciones inespecíficas (suero normal de caballo, Laboratorios Vector, Burlingame, CA, durante 20 minutos a 37° C). Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo primario durante 1 hora a 37° C, lavadas en tampón fosfato e incubadas con un Kit ImmPRESS® de anticuerpos de IgG de conejo obtenidos de caballo, peroxidasa (Vector Labs durante 30 min a 37°C). Finalmente, la inmunoreacción fue revelada por incubación con una solución comercial 3-3' diaminobencidina (DAB) (Dako) durante 5 minutos a temperatura ambiente. La reacción positiva fue identificada por un precipitado marrón oscuro. Se utilizó tejido pulmonar y placentario de ratón como controles positivos para los anticuerpos de MMP-9 y MMP-8 respectivamente, siguiendo las instrucciones del fabricante. No hubo reacción inmunológica positiva del tejido cuando los anticuerpos primarios fueron omitidos o remplazados por sérum normal de conejo a las mismas concentraciones que los anticuerpos primarios como controles negativos. Las secciones fueron finalmente teñidas con hematoxilina, deshidratadas,

aclaradas y montadas.

Todas las secciones fueron examinadas en seis áreas diferentes del LP: tres en la ZT, en la zona mesial de la raíz mesial del M1; y tres en la ZC, en la zona distal de la raíz mesial del M1 superior. Cada área de interés del hueso alveolar (AIHA) (Figura 8) fue ajustada a un área de $10,000 \mu\text{m}^2$ para estandarizar las medidas. Todas las células del AIHA fueron clasificadas según la densidad de tinción inmunológica bajo una magnificación de 1000x, utilizando el método descrito por Balci Yuce y cols. (2019). Todas las células del área fueron marcadas con una puntuación de tinción de: 0 – no teñida; 1 – ligeramente teñida; 2- tinción moderada; y 3- tinción densa. La enumeración categórica de las células de estas áreas fue hecha de acuerdo con su intensidad de tinción inmunológica. Un patólogo experimentado ajeno al estudio llevó a cabo el análisis de las muestras obtenidas. Se calculó una puntuación H basada en la siguiente fórmula $[\sum P_i(i + 1)]$. En esta fórmula, i indica la puntuación de la intensidad de tinción, y P_i indica el porcentaje de células teñidas. Tras calcular las puntuaciones H para las seis medidas, la media de estos seis valores fue registrada (Balci Yuce y cols., 2018; Toker y cols., 2018).

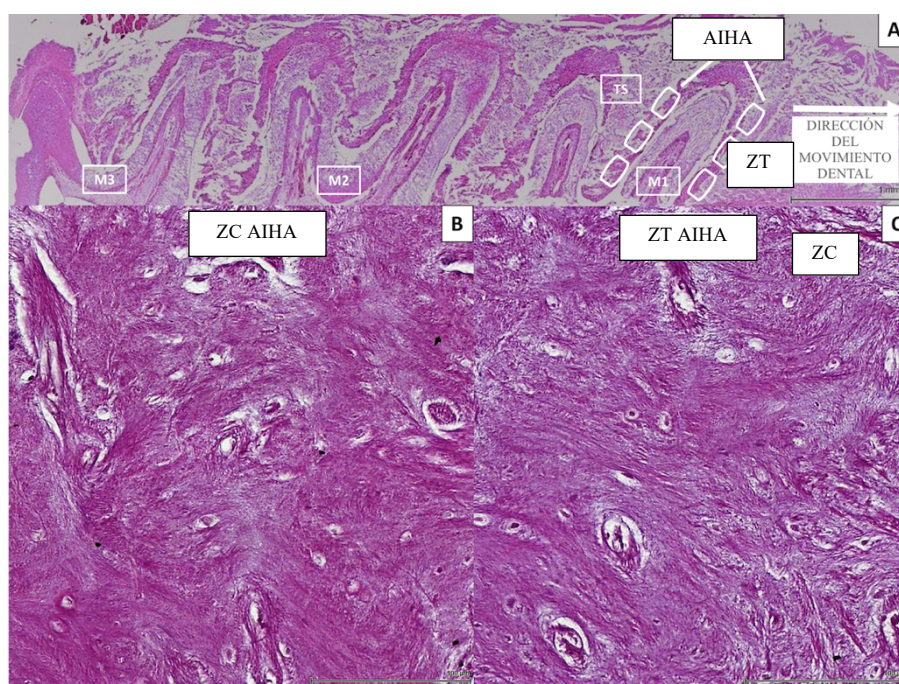


Figura 8. Imagen microscópica del hueso maxilar (superior derecho) (hematoxilina-eosina). A: Primer molar maxilar (M1), segundo molar maxilar (M2), tercer molar maxilar (M3), zona de tensión (ZT), zona de compresión (ZC), área de interés del hueso alveolar (AIHA) a una magnificación 20x. B: ZT de interés del hueso alveolar (ZT AIHA) a una magnificación 100x. C: ZC de interés del hueso alveolar (ZC AIHA) a una magnificación 100x.

5.9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El test de normalidad de Kolmogorov-Smirnov ($p < 0,05$) y el test de homogeneidad de varianzas de Levene ($p < 0,05$) fueron aplicados a las distintas variables para determinar la existencia de normalidad y la homogeneidad de las varianzas, respectivamente.

Los datos de MPO, MDA y del movimiento dentario no cumplieron los criterios de normalidad y de homogeneidad de varianzas, por tanto, fueron analizados mediante las pruebas de Kruskal-Wallis ($p < 0,05$) y de Mann-Whitney, aplicando la corrección de Bonferroni ($p \leq 0,016$).

Los datos obtenidos en cuanto a la orientación de las fibras del LP fueron analizados con la prueba Chi-cuadrado de Pearson ($p < 0,05$).

Los valores de MMP-8 y MMP-9 si cumplieron los criterios de normalidad y homogeneidad de las varianzas, por lo que se analizaron con el análisis de la varianza de un factor (ANOVA) y el test de Tukey ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

En este estudio, todos los animales sobrevivieron hasta el final del estudio y no se produjo la pérdida de ningún aparato ortodóncico.

6.1. ACTIVIDAD MPO Y MDA

Únicamente se encontraron diferencias significativas en la actividad de la MPO entre los distintos grupos a las 24 horas de activación del aparato (Tabla 1), siendo los valores significativamente mayores para los animales diabéticos no tratados que para el grupo normoglicémico ($p \leq 0,016$). No se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados con insulina y los normoglicémicos ($p \geq 0,016$).

En cuanto a los niveles de MDA, se observaron diferencias significativas entre los grupos a las 24 y a las 48 horas. A las 24 horas, los niveles de MDA en los dos grupos de animales con diabetes, no tratados y tratados con insulina, fueron significativamente

mayores que en los normoglicémicos ($p \leq 0,016$); en cuanto a las ratas diabéticas, los niveles de MDA fueron significativamente mayores en los animales no tratados que en los tratados con insulina ($p \leq 0,016$). A las 48 horas, las ratas diabéticas no tratadas mostraron una actividad significativamente mayor de MDA que las normoglicémicas y que las ratas diabéticas tratadas con insulina ($p \leq 0,016$); no se detectaron diferencias significativas entre las normoglicémicas y las diabéticas tratadas con insulina ($p \geq 0,016$) (Tabla 1).

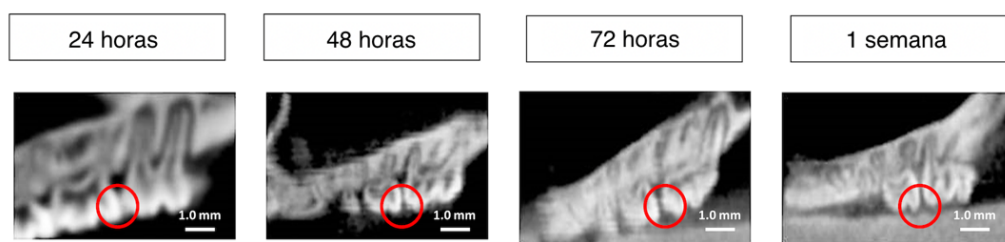
Tabla 1. Comparación de la actividad de la MPO y MDA entre los grupos de estudio a las 24, 48, 72 horas y a la semana (Test U Mann-Whitney).

Tiempos	n	Actividad MPO (nmol/g de tejido) Mediana (rango)	Actividad MDA (nmol/g de tejido) Mediana (rango)
24 horas			
Normoglicémicas	5	7.87 (4.72-9.57) [#]	38.65 (24.85-42.35) ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	5	17.45 (11.30-18.37) [*]	76.37 (71.57-88.85) ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	5	12.32 (5.55-14.25)	50.70 (31.72-62.07) ^{*,#}
48 horas			
Normoglicémicas	5	6.05 (4.52-8.25)	36.02 (24.30-41.55) [#]
Diabéticas sin tratamiento	5	10.87 (4.60-16.30)	73.05 (70.96-81.22) ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	5	8.10 (4.22-13.05)	46.02 (29.30-59.55) [#]
72 horas			
Normoglicémicas	5	5.50 (3.90-6.32)	30.35 (22.85-40.27)
Diabéticas sin tratamiento	5	10.22 (3.60-11.00)	55.92 (53.47-67.55)
Diabéticas tratadas con insulina	5	5.65 (3.15-8.25)	30.92 (24.47-45.92)
1 semana			
Normoglicémicas	5	4.30 (3.75-6.25)	24.45 (16.45-32.97)
Diabéticas sin tratamiento	5	5.57 (3.55-10.45)	32.62 (26.00-47.85)
Diabéticas tratadas con insulina	5	4.80 (3.15-7.62)	26.47 (23.17-35.65)
* Diferencias significativas comparadas con el grupo Normoglicémico; # Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas sin tratamiento; § Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas con insulina. $p \leq 0,016$.			

