



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Expresión de CD69 y CD25 en
linfocitos durante el movimiento
dental ortodóntico en ratones.**

TESIS

Que para obtener el título de
CIRUJANO DENTISTA

P R E S E N T A

Paola Denisse Avila Patiño

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Ana Lilia García Hernández



Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo. de México, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Investigación realizada gracias al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (UNAM-DGAPA-PAPIIT) por el financiamiento para la realización de este trabajo con número de proyecto IN223619.

A Dios, por haberme permitido una buena vida hasta hoy, por brindarme la fortaleza para lograr mis metas y por ponerme a las personas correctas en mi camino.

A mis padres, por enseñarme que la perseverancia es un valor imprescindible en la vida. Les agradezco el ser mi impulso y mayor motivación, por siempre estar orgullosos de mí y por educarme con los mejores ejemplos. Nada de esto sería posible sin su amor y apoyo incondicional, gracias por siempre estar presentes en mis mayores logros.

A la Dra Ana, por ver en mí el potencial para seguir otros caminos y enseñarme a siempre buscar la excelencia. Gracias por su guía, sus consejos y su dedicación a este bonito proyecto.

Y a todas las personas que hicieron este camino aún más dichoso, gracias por todos los momentos de alegría y las enseñanzas que cada uno me brindó.

Índice

GLOSARIO.....	3
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES	9
JUSTIFICACIÓN	10
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	10
HIPÓTESIS.....	10
OBJETIVO GENERAL	11
OBJETIVOS PARTICULARES.....	11
MATERIAL Y MÉTODO	12
• ANIMALES.....	12
• MODELO EXPERIMENTAL.....	12
• CITOMETRÍA DE FLUJO	13
• ANÁLISIS ESTADÍSTICO	14
RESULTADOS	15
MOVIMIENTO ORTODÓNTICO	15
ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS.....	15
PRESENTACIÓN Y COESTIMULACIÓN	18
DISCUSIÓN	20
CONCLUSIONES.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21

Glosario

- APC: Célula presentadora de antígeno
- COX: Ciclooxygenasa
- Dkk-1: Proteína relacionada Dickkiof-1
- IFN- β : Interferon beta
- IFN- γ : Interferon gamma
- IL: Interleucina
- M-CSF: Factor estimulante de colonias de macrófagos
- MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad
- MMPs: Metaloproteinasas
- MO: Movimiento ortodóntico
- N: Newton
- NF- κ B: Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
- NO: Óxido nítrico
- Ob: Osteoblasto
- Oc: Osteoclastos
- OPG: Osteoprotegerina
- OSCAR: Receptor asociado a osteoclastos
- PDL: Ligamento periodontal
- PGE₂: Prostaglandina E₂
- RANK: Receptor activador para el factor nuclear κ B
- RANKL: Ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B
- Scl: Esclerostina
- TCR: Receptor de células T
- TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta
- TNF- α : Factor de necrosis tumoral alfa

Resumen

Introducción. El movimiento dental ortodóntico (MO) es el resultado de la remodelación ósea desencadenada por la aplicación de fuerza mecánica sobre el diente para que pueda ser desplazado dentro del hueso alveolar. El remodelado óseo se lleva a cabo por osteocitos, osteoblastos y osteoclastos a través de la producción de mediadores bioquímicos, como la esclerostina, el RANK-RANKL/OPG. Se sabe que la activación de linfocitos T es crucial para la resorción ósea del remodelado óseo, ya que participan en la expresión de RANKL, interactúan con monocitos para inducir la diferenciación de osteoclastos y producen citocinas osteoclastogénicas. Si bien se sabe que la activación de los linfocitos T es requerida para el remodelado óseo durante el MO, se desconoce en qué momento y en donde ocurre la activación de linfocitos T y quien los activa a través de la presentación del antígeno.

Objetivo. Determinar la expresión de los marcadores de activación C69 y CD25 en linfocitos T CD3⁺ CD4⁺; T CD3⁺ CD8⁺ y de MHC II en células presentadoras de antígeno CD11b⁺, CD11c⁺ de encía del periodonto y nódulo cervical de ratones sometidos a MO durante 3, 7, 10 y 14 días.

Metodología. Se utilizaron 20 ratones C57BL/6 de >20 g de peso corporal divididos en cinco grupos, a los que se les colocó un aparato ortodóntico en el hemimaxilar izquierdo formado por un resorte helicoidal anclado de los incisivos superiores al primer molar para que permita el movimiento en dirección mesial de este último con una fuerza sostenida de 0.35N. El aparato se mantuvo por 3, 7, 10 o 14 días. Una vez realizado el sacrificio por sobredosis de éter, se realizó el registro del movimiento dental entre el primer y segundo molar, se procesó enzimáticamente la encía del maxilar y se maceraron los nódulos linfáticos cervicales para obtener las células que fueron analizadas por citometría de flujo utilizando los anticuerpos anti CD3, CD4, CD8, CD69, CD25, MHC-II, CD11b y CD11c.

Resultados. El movimiento dental ortodóntico es progresivo y dependiente del tiempo desde los 3 y hasta los 14 días. El MO en encía provocó un incremento de linfocitos activados CD3⁺CD4⁺CD69⁺ a los tres días, que disminuyeron a los 7 días y volvieron a incrementarse a los 10 y 14 días en comparación con el control. Observamos un incremento de la población de células de la región de granulocitos a los 3 días que fueron disminuyendo en tiempos posteriores, pero no se observaron cambios en las poblaciones CD11b⁺; CD11c⁺ o CD11b⁺ CD11c⁺ con respecto al control; las células CD11c⁺MHCII⁺ y las CD11c⁺CD11b⁺MHCII⁺ disminuyeron a los 3 y 14 días del MO respectivamente en comparación con el control. En el ganglio cervical, el MO incrementó los linfocitos CD3⁺CD4⁺ a los 7, 10 y 14 días que además expresaron el marcador de activación CD25 los mismos tiempos y solo a los 10 y 14 días expresaron el marcador de activación CD69; los linfocitos CD3⁺CD8⁺ se incrementaron a los 7 días tras el MO, pero disminuyeron a los 10 días, estos linfocitos no expresaron los marcadores CD25 y/o CD69. Observamos una disminución de las células CD11b⁺ a los 3 días y las células CD11c⁺ a los 10 y 14 días en comparación con el control. No observamos cambios en la expresión de MHCII en las células presentadoras de antígeno.

Discusión. A los tres días del MO, los linfocitos CD4 activados en encía se incrementaron, probablemente debido a la expansión clonal *in situ* de estos linfocitos de memoria debido al estímulo mecánico; a los 7 días se incrementa el porcentaje de linfocitos activados en el ganglio cervical que se mantiene hasta los 14 días del MO, mientras que en la encía disminuyen los linfocitos activados a los 7 días pero se vuelven a incrementar a los 10 y 14 días, por lo que es probable que a estos tiempos los linfocitos observados en la encía migraran desde los nódulos cervicales. En encía parece que las células CD11c⁺ CD11b⁺ no participan en la presentación de antígeno *in situ* y en el ganglio cervical estas células presentadoras de antígeno disminuyeron, por lo que es probable que la presentación de antígeno y activación de linfocitos se lleve a cabo en otro sitio como en el tejido linfoide asociado a la mucosa nasal (NALT).

Conclusión. El MO experimental en ratones C57BL/6 induce el incremento de los linfocitos activados CD4⁺ CD69⁺ de forma temprana (3 y 7 días), posteriormente (10 y 14 días) se incrementan en el ganglio cervical. Es probable que la presentación de antígeno y activación de linfocitos se lleve a cabo en un sitio diferente a la encía o el ganglio cervical en este modelo de estudio.

Introducción

El movimiento ortodóntico (MO) es el resultado de cambios dentro del periodonto desencadenados por la aplicación de fuerza mecánica sobre el diente para que pueda ser desplazado dentro del hueso alveolar. Estas fuerzas mecánicas son percibidas por los osteocitos, que son las principales células del hueso, y que responden ante la deformación por estrés, por lo que son llamados mecanorreceptores óseos; al detectar estrés en sus prolongaciones citoplasmáticas, son responsables de transformar este estímulo mecánico en estímulo químico a través de vías de señalización que conllevan a cambios macro y microscópicos tisulares.

Aunque el tratamiento ortodóntico es una respuesta celular específica que aún no es completamente entendida, se basa en el principio de remodelación ósea, que es un proceso desacoplado de activación-resorción de la superficie del hueso, resultando en cambios en la forma, tamaño o posición. De esta forma, si una presión controlada y prolongada es aplicada a un diente, el hueso alrededor del diente se remodela y se puede producir el movimiento dental. (1)

Existen diversas teorías del movimiento dental por ortodoncia, pero la más aceptada es la teoría de presión-tensión, la cual indica que existen dos zonas de remodelación: la zona de presión, que se encuentra en el lado hacia donde se está moviendo el diente y que es la zona en la que las fibras del ligamento periodontal (PDL) son comprimidas, resultando en resorción ósea llevada a cabo por osteoclastos; y la zona de tensión, que se encuentra en el lado contrario hacia donde se mueve el diente y que es la zona en donde las fibras periodontales son estiradas, resultando en una aposición ósea llevada a cabo por osteoblastos. En estas dos zonas, la tasa de remodelación alveolar es determinada por la actividad de células óseas (osteoclastos, osteoblastos y osteocitos) que se encuentran bajo el control de factores mecánicos y bioquímicos. (2).