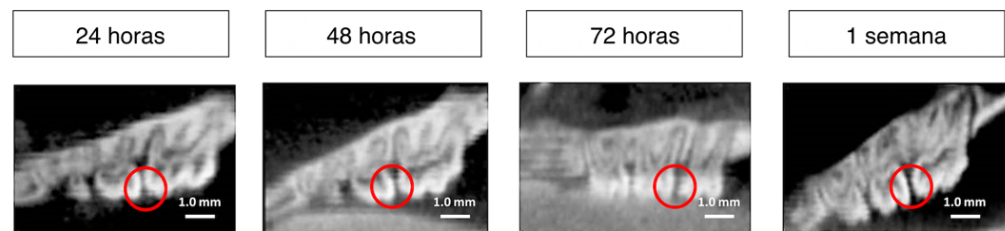
6.2. MOVIMIENTO DENTARIO ORTODÓNCICO

A las 24 horas, no se encontraron diferencias significativas en la cantidad de movimiento dentario entre grupos ($p>0,05$). A las 48 horas, 72 horas y a la semana, se observó que el movimiento dentario era significativamente mayor en el grupo de diabéticas no tratadas que en el grupo normoglicémico y que en el grupo tratado con insulina ($p\leq 0,016$) (Figura 9). No se identificaron diferencias significativas entre las ratas normoglicémicas y las tratadas con insulina ($p\geq 0,016$) (Tabla 2).

Normoglicémicas



Diabéticas sin tratamiento



Diabéticas con insulina

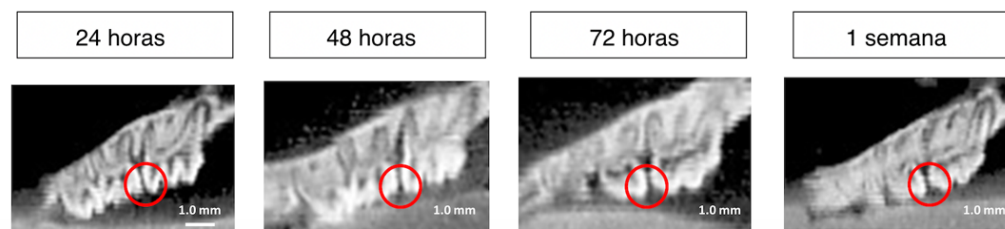


Figura 9. Micro-CT usado para el análisis del movimiento dental. Área de interés (círculo rojo).

Tabla 2. Comparación del Movimiento dental entre los grupos de estudio a las 24, 48, 72 horas y a la semana (Test U Mann-Whitney).

Tiempos	n	Movimiento dental (µm) Mediana (rango)
24 horas		
Normoglicémicas	5	135 (120-145)
Diabéticas sin tratamiento	5	150 (140-160)
Diabéticas tratadas con insulina	5	140 (125-145)
48 horas		
Normoglicémicas	5	180 (150-190) [#]
Diabéticas sin tratamiento	5	240 (230-250) ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	5	190 (145-195) [#]
72 horas		
Normoglicémicas	5	200 (205-225) [#]
Diabéticas sin tratamiento	5	330 (315-335) ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	5	220 (210-230) [#]
1 semana		
Normoglicémicas	5	400 (360-405) [#]
Diabéticas sin tratamiento	5	500 (470-505) ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	5	410 (370-415) [#]
* Diferencias significativas comparadas con el grupo Normoglicémico; # Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas sin tratamiento; § Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas con insulina. $p \leq 0,016$.		

6.3. ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL LP

No se detectaron diferencias significativas en la orientación de las fibras del LP a las 24 y a las 48 horas ($p>0,05$). En cambio, a las 72 horas y a la semana, las fibras presentaron una orientación significativamente más irregular en el grupo diabético no tratado que en el grupo normoglicémico ($p<0,05$) (Tabla 3 y Figura 10).

Tabla 3: Comparación de los cambios de las fibras del LP tras la inducción mecánica entre los grupos de estudio a las 24, 48, 72 horas y a la semana (Test chi cuadrado de Pearson).

Grupos de estudio	n	Tiempo: n (%)			
		24 horas	48 horas	72 horas	1 semana
Normoglicémicas	5				
Orientación normal		5 (100)	4 (80)	4 (80)	5 (100)
Orientación irregular		0 (0)	1 (20)	1 (20) [#]	0 (0) [#]
Diabéticas sin tratamiento	5				
Orientación normal		3 (60)	2 (40)	0 (0)	2 (40)
Orientación irregular		2 (40)	3 (60)	5 (100) [*]	3 (60) [*]
Diabéticas tratadas con insulina	5				
Orientación normal		4 (80)	3 (60)	2 (40)	4 (80)
Orientación irregular		1 (20)	2 (40)	3 (60)	1 (20)
[*] Diferencias significativas comparadas con el grupo Normoglicémico; [#] Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas sin tratamiento; [§] Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas con insulina. $p<0,05$.					

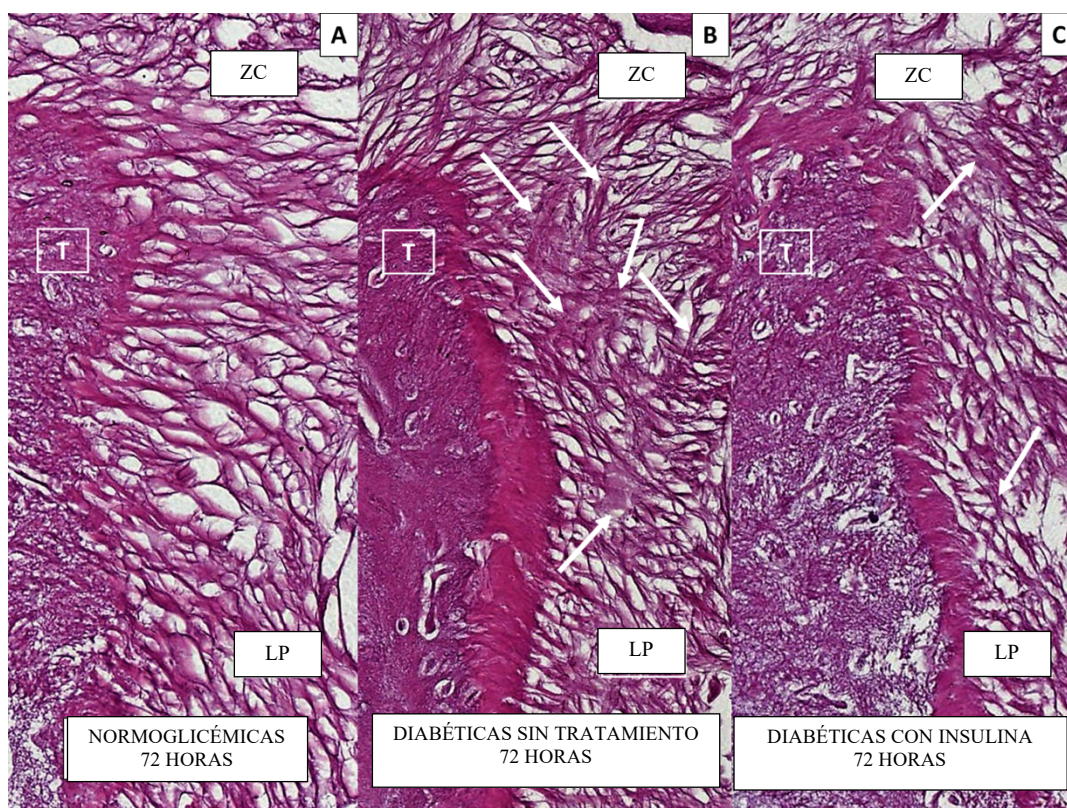


Figura 10. Fotomicrografías a las 72 horas de secciones sagitales (hematoxilina-eosina) a una magnificación 80x. Diente (D), Ligamento periodontal (LP), Zona de compresión (ZC). A: Ratas normoglicémicas, un animal con el colágeno orientado normal. B: Ratas diabéticas no tratadas, un animal con el colágeno orientado irregular. C: Ratas diabéticas tratadas con insulina, un animal con el colágeno orientado irregular. Orientación irregular de las fibras del LP marcadas con flechas.

6.4. EXPRESIÓN DE METALOPROTEINASAS DE LA MATRIZ EXTRACEULAR 8 Y 9

En todos los puntos en el tiempo, la expresión de las MMP-8 y MMP-9 (Tabla 4 y 5 respectivamente) (Figura 11) fue significativamente mayor para las ratas diabéticas no tratadas y tratadas con insulina que para las normoglicémicas ($p < 0,05$); entre los animales diabéticos, la expresión de MMP-8 y MMP-9 fue significativamente mayor en el grupo no tratado que en el grupo tratado con insulina ($p = 0,009$).

Tabla 4: Comparación de la expresión de las MMP-8 entre los grupos de estudio a las 24, 48, 72 horas y a la semana (Test Tukey).

Tiempos	n	MMP-8 (Puntuación H) Mediana $\pm$ DT
24 horas		
Normoglicémicas	30	25.20 $\pm$ 6.53 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	46.57 $\pm$ 6.99 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	30.47 $\pm$ 4.37 ^{*,#}
48 horas		
Normoglicémicas	30	32.27 $\pm$ 1.91 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	60.30 $\pm$ 4.51 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	42.17 $\pm$ 2.53 ^{*,#}
72 horas		
Normoglicémicas	30	40.77 $\pm$ 1.73 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	78.30 $\pm$ 1.61 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	44.43 $\pm$ 1.56 ^{*,#}
1 semana		
Normoglicémicas	30	52.33 $\pm$ 2.52 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	95.03 $\pm$ 1.84 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	60.47 $\pm$ 1.87 ^{*,#}
* Diferencias significativas comparadas con el grupo Normoglicémico; # Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas sin tratamiento; § Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas con insulina.		

Tabla 5: Comparación de la expresión de las MMP-9 entre los grupos de estudio a las 24, 48, 72 horas y a la semana (Test Tukey).

Tiempos	n	MMP-9 (Puntuación H) Mediana $\pm$ DT
24 horas		
Normoglicémicas	30	14.03 $\pm$ 1.71 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	31.43 $\pm$ 1.99 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	19.63 $\pm$ 2.09 ^{*,#}
48 horas		
Normoglicémicas	30	21.73 $\pm$ 1.85 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	44.07 $\pm$ 2.18 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	32.03 $\pm$ 2.96 ^{*,#}
72 horas		
Normoglicémicas	30	30.47 $\pm$ 2.33 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	56.07 $\pm$ 2.85 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	40.53 $\pm$ 2.08 ^{*,#}
1 semana		
Normoglicémicas	30	41.93 $\pm$ 2.49 ^{#,§}
Diabéticas sin tratamiento	30	67.43 $\pm$ 1.71 ^{*,§}
Diabéticas tratadas con insulina	30	50.73 $\pm$ 3.79 ^{*,#}
* Diferencias significativas comparadas con el grupo Normoglicémico; # Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas sin tratamiento; § Diferencias significativas comparadas con el grupo Diabéticas con insulina. p<0,05.		

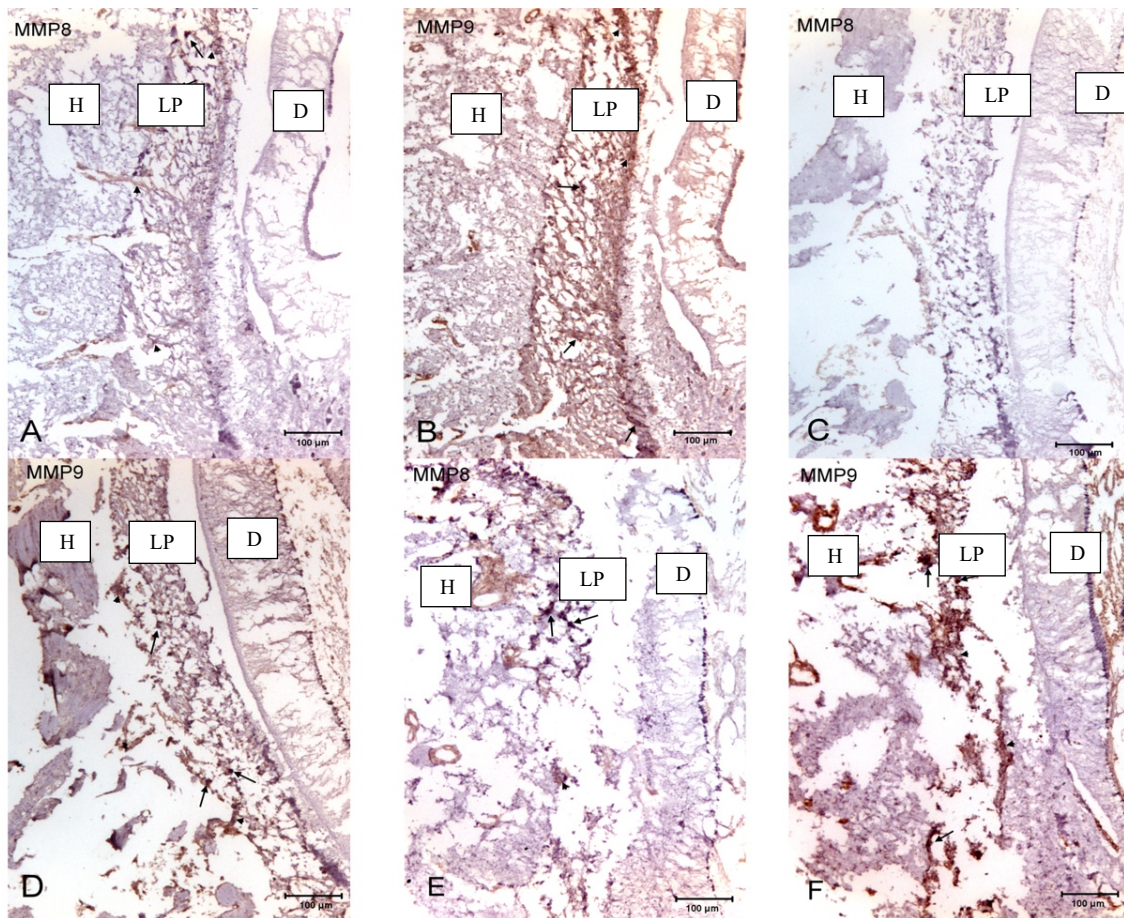


Figura 11: Las áreas marrones muestran la localización de las MMP-8 y MMP-9 por inmunohistoquímica. Matriz intracelular (flecha) y matriz extracelular (punta de flecha). Hay gran cantidad de MMP-8 y MMP-9 en las ratas diabéticas sin tratamiento (A, B), mientras que en las ratas normoglicémicas (C, D) la MMP-8 está ausente y la MMP-9 es escasa. De la misma manera, las ratas diabéticas tratadas con insulina (E, F) muestran una menor expresión de MMP-8 y MMP-9 que en las ratas diabéticas sin tratamiento. H: hueso, D: diente, LP: ligamento periodontal.

7. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue evaluar la influencia de la diabetes en el estrés oxidativo, la orientación de las fibras del LP y en la expresión de MMP-8 y MMP-9 durante el movimiento dentario ortodóncico utilizando ratas Sprague-Dawley como modelo animal.

Nuestros resultados mostraron que el estrés mecánico en ratas diabéticas no tratadas producía una mayor respuesta inflamatoria, más estrés oxidativo, más movimiento dentario, mayor desorganización del LP y una expresión de MMP-8 y MMP-9 más elevada que en las ratas normoglicémicas. Además, se observó que la insulina revertía estos efectos en términos de movimiento dental. Por tanto, se rechaza la hipótesis planteada al inicio de este estudio.

Para estudiar la respuesta biológica a las fuerzas ortodóncicas se han utilizado distintos modelos de estudio animal, entre ellos, ratas, perros, gatos e incluso monos. El principal problema de usar estos modelos animales radica en la extrapolación de los datos a la situación clínica, ya que existen diferencias tanto a nivel óseo como del LP al compararlo con humanos (Ren, Maltha y Kuijpers-Jagtman, 2004). A nivel óseo, Reitan y Kvam (1971) demostraron que, tanto en perros como en ratas, la cara lingual y vestibular del hueso alveolar presentaba una mayor densidad que en humanos, lo que influye en la reabsorción en el lado de presión durante un movimiento ortodóncico. Además, la aposición ósea en el lado de tensión en el caso de los modelos con ratas se ve retardada en comparación a los humanos debido a la estructura ósea y a que la hialinización comienza antes tras periodos cortos de aplicación de fuerzas. A nivel periodontal, Romanos y cols. (1991) observaron que la disposición de las fibras periodontales era diferente. Sin embargo, Von Böhl y Kuijpers-Jagtman (2009) afirmaron que no existían diferencias significativas en la reacción de los tejidos entre ratas y humanos durante el movimiento dentario ortodóncico. Por lo tanto, aunque hay algunas diferencias morfológicas y fisiológicas entre el hueso alveolar y el LP de ratas y humanos, las ratas son consideradas un buen modelo de estudio para el movimiento dentario. Entre las ventajas del uso de un modelo en ratas se encuentran el bajo coste y la facilidad de almacenaje de los animales; además, las muestras histológicas se preparan con más facilidad que las de perros (Ren, Maltha y Kuijpers-Jagtman, 2004).

Para inducir la diabetes, se inyectó a las ratas STZ, este es un agente tóxico relativamente selectivo frente a las células β pancreáticas de los animales, que causa una diabetes irreversible. Por tanto, se provocó una diabetes con condiciones similares a las de la diabetes tipo I, la cual es insulino dependiente (Villarino, Lewicki y Ubios, 2011).