El proceso de MO inicia con la aplicación de la fuerza sobre el diente en una dirección, lo que provoca una inmediata vasodilatación periodontal que aumenta la permeabilidad vascular y lleva a la consecuente migración de leucocitos fuera de los capilares del PDL. Siguiendo la dirección de la fuerza, si ésta es sostenida, hay secreción de prostaglandinas y citocinas proinflamatorias, además de reducción del flujo sanguíneo en el área de presión, lo que altera los niveles de oxígeno en el PDL. La respuesta del hueso y del PDL en la zona de presión dependerá de la duración y magnitud de fuerza aplicada al diente, es decir, si se aplica una carga intensa, se corta completamente el flujo sanguíneo, resultando en una zona de muerte celular y degradación de fibras colágenas causada por activación de metaloproteinasas de la matriz (MMPs), llamada zona de hialinización; esta zona de degradación requiere ser eliminada por los macrófagos debido a que no permite la diferenciación de osteoclastos necesaria para que exista el MO. En contraste, cuando se aplica una fuerza controlada y constante, se reduce el flujo sanguíneo sin llegar a ocluirlo, permitiendo un rápido reclutamiento local de osteoclastos y preosteoclastos de los vasos sanguíneos dentro del PDL (3).

Una vez aplicada la fuerza con la consecuente vasodilatación en los sitios de microtrauma (zona de presión), el PDL se ensancha y los osteocitos del hueso alveolar perciben la carga, por lo que se produce esclerostina (Scl) y la proteína relacionada Dickkopf-1 (Dkk-1) que de forma parácrina inducen la producción del ligando del receptor activador para el factor nuclear κ B (RANKL) en los osteocitos u osteoblastos vecinos; este ligando se une a su receptor activador para el factor nuclear κ B (RANK) en los osteoclastos o sus precursores, promoviendo su diferenciación y activación para llevar a cabo la resorción ósea, al mismo tiempo, la esclerostina y la Dkk-1 inhiben la actividad osteoblástica. (Fig. 1) La misma carga mecánica produce microfracturas que inducen apoptosis de los osteocitos, lo que induce producción de RANKL por parte de los osteocitos vecinos. Además del RANKL, es necesaria la secreción del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) por parte de los osteocitos o de las células de revestimiento de las superficies óseas y la secreción de citocinas osteoclastogénicas, tales como interleucinas IL-1 β , IL-6, IL-8, y el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), quienes en conjunto, inducen la diferenciación, actividad y supervivencia de osteoclastos, además de aumentar el grado de inflamación y cantidad de metaloproteinasas que degradarán la matriz ósea y permitirán mejor anclaje de los osteoclastos.

Existen además vías independientes de RANKL para la maduración de osteoclastos, tal como el receptor asociado a Osteoclastos (OSCAR) o el M-CSF. (Fig. 2) (3) Estos osteoclastos activados degradan la matriz osteoide y solubilizan la hidroxiapatita del hueso por medio de enzimas proteolíticas y liberación de iones, respectivamente. Debido al estrés tisular de esta zona, hay niveles elevados de Ciclooxygenasa 2 (COX-2) que influye en la producción de prostaglandinas a partir del ácido araquidónico, siendo la prostaglandina E₂ (PGE₂) la principal, y que actúa sobre los osteoclastos al incrementar sus concentraciones intracelulares de Adenosin Monofosfato Cíclico (cAMP), mientras que en los osteoblastos, reduce su expresión de osteoprotegerina (OPG), lo que resulta en una mayor actividad resortiva y la expresión de RANKL. En cuanto al PDL, las fibras de esta zona pierden su inserción inicial para después volver a insertarse en el hueso. Una vez que los osteoclastos por medio de la resorción ósea remueven la lámina dura, el movimiento dental iniciará usualmente dos días después de la aplicación ligera de fuerza. (4)

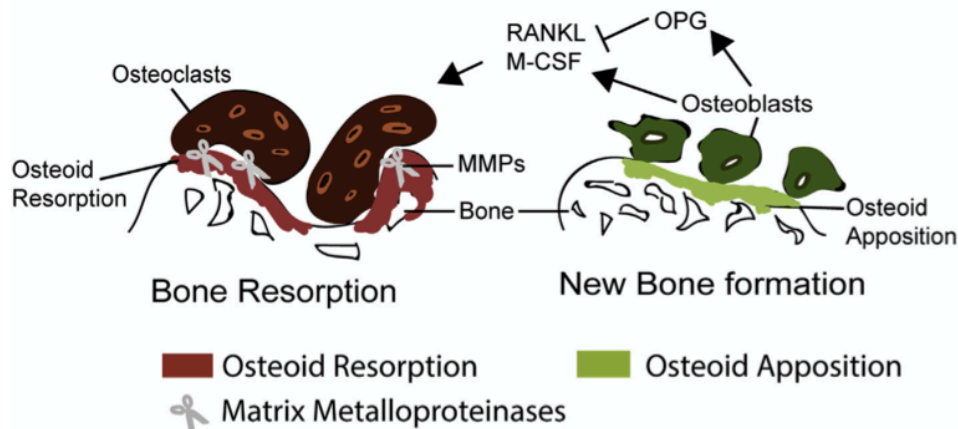


Fig.1 Vías de señalización en la resorción y aposición ósea. (3)

Cuando los osteoclastos terminan su función, se desanclan y entran en apoptosis, dando lugar a una fase reversiva, en la cual las células de revestimiento colonizan la superficie ósea y cesa la producción de Scl y Dkk-1. Mientras la resorción ósea ocurre en la zona de presión, en la zona de tensión hay mayor expresión de OPG, que es el receptor señuelo producido por osteoblastos y que compete con el RANKL para unirse al RANK, inhibiendo la activación o diferenciación de nuevos osteoclastos (Fig. 1). A partir de la matriz ósea, se liberan factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF- β) y proteínas morfogenéticas óseas (BMP), moléculas que inducen el reclutamiento de precursores de osteoblastos a partir de células mesenquimales de la médula ósea, además de producción de Colágeno tipo I, promoción de proliferación de células del PDL y el incremento de inhibidores de MMPs. La Interleucina-10 (IL-10) también se nota aumentada en esta zona, ya que promueve la síntesis de OPG y reduce la señalización de RANKL, favoreciendo la aposición; otras citocinas anti-osteoclastogénicas, tales como IL-4, IL-13, IL-18, e Interferones beta y gamma (IFN- β , IFN- γ ,) inhiben el factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B) y suprimen la expresión de COX-2 y PGE₂. Además de la producción de citocinas, en esta zona hay secreción de óxido nítrico (NO), ya que media la formación de hueso al proteger a los osteocitos y promover la diferenciación de osteoblastos, reduciendo la resorción ósea. (Fig 2). Los precursores reclutados y estimulados por estas moléculas maduran a osteoblastos y depositan matriz osteoide; una vez que éstos mineralizan el tejido, pueden permanecer en la matriz ósea convirtiéndose en osteocitos, otros sufren apoptosis y otros forman parte de las células de revestimiento de las superficies óseas. En cuanto al PDL, se da un reordenamiento y producción de nuevas fibras de Sharpey que se formarán e incorporarán a las ya existentes. (3-5)

Con las señalizaciones generadas para la aposición y resorción, se induce otro proceso importante durante la remodelación ósea, que es el reclutamiento de Linfocitos T en la zona de presión. El papel de los linfocitos T en la remodelación ósea aún no es completamente comprendido, sin embargo, se sabe que su intervención en la osteoclastogénesis es crucial, ya que participan en la expresión de RANKL, interactúan con monocitos para inducir su diferenciación y producen citocinas osteoclastogénicas (6), como la interleucina 17 (IL-17), expresada por linfocitos Th17, que aumenta la sensibilidad de señalización y expresión de RANKL e IL-6, acelerando directamente la diferenciación de osteoclastos a partir de monocitos, además, en células sinoviales y osteoblastos, inducen la producción de RANKL, permitiendo así el proceso de resorción ósea necesario en el MO. (7, 8)