En la literatura, se pueden observar distintos diseños de aparatos para producir el movimiento ortodóncico en modelos en ratas. Ren, Maltha y Kuijpers-Jagtman (2004) usaron un sistema donde ligaban los tres molares con una ligadura metálica de acero de 0,2 mm de diámetro para constituir una única unidad. A esta ligadura metálica, se unía un muelle cerrado (de 0,22 mm de diámetro a través de un ojal de 0,56 mm) capaz de ejercer una fuerza de 0,10 N sobre un rango de activación de 3 a 15 mm. Antes de colocar el aparato, se realizaba con una fresa un agujero transversal a nivel del hueso alveolar maxilar (perforando también los incisivos a nivel medio de su raíz para aumentar el anclaje). A través de dicho agujero, insertaban una ligadura de acero de 0,3 mm, que era ligada al extremo libre del muelle. Por tanto, mediante este aparato se pretendía el desplazamiento mesial de la unidad constituida por los tres molares, utilizando como anclaje el hueso alveolar y los incisivos. Sprogar y cols (2008) y Plut y cols (2015), usaron un sistema diferente, en lugar de utilizar los tres molares como una unidad, únicamente colocaban una ligadura de acero de 0,25 mm alrededor del primer molar superior izquierdo, la cual se ligaba a uno de los extremos de un muelle cerrado. Al otro extremo libre del muelle se ligó un alambre quirúrgico de 4-0 multifilamentos y se fijó el alambre a los incisivos. Para mejorar la retención del alambre a los incisivos, realizaron con una fresa un agujero de 0,5 mm a nivel de las superficies distales de los incisivos. La fuerza aplicada por este sistema fue de 0,25 N. Este aparato es muy similar al descrito por Li y cols. (2010), sin embargo, la fuerza de activación que utilizaron estos últimos fue de 0,5 N. En 2015, el grupo de Seifi, Hamedi y Khavandega, describieron un sistema donde se utilizó un muelle cerrado de 5 mm de longitud unido por un extremo mediante una ligadura al primer molar superior derecho y por otro a los dos incisivos superiores. Estos autores no realizaron ningún tipo de muesca a nivel de los incisivos, para aumentar la retención de la ligadura a los dientes se utilizó material adhesivo. La fuerza de activación utilizada con este aparato ortodóncico fue de 0,6 N.

En nuestro estudio, el aparato usado para inducir el movimiento dentario fue similar a los usados por Sprogar y cols. (2008), Li y cols. (2010) y Plut y cols. (2015). Sin embargo, con el fin de reducir el estrés producido en los animales, no se realizó una muesca en los incisivos de las ratas para retener la ligadura, si no que la fijamos a los incisivos mediante el ligado de esta y añadimos composite para aumentar su retención, como hicieron Seifi, Hamedi y Khavandega (2015).

La fuerza producida por un aparato ortodóncico provoca alteraciones dinámicas tanto en la matriz extracelular como en las células del citoesqueleto del LP y del hueso alveolar, alterando el remodelado óseo (Feller y cols., 2015). Al aplicar fuerzas ortodóncicas intensas, aunque el movimiento ortodóncico ocurre, aumenta la apoptosis celular (Kaya y cols., 2019). Además, se ha demostrado que fuerzas ortodóncicas ligeras favorecen el movimiento dental reduciendo los efectos adversos (menores de 0,2 N) (Krishnan y Davidovitch, 2006). Por ello, en este estudio, a pesar de la variedad de fuerzas utilizadas en la bibliografía y con el fin de minimizar el daño periodontal en los animales diabéticos, decidimos aplicar una fuerza de 0'2 N en lugar de los 0'5 N utilizados por Li y cols. (2010) o los 0'6 N de Seifi, Hamedi y Khavandega (2015).

Las fuerzas ortodóncicas son agentes físicos capaces de inducir una reacción inflamatoria que provoca el remodelado del LP y del hueso alveolar. En este sentido, esta investigación analizó la actividad de la MPO para determinar la infiltración de polimorfonucleares en el tejido gingival alrededor de los primeros molares como una forma indirecta de evaluar la inflamación (Marcaccini y cols., 2010). Los mayores valores de MPO fueron registrados las primeras 24 horas tras la activación del aparato ortodóncico en todos los grupos, a partir de este momento en el tiempo los niveles decrecieron, estos resultados confirman que la aplicación de una fuerza ortodóncica produce un aumento en la expresión de los mediadores de la inflamación durante las primeras 24 horas (Tsuge, Noda y Nakamura, 2016). En pacientes sanos con tratamiento ortodóncico, se ha observado que los niveles máximos de actividad de la MPO, tanto en fluido crevicular (Navarro-Palacios y cols., 2014; Fatima y cols., 2017) como en saliva (Navarro-Palacios y cols., 2014), se alcanzaban 2 horas después de la activación del aparato, registrando menor actividad a los 7 y a los 14 días. La evaluación a las 24 horas fue el único punto en el tiempo en el que se identificaron diferencias significativas entre los grupos, observándose en los animales diabéticos sin tratamiento una actividad de MPO significativamente mayor que en los normoglicémicos, lo cual podría deberse al hecho de que la diabetes mellitus modifica la respuesta inflamatoria y aumenta la expresión de marcadores de la inflamación como la IL-6, el TNF α y el factor de crecimiento beta 1 (TGF β 1) (Santamaria-Jr y cols., 2019). La administración de insulina redujo la actividad de MPO, de forma que los niveles de esta enzima en los animales diabéticos tratados con insulina fueron similares a los de los normoglicémicos; aunque

no se encontraron diferencias significativas entre diabéticos tratados con insulina y los no tratados.

En cuanto a los niveles de MDA, 24 horas después de la activación del aparato, tanto los animales diabéticos no tratados como los diabéticos tratados con insulina obtuvieron niveles de MDA significativamente mayores que los normoglicémicos. La insulina redujo el estrés celular; ya que, aunque los niveles de MDA fueron significativamente mayores en los diabéticos tratados que en los normoglicémicos, los diabéticos tratados con insulina tuvieron niveles de MDA significativamente menores que los no tratados. En cambio, a las 48 horas, los niveles de MDA entre los diabéticos tratados con insulina y los normoglicémicos fueron similares y no se observaron diferencias significativas entre los tres grupos. Nuestros resultados sugieren que, a partir de las 48 horas, el estrés involucrado en el movimiento dentario ortodóncico se regula independientemente de la presencia o ausencia de diabetes. En otro estudio en el que se cuantificó el nivel de MDA en la saliva y en el líquido gingivocrevicular de pacientes sanos con tratamiento de ortodoncia, se observó que el tratamiento no produce cambios por encima de los niveles considerados como fisiológicamente normales que sugieran un daño oxidativo a los componentes lipídicos de los tejidos (Atuğ Özcan y cols., 2014). En cambio, la diabetes produce un aumento del estrés oxidativo en la microcirculación en la región oral, reduciendo la reactividad vascular (Sugiyama y cols., 2012), aumentando los niveles de MDA en los tejidos periodontales, reduciendo los niveles de glutatión, y alterando los niveles de defensa antioxidantes locales (Monea y cols., 2014).

En relación con la cantidad de movimiento dentario producido, se encontró que 48 horas tras la activación del aparato era significativamente mayor en las ratas diabéticas no tratadas que en las diabéticas tratadas con insulina y que en las normoglicémicas, mostrando estos dos últimos grupos valores similares. Nuestros resultados coinciden con otras investigaciones en las que la diabetes se trató con insulina (Braga y cols., 2011) o con metformina (anti hiperglicémico oral) (Sun y cols., 2017). En cambio, en otro trabajo, aunque al igual que en el nuestro los animales diabéticos no tratados mostraron significativamente más movimiento dental que los normoglicémicos; en los diabéticos tratados con insulina el movimiento fue significativamente mayor que en los normoglicémicos. Sin embargo, cuando se administró metformina como tratamiento

conjunto a la insulina, la respuesta de movimiento fue similar a los animales normoglicémicos (Mena Laura y cols., 2019).

Varios autores han demostrado que la diabetes aumenta el número de osteoclastos con tinción positiva para la fosfatasa ácida tartrato resistente (Braga y cols., 2011; Sun y cols., 2017; Mena Laura y cols., 2019), asociándose también a un incremento en la expresión de factores relacionados con el reclutamiento y la actividad de los osteoclastos como el RANKL, el factor estimulador de colonias 1 (CSF-1), el ligando de quimiocina 2 (CCL-2), el ligando de quimiocina 5 (CCL-5), TNF α (Braga y cols. 2011) y captasina K (Sun y cols., 2017); mientras que la expresión de marcadores de osteoblastos como la proteína RUNX2, el codificador de osteocalcina (OCN), el colágeno tipo I (Tsimikas, 2006) y la fosfatasa alcalina descienden en presencia de diabetes (Sun y cols., 2017). Por tanto, la diabetes aumenta la migración y actividad de los osteoclastos (Braga y cols., 2011; Sun y cols., 2017; Mena Laura y cols., 2019) y disminuye la diferenciación de osteoblastos (Braga y cols. 2011; Sun y cols., 2017). La disminución en la diferenciación de osteoblastos podría llevar también a una reducción en las señales inhibitorias para los osteoclastos (Braga y cols. 2011). Esto lleva a una mayor reabsorción ósea y mayor movimiento dentario ortodóncico en los animales diabéticos no tratados comparados con los normoglicémicos. El tratamiento con insulina (Braga y cols. 2011) o metformina (Sun y cols., 2017) normaliza la situación con respecto a estos marcadores; por esta razón, el movimiento dentario registrado fue similar al de las ratas normoglicémicas. Incluso cuando la insulina no es capaz de normalizar la cantidad de movimiento dentario, el tratamiento antidiabético reduce el daño periodontal cuando se aplica una fuerza ortodóncica y se observa una mayor preservación de los tejidos periodontales (Mena Laura y cols. 2019).