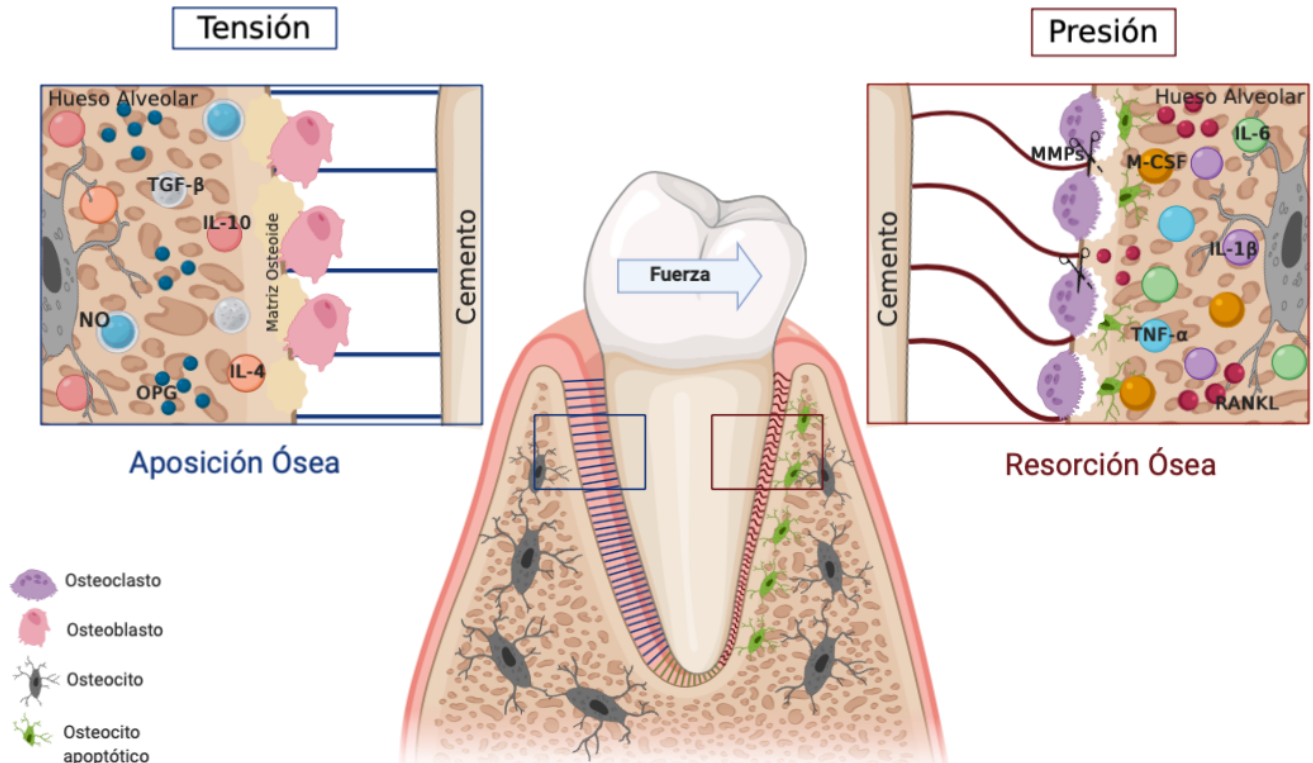


Fig.2 Moléculas expresadas en las zonas de tensión y presión del MO. Elaboración propia.

La diferenciación de linfocitos T requiere de su previa activación; este proceso inicia con la presentación de un antígeno por parte de una célula presentadora (APC) como un macrófago o célula dendrítica a un linfocito T virgen en un órgano linfático secundario, que puede ser en el nódulo linfático más cercano al sitio de lesión o del estímulo inicial. Las APCs procesan fragmentos del antígeno y lo presentan por medio del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), este es reconocido por el receptor de células T (TCR) específico. El MHC de clase II se unirá al TCR de una célula T auxiliar CD4⁺, mientras que el MHC de clase I se unirá al TCR de una célula T citotóxica CD8⁺. Para que la presentación de antígeno produzca la activación y no anergia del linfocito T, es esencial que la presentación permanezca estable y que el linfocito T reciba coestimulación. El CD40 y CD80/86 son moléculas coestimuladoras presentes en las APCs que se unen a su receptor CD40L y CD28 respectivamente en los linfocitos T. (Fig. 3) (9)

La presentación del antígeno y su coestimulación inducen vías de señalización en el linfocito T que, por un lado, estimula su proliferación clonal y por otro, lo activan para la producción de citocinas. Una vez que el linfocito es coestimulado y activado en el sitio linfático secundario, este puede salir a través de la circulación linfática al sitio de la lesión por “homing” que es la señalización química del sitio del estímulo inicial, en este caso, a la zona de presión. (10)

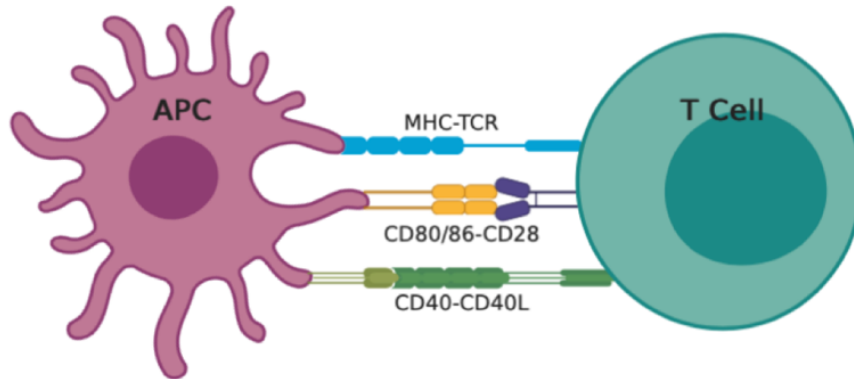


Fig.3 Moléculas de coestimulación en la activación de linfocitos T. Elaboración propia

Un linfocito activado expresa en su superficie marcadores de activación, que son proteínas receptoras, coestimuladoras, moléculas de adhesión, receptores de quimiocinas o de MHC. Los marcadores de activación tempranos en los linfocitos T son el CD69 y CD25:

El CD69 es conocido como el “antígeno de activación temprana” y es una glicoproteína que actúa como un receptor de membrana altamente expresado en linfocitos T activos, linfocitos B, NK, neutrófilos, eosinófilos entre otras células presentes en regiones de inflamación. Se conoce como uno de los marcadores que se expresan más rápidamente tras la activación de los linfocitos T, B y NK (2 horas después de la activación) (11) y su rápida expresión sugiere que puede aumentar la activación y/o diferenciación de los linfocitos T. Se ha demostrado que el CD69 *in vitro* presenta una función proinflamatoria, mientras que *in vivo*, actúa como una molécula reguladora, modulando la respuesta de inflamación (12).