En cambio, Plut y cols. (2015) no detectaron diferencias significativas en el movimiento dentario entre animales normoglicémicos y diabéticos, aunque si observaron una disminución de la formación ósea y un ligero aumento de la reabsorción durante el movimiento ortodóncico entre las ratas diabéticas. Otros estudios han concluido que la cantidad de movimiento dentario producido es menor en presencia de diabetes (Arita y cols., 2016; Santamaria-Jr y cols., 2019). Arita y cols. (2016), sugirieron que cuando existe diabetes, la eliminación del tejido de hialinización retrasa la acumulación de osteoclastos. Mena Laura y cols. (2019), afirmaron que en los animales diabéticos se

produce un extenso tejido de hialinización. La excesiva formación de tejido de hialinización como resultado de la aplicación de fuerzas intensas puede ser la razón por la que Santamaria-Jr y cols. (2019) observaron menos movimiento dental en ratas diabéticas. En cualquier caso, esta controversia de resultados puede ser debida a los diferentes protocolos usados en los distintos trabajos en términos de modelos animales, tipo de diabetes (I y II), tipo de aparato ortodóncico, nivel de fuerza aplicado, duración de la fuerza, etc.

En relación con la orientación de las fibras del LP, tanto a las 72 horas como a la semana tras la activación del aparato, se observó una desorganización significativamente mayor en los animales diabéticos no tratados, lo que confirma que la diabetes afecta al remodelado del colágeno (Şurlin y cols., 2014). En ratas diabéticas se ha observado que hay un mayor número de capilares colapsados que en las ratas normoglicémicas, con un LP que permanece desorganizado tras 14 días desde la aplicación de la fuerza, mientras que en las ratas sanas se observa una recuperación (Zhang, Li y Bi, 2011). En este estudio se utilizó la tinción con hematoxilina-eosina para evaluar la orientación de las fibras del LP siguiendo el método descrito por Zhang, Li y Bi (2011), aunque otros autores han usado rojo picrosirio o alizarina roja (Toker y cols., 2018) para la tinción del colágeno, estas tinciones están más indicadas para el estudio de los depósitos de Ca.

La mayor desestructuración de las fibras del LP observada en las ratas diabéticas no tratadas concuerda con los resultados obtenidos en la expresión de MMP-8 y MMP-9; manteniéndose la expresión de ambas MMPS significativamente más elevada, desde las primeras 24 horas de aplicación de la fuerza hasta la semana, en las ratas diabéticas sin tratamiento que en las diabéticas tratadas con insulina y en las normoglicémicas. Aunque la insulina redujo su expresión, no fue lo suficiente como para que los niveles fueran como los obtenidos en los animales normoglicémicos. Otros estudios previos han registrado un aumento significativo en la expresión de MMP-9 en el fluido crevicular gingival de pacientes tratados con aparatos fijos comparado con pacientes no tratados (Grant y cols., 2013), también se ha determinado que la expresión de MMP-8 (Şurlin y cols., 2014) y de MMP-9 (Bastos y cols., 2017) es elevada en sujetos diabéticos. En este estudio se decidió cuantificar las MMP-8 y MMP-9 debido a su asociación con la diabetes y la enfermedad periodontal (Şurlin y cols., 2014). Su expresión ha sido estudiada durante el movimiento ortodóncico en condiciones de salud (Apajalahti y cols., 2003; Grant y

cols., 2013) pero no en presencia de diabetes. Por tanto, los resultados del presente estudio no se pueden comparar con ningún otro. Sin embargo, la expresión de MMP-1 ha sido evaluada, encontrando que en ratas diabéticas hay una mayor expresión de esta MMP capaz de destruir colágeno, y menos colágeno tipo I (Zhang, Li y Bi, 2011) que en las ratas normoglicémicas. Zhang, Li y Bi (2011) determinaron que la expresión de MMP-1 alcanzaba su pico máximo alrededor del día 7 tras la aplicación de la fuerza, mientras que en los animales normoglicémicos los valores se normalizaban. Nuestros resultados son acordes con la literatura y sugieren que la diabetes condiciona a una mayor susceptibilidad al daño de los tejidos inducido por estrés y dificulta la reconstrucción y reorganización del LP.

Basándonos en los resultados de este estudio, parece que la diabetes altera la respuesta tisular ante una fuerza ortodóncica, por lo que el profesional debe considerar este hecho en el tratamiento de los pacientes que padecen esta enfermedad. La duración de este trabajo fue de una semana, en este punto en el tiempo la expresión de MMP-8 y MMP-9 fue significativamente mayor en las ratas diabéticas sin tratamiento que en las tratadas con insulina y que en las normoglicémicas. Hubiese sido interesante prolongar el estudio para poder determinar si a largo plazo los niveles de estas MMPS se igualan a los registrados en ratas normoglicémicas y poder así establecer en qué punto en el tiempo tiene lugar este evento, en el caso de que ocurriese.

Aún teniendo en cuenta los resultados obtenidos, son necesarios más estudios que determinen la respuesta periodontal en pacientes con diabetes, tanto tipo I como tipo II. Además de trabajos que evalúen la respuesta tisular ante distintos niveles de hiperglicemia.

Aunque la insulina puede revertir parcialmente las alteraciones tisulares relacionadas con la diabetes, los pacientes diabéticos pueden sufrir etapas de descompensación glicémica. Por tanto, los periodos entre las activaciones de los aparatos fijos ortodóncicos deberían ser de suficiente duración como para permitir la recuperación tisular.

8. CONCLUSIONES

- La actividad de la MPO a las 24 horas fue significativamente mayor en ratas diabéticas no tratadas que en las ratas normoglicémicas, mientras que no se encontraron diferencias significativas entre los animales tratados con insulina y los animales normoglicémicos. Para el resto de los puntos en el tiempo evaluados no se encontraron diferencias significativas entre grupos.
- Únicamente se observaron diferencias significativas en los niveles de MDA de los distintos grupos a las 24 y a las 48 horas. A las 24 horas, en los animales diabéticos (tanto no tratados como tratados con insulina), los niveles fueron significativamente mayores que en los normoglicémicos. En cuanto a las ratas diabéticas, se cuantificaron niveles de MDA significativamente mayores en las no tratadas con insulina que en las tratadas. A las 48 horas, las ratas diabéticas no tratadas mostraron una actividad significativamente mayor de MDA que las normoglicémicas y que las ratas diabéticas tratadas con insulina; siendo los niveles de MDA similares en entre las normoglicémicas y las diabéticas tratadas con insulina.
- El movimiento dentario inducido ortodóncicamente fue significativamente mayor a las 48, 72 horas y a la semana en las ratas diabéticas no tratadas que en las diabéticas tratadas con insulina y en las normoglicémicas, siendo la cantidad de movimiento similar en estos dos últimos grupos. No se observaron significativas entre grupos a las 24 horas.
- La orientación de las fibras del LP fue significativamente más irregular a las 72 horas y a la semana en las ratas diabéticas sin tratamiento que en las normoglicémicas. No se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos ni a las 24 horas ni a las 48 horas.
- La expresión de las MMP-8 y MMP-9 fue significativamente mayor en todos los puntos en el tiempo para las ratas diabéticas (tratadas con insulina y no tratadas) que para las normoglicémicas. Entre los animales diabéticos, la expresión de ambas MMPS fue significativamente mayor para los no tratados con insulina que para los que si recibieron tratamiento.

9. BIBLIOGRAFÍA

Abbassy MA, Watari I, Bakry AS, Hamba H, Hasan AH, Tagami J y Ono T (2015). Diabetes detrimental effects on enamel and dentine formation. *J Dent*. 43 (5): 589-96.

Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P y Bakhiet M (2001). Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 119 (3): 307-12.

Apajalahti S, Sorsa T, Railavo S y Ingman T (2003). The in vivo levels of matrix metalloproteinase-1 and -8 in gingival crevicular fluid during initial orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 82 (12): 1018–22.

Araújo AA, Souza TO, Moura LM, Aragao KS, Araújo LS, Medeiros CAX, Alves MSCF y Araújo Jr RF (2013). Effect of telmisartan on levels of IL-1, TNF- α , down-regulated COX-2, MMP-2, MMP-9 and RANKL/RANK in an experimental periodontitis model. *J Clin Periodontol*. 40 (12): 1104–11.

Arita K, Hotokezaka H, Hashimoto M, Nakano-Tajima T, Kurohama T, Kondo T, Darendeliler MA y Yoshida N (2016). Effects of diabetes on tooth movement and root resorption after orthodontic force application in rats. *Orthod Craniofac Res*. 19 (2): 83–92.

Asociación Americana Periodoncia (AAP) (2000). Position paper: Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol*. 71: 664-78.

Atuğ Özcan SS, Ceylan I, Ozcan E, Kurt N, Metin Dagsuyu I y Fatih Çanakçı C (2014). Evaluation of oxidative stress biomarkers in patients with fixed orthodontic appliances. *Dis Markers*. 2014: 597892.

Balci Yuce H, Lektemur Alpan A Gevrek F y Toker H (2018). Investigation of the effect of astaxanthin on alveolar bone loss in experimental periodontitis. *J Periodont Res*. 53(1): 131–38.

Balci Yuce H, Toker H, Yildirim A, Bugrul Tekin M, Gevrek F y Altunbas N (2019). The effect of luteolin in prevention of periodontal disease in Wistar rats. *J Periodontol.* 90(12): 1481–89.

Banting FG, Campbell WR, Fletcher AA (1923). Further Clinical Experience with Insulin (Pancreatic Extracts) in the Treatment of Diabetes Mellitus. *Br Med J.* 1(3236): 8-12.

Barbirato DD, Fogacci MF, Gusman H, Takiya CM, de Carvalho DD y Samsone C (2018). Hydroxyapatite calvaria graft repair in experimental diabetes mellitus in rats. *J Craniomaxillofac Surg.* 46(9): 1576–85.

Bassett CA, Becker RO (1962). Generation of electric potentials by bone in response to mechanical stress. *Science.* 137(3535): 1063–64.

Bastos MF, Tucci MA, de Siqueira, de Faveri M, Figueiredo LC, Vallim PC y Duarte PM (2017). Diabetes may affect the expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors more than smoking in chronic periodontitis. *J. Periodontal Res.* 52(2): 292-99.

Betteridge DJ (2000). What is oxidative stress? *Metab. Clin. Exp.* 49 (2 Suppl 1): 3–8.

Bildt MM, Bloemen M, Kuijpers-Jagtman AM y Von den Hoff JW (2009). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 31(5): 529-35.

Block G, Dietrich M, Norkus EP, Morrow JD, Hudes M, Caan B y Packer L (2002). Factors associated with oxidative stress in human populations. *Am J Epidemiol.* 156(3): 274–85.

Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003). Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 423(6937): 337- 42

Braga SMG, Taddei SR, Andrade Jr I, Queiroz-Junior CM, Garlet GP, Repeke CE, Teixeira MM y da Silva TA (2011). Effect of diabetes on orthodontic tooth movement in a mouse model. *Eur J Oral Sci.* 119(1): 7–14.

Canavarro C, Palmier R, Capelli J (2013). Matrix metalloproteinases -1, -2, -3, -7, -8, -12 and -13 in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: a longitudinal randomized split-mouth study. *Eur J Orthod.* 35(5): 652-58.

Cantarella G, Cantarella R, Caltabiano, Risuglia N, Bernardini R y Leonardi R (2006). Levels of matrix metalloproteinases 1 and 2 in human gingival crevicular fluid during initial tooth movement. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 130(5): 568.E11– 568.E16

Cao CF, Smith QT (1989). Crevicular fluid myeloperoxidase at healthy, gingivitis and periodontitis sites. *J Clin Periodontol.* 16(1): 17-20.

Capelli J, Kantarci A, Haffajee A, Teles RP, Fidel Jr R y Figueredo CM (2011). Matrix metalloproteinases and chemokines in the gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 33(6): 705-11.

Cardaropoli D y Gaveglia L (2007). The influence of orthodontic movement on periodontal tissues level. *Semin Orthod.* 13(4): 234–45.

Chang YC, Yang SF, Lai CC, Liu JY y Hsieh YS (2002). Regulation of matrix metalloproteinase production by cytokines, pharmacological agents and periodontal pathogens in human periodontal ligament fibroblast cultures. *J Periodont Res.* 37(3): 196–203.

Chaqués J (1998). Biology of tooth movement. Classic theory and basic principles. Part 1. *Ortod Española.* 2 (38): 105-110.

Chen Q, Jin M, Yang F, Zhu J, Xiao Q y Zhang L (2013). Matrix metalloproteinases: inflammatory regulators of cell behaviors in vascular formation and remodeling, *Mediators Inflamm.* 2013: 928315.

Conti M, Morand PC, Levillain P y Lemonnier A (1991). Improved fluorometric determination of malonaldehyde. *Clin Chem.* 37 (7): 1273–75.

Dandona P, Aljada A y Bandyopadhyay A (2004). Inflammation: the link between insulin resistance, obesity and diabetes. *Trends Immunol.* 25 (1): 4–7.

- Davidovitch Z (1991). Tooth movement. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2 (4): 411-50.
- DiMeglio LA, Evans-Molina C y Oram RA (2018). Type 1 diabetes. *Lancet.* 391 (10138): 2449-62.
- Draper HH y Hadley M (1990). Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 186: 421–31.
- Elley BM, Soory M y Manson JD. Tejidos periodontales (2011). En: Elley BM, Soory M y Manson JD. *Periodoncia*. Barcelona: Elsevier; p.1-18.
- Eugene Roberts W. Fisiología, metabolismo y biomecánica del hueso en la práctica ortodóncica (2017). En: Graber L, Vanarsdall R, Vig K y Huang G. *Ortodoncia. Principios y técnicas actuales*. 4ª ed. Madrid: Elsevier; p. 221-292.
- Farrar JN (1988). *Irregularities of the Teeth and Their Correction*. New York: VinnePress; p. 658.
- Fatima A, Talapaneni AK, Saleh A, Sana S y Hussain A (2017). An evaluation and comparison of myeloperoxidase enzymatic activity during initial orthodontic alignment: an in vivo study. *J Orthod.* 44 (3): 169–73.
- Feller L, Khammissa RAG, Schechter I, Thomadakis G, Fourie J y Lemmer J (2015). Biological Events in Periodontal Ligament and Alveolar Bone Associated with Application of Orthodontic Forces. *ScientificWorldJournal.* 2015: 876509.
- Fenneman AC, Rampanelli E, Yin YS, Ames J, Blaser MJ, Fliers E y Nieuwdorp M (2020). Gut microbiota and metabolites in the pathogenesis of endocrine disease. *Biochem Soc Trans.* 48 (3): 915-31.
- Forga L, Goñi MJ, Cambra K, Ibáñez B, Mozas D y Chueca M (2013). Diferencias por edad y sexo en la incidencia de diabetes tipo 1 en Navarra (2009-2011). *Gac Sanit.* 27 (6): 537-40.

Gao H, Zhang X, Zheng Y, Peng L, Hou J y Meng H (2015). S100A9-induced release of interleukin (IL)-6 and IL-8 through toll-like receptor 4 (TLR4) in human periodontal ligament cells. *Mol Immunol.* 67 (2015): 223-32.

Gharagozlian S, Svennevig K, Bandgstad H-J, Winberg O y Kolset SO (2009). Matrix metalloproteinases in subjects with type I diabetes. *BMC Clin Pathol.* 9:7.

Giglio MJ y Lama MA (2001). Effect of experimental diabetes on mandible growth in rats. *Eur J Oral Sci.* 109 (3): 193–97.

Grant M, Wilson J, Rock P y Chapple I (2013). Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *Eur J Orthod.* 35 (5): 644–51.

Halliwell B y Gutteridge JMC (2015). Oxidative stress and redox regulation: adaptation, damage, repair, senescence, and death. En: Halliwell B y Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. London: Oxford University Press.

Hardy DC, Ross JH, Schuyler CA, Leite RS, Slate EH y Huang Y (2012). Matrix metalloproteinase-8 expression in periodontal tissues surgically removed from diabetic and non-diabetic patients with periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 39 (3): 249–55.

Huang H, Williams RC y Kyrkanides S (2014). Accelerated orthodontic tooth movement: molecular mechanisms. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 146 (5): 620-32.

Ingman T, Apajalahti S, Mäntylä P, Savolainen P y Sorsa T (2005). 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.* 27 (2): 202-7.

International Diabetes Federation (2019). *IDF diabetes atlas*. 9th ed. Brussels: International Diabetes Federation; [http://www. diabetesatlas.org](http://www.diabetesatlas.org). Accessed 10 Jun 2020.

Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG, Embree MC, Song KS, Marao HF y Mao JJ (2016). Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. *Front Oral Biol.* 18: 1-8.

Kalajzic Z, Peluso EB, Utreja A, Dymant N, Nihara J, Xu M, Chen J, Uribe F y Wadhwa S (2014). Effect of cyclical forces on the periodontal ligament and alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 84 (2): 297–303.

Kara A, Akman S, Ozkanlar S, Tozglu U, Kalkan Y, Canakci CF y Tozoglu S (2013). Immune modulatory and antioxidant effects of melatonin in experimental periodontitis in rats. *Free Radic. Biol. Med.* 55: 21–6.

Kashyap S (2016). Current concepts in the biology of orthodontic tooth movement: a brief overview. *NJDSR.* 1 (4): 28–31.

Kaya S, Çifter M, Çekici A, Olgaç V, Issever H y Isik G (2020). Effects of orthodontic force magnitude on cell apoptosis and RANKL-induced osteoclastogenesis: Studies in a rat model. *J Orofac Orthop.* 81 (2): 100-12.

Kerner W y Brückel J (2014). Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 122 (7): 384–86.

Krishnan V y Davidovitch Z (2006). Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 129 (4): 469e.1-32.

Krishnan V y Davidovitch Z (2009). On a path to unfolding the biological mechanisms of orthodontic tooth movement. *J Dent Res.* 88 (7): 597-608.

Lalla R y D'Ambrosio J (2001). Dental management considerations for the patient with diabetes mellitus. *J Am Dent Assoc.* 132 (10): 1425-32.

Lappin DF, Eapen B, Robertson D, Young J y Hodge PJ (2009). Markers of bone destruction and formation and periodontitis in type 1 diabetes mellitus. *J Clin Periodontol.* 36 (8): 634–41.

Li X, Kolltveit KM, Tronstad L y Olsen I (2000). Systemic diseases caused by oral infection. *Clin Microbiol Rev.* 13 (4): 547–58.

Li X, Zhang L, Wang N, Feng X y Bi L (2010). Periodontal ligament remodeling and alveolar bone resorption during orthodontic tooth movement in rats with diabetes. *Diabetes Technol Ther.* 12 (1): 65–73.