El CD25 es la cadena alfa del receptor de interleucina-2. Es expresada en la superficie de linfocitos T maduros activados, linfocitos B, monocitos y macrófagos. Cuando se activa el linfocito CD4⁺, ellos mismos secretan IL-2 y expresan el CD25 en la superficie, de forma que la IL2 tiene una función autocrina para inducir la proliferación clonal. (13)

Antecedentes

La influencia de los linfocitos en la remodelación ósea no se ha entendido por completo, sin embargo, se sabe que su influencia depende del tipo de activación. Los linfocitos Th1 y Th17 expresan RANKL y producen citocinas TNF- α , IL-1, IL-6, and IL-17, de forma que son capaces de estimular la resorción ósea, mientras que los linfocitos T reguladores han demostrado inhibición de la osteoclastogénesis. De hecho, algunos estudios han demostrado la sobre-expresión de RANKL por parte de los linfocitos T *in vivo* en los sitios de resorción ósea. Es por esto, que la osteoclastogénesis es probablemente una respuesta específica ante la combinación de señales derivadas de hueso y células inflamatorias adyacentes, incluyendo a linfocitos T. (14)

En cuanto a la resorción ósea durante el MO, en ratones nude o inmunocomprometidos (deficientes de la respuesta de inmunidad adaptativa) se ha observado una reducción del movimiento dental y de la densidad mineral debido a la falta de resorción ósea por disminución de la osteoclastogénesis, sin embargo, cuando a estos ratones se les transfirieron linfocitos T, el MO se restauró por un aumento de la osteoclastogénesis y el incremento en la producción de TNF- α , incluso, se observó que la administración del anticuerpo anti-CD25 redujo el movimiento dental ortodóntico (15). Las moléculas de coestimulación CD40 y CD40L en el MO en un modelo murino se sobreexpresan mayormente a los 3 días en células tipo fibroblastos, macrófagos y células dendríticas en la zona de tensión, disminuyendo su expresión a los 7 y 10 días post-MO. (16)

Estos antecedentes dejan en evidencia que la activación de los linfocitos T es requerida para el remodelado óseo durante el MO. Se desconoce si la expresión de las moléculas de activación de linfocitos T CD25 o CD69 cambia con respecto al tiempo durante el MO, esto podría ayudar a identificar en qué momento del MO es crítico el papel de los linfocitos T y su activación. Tampoco se ha estudiado en que momento durante el MO se lleva a cabo la presentación del antígeno, que antígeno se les presenta a los linfocitos T y en donde ocurre esta presentación. Por lo que en esta investigación nos centramos en evaluar la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en los linfocitos T CD3, la expresión de CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno CD11b y CD11c a los 3, 7, 10 y 14 días del MO en el periodonto y de los nódulos cervicales en un modelo murino.

Justificación

Para el tratamiento clínico de ortodoncia, se han buscado procesos y técnicas que puedan acelerar el movimiento dental, con el objetivo de que el tratamiento sea más cómodo para el paciente y para la reducción de efectos colaterales. Tales técnicas se han enfocado a la reducción de la resistencia mecánica por parte del hueso alveolar, como la corticotomía, o el uso de algunas moléculas para el reclutamiento de precursores de osteoclastos como el M-CSF o incrementar el ratio RANKL/OPG. La identificación espacio-temporal de la función de los linfocitos T en el MO puede abrir una nueva alternativa para la modulación controlada del MO.

Si bien se sabe que la activación de los linfocitos T es requerida para el remodelado óseo durante el MO, se desconoce en qué momento su activación es indispensable y si se refleja en la expresión de las moléculas de activación CD25 o CD69; se desconoce, además, en que momento del MO se lleva a cabo la presentación del antígeno para la activación de linfocitos T y que antígeno se les presenta y en donde ocurre esta presentación. Por lo que en esta investigación nos centramos en evaluar la expresión de los marcadores de activación CD25 y CD69 en los linfocitos T CD3, la expresión de CD80 y CD86 en células presentadoras de antígeno, CD11b y CD11c a los 3, 7, 10 y 14 días del MO en el periodonto y de los nódulos linfáticos cervicales en un modelo murino.

Pregunta de investigación

¿Se incrementa la expresión de CD25 o CD69 en linfocitos T CD4 en el periodonto y nódulos cervicales y/o la expresión de MHCII en células presentadoras de antígeno CD11b o CD11c en los nódulos cervicales con el grado de movimiento dental ortodóntico en ratones C57BL/6?

Hipótesis

Los linfocitos T CD4 en el periodonto y nódulo linfático incrementan su expresión de CD25 y/o CD69 conforme al movimiento dental ortodóntico.

Las células presentadoras de antígeno CD11b o CD11c de los nódulos cervicales incrementan su expresión de MHCII conforme al movimiento dental ortodóntico.

Objetivo General

Determinar la expresión de los marcadores de activación C69 y CD25 en linfocitos T CD3⁺ CD4⁺; T CD3⁺ CD8⁺ y de MHC II en células presentadoras de antígeno CD11b⁺, CD11c⁺ o CD11c⁺ CD11b⁺ de encía del periodonto y nódulo cervical de ratones sometidos a MO durante 3, 7, 10 y 14 días.

Objetivos Particulares

En ratones sometidos a MO y controles por 3, 7, 10 y 14 días:

- Determinar la distancia entre el primer y segundo molar provocado por el movimiento ortodóntico.
- Determinar el porcentaje de linfocitos CD3⁺, CD4⁺, CD69⁺ ó CD25⁺; CD3⁺, CD8⁺, CD69⁺ o CD25⁺ por citometría de flujo en la encía y en el nódulo cervical.
- Determinar el porcentaje de células presentadoras de antígeno CD11b⁺, CD11c⁺ y MHC-II⁺ por citometría de flujo en la encía y en el nódulo cervical.