Lindhe J, Karring T y Araújo M (2017). Anatomía de los tejidos periodontales. En: Lindhe J, Karring T y Lang N. *Periodontología Clínica e Implantológica*. 5ª ed. Madrid: Panamericana; p. 3-42.

Löe H (1993). Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care.* 16 (1): 329-34.

Lopes Ferreira C, da Rocha VC, da Silva WJ, De Marc AC, Santamaria Jr M, Santamaria MP, Neves Jardim MA (2018). Periodontal response to orthodontic tooth movement in diabetes-induced rats with or without periodontal disease. *J Periodontol.* 89 (3): 341-50.

Marcaccini AM, Amato PAF, Leão FV, Gerlach RF y Ferreira JT (2010). Myeloperoxidase activity is increased in gingival crevicular fluid and whole saliva after fixed orthodontic appliance activation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 138 (5): 613–16.

Mealey B (1999). Diabetes and periodontal diseases. *J Periodontol.* 70 (8): 935-49.

Mealey BL y Oates TW (2006). Diabetes Mellitus and Periodontal Diseases. *J Periodontol.* 77 (8): 1289-303.

Meikle MC (2006). The tissue, cellular, and molecular regulation of orthodontic tooth movement: 100 years after Carl Sandstedt. *Eur J Orthod.* 28 (3): 221-40.

Mena Laura EE, Cestari TM, Almeida R, Santos Pereira D, Taga R, Garlet GP y Assis GF (2019). Metformin as an add-on to insulin improves periodontal response during orthodontic tooth movement in type 1 diabetic rats. *J Periodontol.* 90 (8): 920-31.

Mobasser M, Shirmohammadi M, Amiri T, Vahed N, Fard HH y Ghojzadeh M (2020). Prevalence and incidence of type 1 diabetes in the world: a systematic review and meta-analysis. *Health Promot Perspect.* 10 (2): 98-115.

Monaghan M, Helgeson V y Wiebe D (2015). Type 1 Diabetes in young adulthood. *Curr Diabetes Rev.* 11 (4): 239-50.

Monea A, Mezei T, Popsor S y Monea M (2014). Oxidative Stress: A Link between Diabetes Mellitus and Periodontal Disease. *Int J Endocrinol.* 2014: 917631.

Moshabab AA (2018). Biological aspects of orthodontic tooth movement: A review of literature. *Saudi J Biol Sci.* 25 (6): 1027-32.

Moss-Salentijn L (1997). Melvin L. Moss and the functional matrix. *J Dent Res.* 76 (12): 1814–17.

Mundy GR and Roodman GD (1987). Osteoclast ontogeny and function. *Bone and mineral Res.* 5: 209–79.

Murphy CA, Chandhoke T, Kalajzic Z, Flynn R, Utreja A, Wadhwa S, Nanda R y Uribe F (2014). Effect of corticision and different force magnitudes on orthodontic tooth movement in a rat model. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 146 (1): 55–66.

Naguib G, Al-Mashat H, Desta T y Graves DT (2004). Diabetes prolongs the inflammatory response to a bacterial stimulus through cytokine dysregulation. *J Invest Dermatol.* 123 (1): 87–92

Nanci A y Bosshardt DD (2006). Structure of periodontal tissues in health and disease. *Periodontol* 2000. 40: 11-28

Nascimento-Saba CC, Breitenbach MM y Rosenthal D (1997). Pituitary-thyroid axis in short- and long-term experimental diabetes mellitus. *Braz J Med Biol Res.* 30 (2): 269–74.

Navarro-Palacios A, García-López E, Meza-Rios A, Armendariz-Borunda J y Sandoval-Rodríguez A (2014). Myeloperoxidase enzymatic activity is increased in patients with different levels of dental crowding after initial orthodontic activation. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 146 (1): 92–97.

Nichols RA, Niagro FD, Borke JL y Cuenin MF (2016). Mechanical stretching of mouse calvarial osteoblasts in vitro models changes in MMP-2 and MMP-9 expression at the bone-implant interface. *J Oral Implant.* 42 (2): 138-44.

Nuche-Berenguer B, Moreno P, Esbrit P, Dapía S, Caeiro JR, Cancelas J, Haro-Mora JJ y Villanueva-Peñacarrillo ML (2009). Effect of GLP-1 treatment on bone turnover in normal, type 2 diabetic, and insulin-resistant states. *Calcif. Tissue Int.* 84 (6): 453-61.

Oppenheim A (2007). Tissue changes, particularly of the bone, incident to tooth movement. *Eur J Orthod.* 29: i2-15.

Padgett LE, Broniowska KA, Hansen PA, Corbett JA y Tse HM (2013). The role of reactive oxygen species and proinflammatory cytokines in type 1 diabetes pathogenesis. *Ann N Y Acad Sci.* 1281 (1): 16– 35.

Patil VS, Patil VP, Gokhale N, Acharya A y Kangokar P (2016). Chronic Periodontitis in Type 2 Diabetes Mellitus: Oxidative Stress as a Common Factor in Periodontal Tissue Injury. *J Clin Diagn Res.* 10 (4): 12-16.

Pérez Varela JC (2003). Biología del movimiento dentario. En: Bravo LA. *Manual de Ortodoncia*. Madrid: Editorial Síntesis; p.233-244.

Perkins DJ y Kniss DA (1997). Tumor necrosis factor alpha promotes sustained cyclooxygenase 2 expression: attenuation by dexamethasone and NSAIDs. *Prostaglandins.* 54 (4): 727-43

Phipps RP, Borrello MA y Blieden TM (1997). Fibroblast heterogeneity in the periodontium and other tissues. *J Periodont Res.* 32 (1 Pt 2): 159–65.

Pilger A, Rüdiger HW (2006). 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine as a marker of oxidative DNA damage related to occupational and environmental exposures. *Int Arch Occup Environ Health.* 80 (1): 1–15.

Pilon J, Kuijpers-Jagtman AM y Maltha JC (1996). Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 110 (1): 16-23.

Plut A, Sprogar Š, Drevenšek G, Hudoklin S, Zupan J, Marc J y Drevenšek M (2015). Bone remodeling during orthodontic tooth movement in rats with type 2 diabetes. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 148 (6): 1017-25.

Preshaw PM y Taylor JJ (2011). How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J Clin Periodontol.* 38 (11): 60–84.

Preshaw PM, Alba AL, Herrera D, Jepsen S, Konstantinidis A, Makrilakis K y Taylor R (2012). Periodontitis and diabetes: a two-way relationship. *Diabetologia.* 55 (1): 21–31.

Reaven GM (1988). Banting Lecture 1988. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes.* 37 (12): 1595–607.

Redlich M, Roos H, Reichenberg E, Zaks B, Grosskop A, Kana IB, Pitaru S y Palmon A (2004). The effect of centrifugal force on mRNA levels of collagenase, collagen type-I, tissue inhibitors of metalloproteinases and beta-actin in cultured human periodontal ligament fibroblasts. *J Periodont Res.* 39 (1): 27–32.

Rees TD (1994). The diabetic dental patient. *Dent Clin North Am.* 38 (3): 447-63.

Reitan K y Kvam E (1971). Comparative behaviour of human and animal tissue during experimental tooth movement. *Angle Orthod.* 41 (1): 1-14.

Ren Y, Maltha JC y Kuijpers-Jagtman AM (2004). The rat as a model for orthodontic tooth movement- a critical review and a proposed solution. *Eur J Orthod.* 26 (5): 483-90.

Rewers M y Ludvigsson J (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *Lancet.* 387 (10035): 2340-48.

Roberts-Harry D y Sandy J (2004). Orthodontics. Part 11: Orthodontic tooth movement. Br Dent J. 196 (7): 391 - 94.

Romanos GE, Schröter-Kermani C y Bernimoulin JP (1991). Collagen as a basic element of the periodontum: immunohistochemical aspects in the human and animals. 2. Cementum and periodontal ligament. Parodontol. 2 (1): 47-59.

Sandstedt C (1904). Einige Beiträge zur Theorie der Zahnregulierung. Nordisk Tandläkare Tidskrift. 5: 236-256.

Sandy JR, Farndale RW y Meikle MC. (1993). Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. Am J Orthod Dentofacial Orthop. 103(3): 212-22.

Santamaria-Jr M, Bagne L, Zaniboni E, Santamaria MP, Neves Jardim MA, Felonato M, dos Santos GMT, Sampaio Mendoça FA, Marretto Esquisatto MA (2020). Diabetes mellitus and periodontitis: Inflammatory response in orthodontic tooth movement. Orthod Craniofac Res. 23 (1): 27-34.

Schroeder HE y Listgarten MA (1997). The gingival tissues: the architecture of periodontal protection. Periodontol. 2000. 13: 91-120.

Schwarz AM (1932). Tissue changes incidental to orthodontic tooth movement. International J of Orthodontia, oral surgery and radiography. 18 (4): 331-52.

Seifi M, Hamed R y Khavandegar Z (2015). The Effect of Thyroid Hormone, Prostaglandin E2, and Calcium Gluconate on Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Rats. J Dent (Shiraz). 16 (1): 35-42.

Smith PC, Muñoz VC, Collados L y Oyarzún AD (2004). In situ detection of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gingival epithelium in human periodontal disease. J Periodont. Res. 39 (2): 87–92.

Soell M, Hassan M, Miliauskaite A, Haikel Y y Selimovic D (2007). The oral cavity of elderly patients in diabetes. Diabetes Metab. 33 (1): S10–18.

Souza MHL, Troncon LEA, Cunha FQ y Oliveira RB (2003). Decreased gastric tone and delayed gastric emptying precede neutrophil infiltration and mucosal lesion formation in indomethacin-induced gastric damage in rats. *Braz J Med Biol Res.* 36 (10): 1383–90.

Sprogar S, Vaupotic T, Cör A, Drevensek M y Drevensek G (2008). The endothelin system mediates bone remodeling in the late stage of orthodontic tooth movement in rats. *Bone.* 43 (4): 740-47.

Storey E (1973). The nature of tooth movement. *Am J Orthod.* 63 (3): 292–314.

Sugiyama S, Takahashi S-S, Tokutomi FA, Yoshida A, Kobayashi K, Yoshino F, Wada-Takahashi S, Toyama T, Watanabe K, Hamada N, Todoki K y Lee M (2012). Gingival vascular functions are altered in type 2 diabetes mellitus model and/or periodontitis model. *J Clin Biochem Nutr.* 51 (2):108-13.

Sun J, Du J, Feng W, Lu B, Liu H, Guo J, Amizuka N y Li M (2017). Histological evidence that metformin reverses the adverse effects of diabetes on orthodontic tooth movement in rats. *J Mol Histol.* 48 (2): 73-81.

Şurlin P, Oprea B, Solomon SM, Popa SG, Mota M, Mateescu GO, Rauten AM, Popescu DM, Dragomir LP, Puiu I, Bogdan M y Popescu MR (2014). Matrix metalloproteinase - 7, -8, -9 and -13 in gingival tissue of patients with type 1 diabetes and periodontitis. *Rom J Morphol Embryol.* 55 (3): 1137–41.

Takahashi I, Nishimura M, Onodera K, Bae JW, Mitani H, Okazaki M, Sasano Y y Mitani H (2003). Expression of MMP-8 and MMP-13 genes in the periodontal ligament during tooth movement in rats. *J Dent Res.* 82 (8) 646–51.

Takahashi I, Onodera K, Nishimura M, Mitnai H, Sasano Y y Mitani H (2006). Expression of genes for gelatinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in periodontal tissues during orthodontic tooth movement. *J Mol Histol.* 37 (8-9): 333–42.

Theoleyre S, Wittrant Y, Tat SK, Fortun Y, Redini F y Heymann D (2004). The molecular triad OPG/RANK/RANKL: involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 15 (6): 457-75.

Thilander B, Rygh P y Reitan K. Reacciones tisulares en ortodoncia (2017). En: Graber L, Vanarsdall R, Vig K y Huang G. *Ortodoncia. Principios y técnicas actuales*. 4ª ed. Madrid: Elsevier; p. 145-220.

Toker H, Balci Yuce H, Lektemur Alpan AL, Gevrek F y Elmastas M (2018). Morphometric and histopathological evaluation of the effect of grape seed proanthocyanidin on alveolar bone loss in experimental diabetes and periodontitis. *J Periodont Res.* 53 (3): 478–86.

Trevisan M, Browne R, Ram M, Muti P, Freudenheim J, Carosella AM y Armstrong D (2001). Correlates of markers of oxidative status in the general population. *Am J Epidemiol.* 154 (4): 348–56.

Tsimikas S (2006). Oxidative biomarkers in the diagnosis and prognosis of cardiovascular disease. *Am J Cardiol.* 98 (11A): 9P-17P.

Tsuge A, Noda K y Nakamura Y (2016). Early tissue reaction in the tension zone of PDL during orthodontic tooth movement. *Arch Oral Biol.* 65: 17–25.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M y Telser J (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 39 (1): 44–84.

Van Beurden HE, Snoek PAM, Von den Hoff JW, Maltha JC y Kuijpers-Jagtman AM (2005). Dynamic protein expression patterns during intraoral wound healing in the rat. *Eur J Oral Sci.* 113 (2): 153–58

Vandevska-Radunovic V (1999). Neural modulation of inflammatory reactions in dental tissues incident to orthodontic tooth movement. A review of the literature. *Eur J Orthod.* 21 (3): 231-47.

Vernillo AT, Ramamurthy NS, Golub LM y Rifkin BR (1994). The nonantimicrobial properties of tetracycline for the treatment of periodontal disease. *Curr Opin Periodontol*. 1994: 111–18.

Vianna AGD, Sanches CP y Barreto FC (2017). Review article: effects of type 2 diabetes therapies on bone metabolism. *Diabetol Metab Syndr*. 9:75.

Villarino ME, Lewicki M y Ubios AM (2011). Bone response to orthodontic forces in diabetic Wistar rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 139 (4): S76-82.

Vlassara H (2001). The AGE-receptor in the pathogenesis of diabetic complications. *Diabetes Metab Res Rev*. 17 (6): 436–43.

Von Böhl M y Kuijpers-Jagtman AM (2009). Hyalinization during orthodontic tooth movement: a systematic review on tissue reactions. *Eur J Orthod*. 31 (1): 30-36.

Wildemann B, Schmidmaier G, Brenner N, Hüning M, Stange R, Hass NP y Raschke M (2004). Quantification, localization, and expression of IGF-I and TGF- β 1 during growth factor-stimulated fracture healing. *Calcif Tissue Int*. 74(4): 388-97

Wise GE y King GJ (2008). Mechanisms of tooth eruption and orthodontic tooth movement. *J Dent Res*. 87 (5): 414-34.

World Health Organization. (2016). Global report on diabetes. Geneva.

Xie R, Kuijpers-Jagtman AM y Maltha JC (2009). Osteoclast differentiation and recruitment during early stages of experimental tooth movement in rats. *Eur J Oral Sci*. 117 (1): 43–50.

Yamaguchi M y Kasai K (2005). Inflammation in periodontal tissues in response to mechanical forces. *Arch Immunol Ther Exp. (Warsz)*. 53 (5): 388-98.

Yamamoto Y, Hiroshi H, Saito I, Nishikai K y Saruta T (2004). Adiponectin, an adipocyte-derived protein, predicts future insulin resistance: two-year follow-up study in Japanese population. *J Clin Endocrinol Metab*. 89 (1): 87–90.

Yaras N, Sariahmetoglu M, Bilginoglu A, Aydemir-Koksoy A, Onay-Besikci, Turan B y Schulz R (2008). Protective action of doxycycline against diabetic cardiomyopathy in rats. *Br J Pharmacol*. 155 (8): 1174–84.

Zaccardi F, Webb DR, Yates T y Davies MJ (2016). Pathophysiology of type 1 and type 2 diabetes mellitus: a 90-year perspective. *Postgrad Med J*. 92 (1084): 63-69.

Zainal Ariffin SH, Yamamoto Z, Zainol Abidin IZ, Abdul Wahab RM y Ariffin ZZ (2011). Cellular and molecular changes in orthodontic tooth movement. *ScientificWorldJournal*. 11: 1788-803.

Zhang L, Li X y Bi L-J (2011). Alterations of collagen-I, MMP-1 and TIMP-1 in the periodontal ligament of diabetic rats under mechanical stress. *J Periodont Res*. 46 (4): 448–55.

10. ANEXOS

UNIVERSIDAD DE MURCIA Vicerrectorado de Investigación CEEA Comité Ético de Experimentación Animal CAMPUS MARE NOSTRUM 07.38	
Código CEEA: 281/2016	INFORME DE COMITÉ ÉTICO
INFORME DEL COMITÉ ÉTICO DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL	
DATOS DEL CENTRO	
Nombre: CEEA Universidad de Murcia	
Número de Registro del Centro: REGA ES300305440012	
Título del procedimiento: <i>"Efectos de la diabetes en el movimiento dentario ortodónico"</i>	
Responsable: D. Fabio Camacho Alonso	
Financiación: Fondos Propios	
Aspectos que han sido considerados para su evaluación:	
• Capacitación del personal investigador • Idoneidad del procedimiento en relación a los objetivos del estudio. • Metodología empleada • Posibilidad de conseguir conclusiones válidas con el menor nº posible de animales • Consideraciones de métodos alternativos • Idoneidad de las especies seleccionadas • Supervisión, Criterios de Punto Final y Finalización del Procedimiento	
Una vez evaluado el procedimiento antes mencionado, atendiendo a los puntos indicados y de conformidad con lo acordado el día 13 de enero de 2017 ¹ , el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Murcia, INFORMA FAVORABLEMENTE sobre la realización de dicho procedimiento.	
Firmado con certificado electrónico reconocido. La información sobre el firmante, la fecha de firma y el código de verificación del documento se encuentra disponible en los márgenes izquierdo e inferior	
D ^a . Nuria García Carrillo	D. Antonio Juan García Fernández
Secretaria en funciones CEEA	Presidente en funciones CEEA
¹ A los efectos de lo establecido en el art. 19.5 de la Ley 40/2015 de 1 de octubre de Régimen Jurídico del Sector Público (B.O.E. 02-10), se advierte que el acta de la sesión citada está pendiente de aprobación	
	Código seguro de verificación: RUxFMjuG-zQtX8Nkj-Db18H7zz-V87gkzIW
Esta es una copia auténtica imprimible de un documento administrativo electrónico archivado por la Universidad de Murcia, según el artículo 27.3 c) de la Ley 39/2015, de 2 de octubre. Su autenticidad puede ser contrastada a través de la siguiente dirección: https://sede.um.es/validador/	
COPIA ELECTRÓNICA - Página 1 de 1	