Material y Método

- **Animales**

Se utilizaron 20 ratones de cepa C57BL/6 (hembras y machos, mayores a 20 semanas de edad o con peso corporal mayor a 20 g) obtenidos del Laboratorio de Investigación Odontológica de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM. Los animales fueron mantenidos en condiciones de bioterio en micro-aisladores bajo las recomendaciones mencionadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 y de acuerdo con las normas del Comité de Ética de la FESI, UNAM (CE/FESI/082019/1324).

- **Modelo experimental**

Los ratones se dividieron en cuatro grupos: Ctrl, 3d, 7d, 10d, y 14d y cada grupo tuvo una “n” de 4. Todos los procedimientos fueron realizados bajo anestesia general con una inyección intraperitoneal de 0.1 mL/10 g de peso del ratón de una combinación de ketamina (10 mg/mL) y xilacina (1 mg/mL).

El movimiento ortodóntico en los ratones se indujo por el modelo de Kirschneck, 2013 (17) (Fig 4). Los ratones se colocaron en posición de decúbito dorsal con las extremidades fijadas suavemente por listón en la mesa quirúrgica hecha de madera con depresión en el centro ocupada por el cuerpo del ratón. La cabeza se posicionó sobre una espuma de poliuretano para evitar lesiones. La iluminación se logró por medio de lámpara con luz LED montada sobre la mesa quirúrgica, incluyendo lentes de magnificación 2.5×. Para permitir la completa visualización de las estructuras intraorales, se fijó el maxilar por medio de listón sujetado por los incisivos superiores hacia un extremo de la mesa quirúrgica. El maxilar inferior se fijó por medio de listón, sujetando la lengua e incisivos inferiores. La retracción del carrillo se logró manualmente por medio de una cucharilla extragrande.

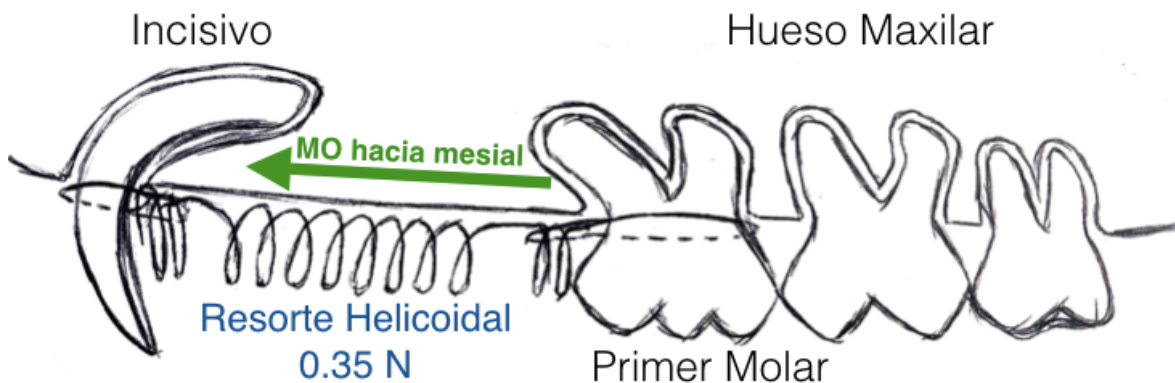


Fig. 5. Aparato de ortodoncia con resorte de NiTi ligado al primer molar y a los incisivos superiores

El aparato ortodóntico se colocó en el hemimaxilar izquierdo y consistió en un resorte helicoidal cerrado de níquel-titanio (NiTi Open Spring 009 x 7.25, Lancer Orthodontics, USA), ligado por medio de ligadura de plata de calibre 0.08” (American Ortho-tech Laboratories, USA) alrededor del cuello clínico del primer molar y anclado a los incisivos superiores (Esquema 1). En el día 0, se aplicó una fuerza de 0.35 N verificada por medio de dinamómetro y no se requirió reactivación a lo largo del experimento. Para evitar un desajuste del aparato, se reforzó con composite fluido en zona de incisivos superiores, por medio de grabado con ácido fosfórico al 35%, (Etchant Gel S, Coltene, USA) por 120 s, enjuagado por 15 s con agua normal, secado por 15 s, pincelado y fotocurado de adhesivo (One Coat Bond SL, Coltene, USA) y empaste con resina fluida fotocurable (Filtek Z350 XT, A2 Flowable Restorative, 3M ESPE, USA). (18)

En el día de sacrificio, los ratones fueron sometidos a sobredosis por CO₂ de acuerdo con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO1999 y se obtuvo la sangre por punción cardíaca. Posteriormente, se obtuvo el tejido gingival y los nódulos cervicales.

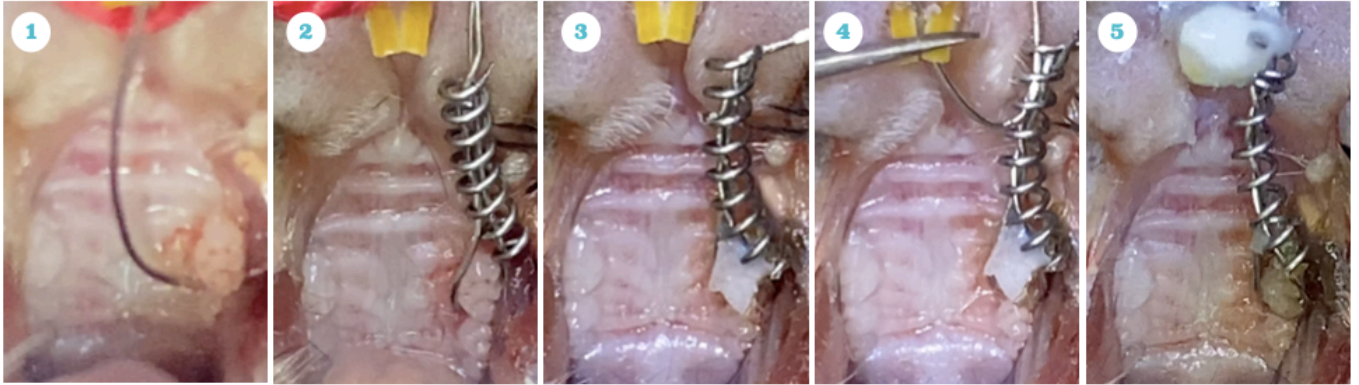


Fig. 6 Colocación del aparato de ortodoncia en hemimaxilar izquierdo

- **Movimiento ortodóntico**

Tras la disección del maxilar, la distancia del movimiento fue medida por medio de la longitud encontrada entre el punto más alto de la cúspide bucodistal del primer molar y el punto más alto de la cúspide bucomesial del segundo molar (Fig. 7) con un calibrador vernier digital. Para corroborar la medición, se realizaron toma de fotografías con microscopio digital por medio del software MicroCapture (Celestron, California, USA), además de la medición del espacio entre primer y segundo molar en una impresión tomada con silicona por condensación de consistencia ligera en un portaimpresiones individual.

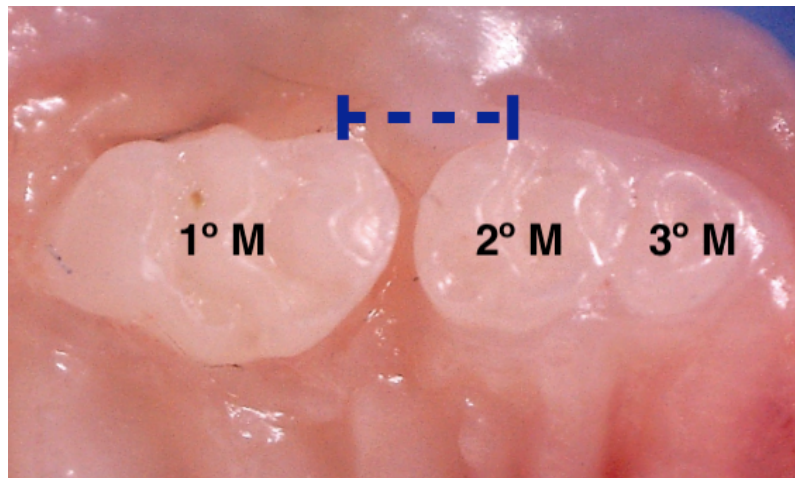


Fig. 7 Puntos de referencia utilizados para la medición con el calibrador digital. 1° M=Primer molar, 2° M= Segundo molar y 3° M= Tercer molar

- **Citometría de flujo**

Se realizó este análisis en encía y nódulos linfáticos cervicales los ratones de cada grupo para la identificación de subpoblaciones celulares y expresión de marcadores de activación en linfocitos T. Para la identificación de linfocitos, se utilizaron los marcadores CD3, CD4 y CD8; para la activación de linfocitos, los marcadores CD69 y CD25; para las APC, se usará el marcador CD611b y marcador CD11c y para las moléculas coestimuladoras, los marcadores CD80 y CD86. Las muestras fueron analizadas con un citómetro de flujo FACSAria III (BD) y el análisis se realizará por medio del software FACSDiva.

- ❖ **Encía:** Una vez realizadas las mediciones de los hemimaxilares, se obtuvo la encía y se seccionó en dos pedazos (Control y MO), se seccionó en pedazos de 1mm³ para ser tratados con 2 mg/ml de colagenasa tipo II, 2 mg/ml de hialuronidasa y 1mg/ml de DNAsa tipo I a 37° C por 30 mins. (19). Posteriormente fueron filtradas en tela de organza y cada tubo fue aforado a 10 ml y centrifugado durante 10 mins a 1500 RPM, se retiró el sobrenadante y se resuspendió la pastilla celular con 1 ml de RPMI limpio que se pasó a un tubo eppendorf y se centrifugó durante 5 mins a 1500 RPM. Nuevamente se retiró el sobrenadante y se agregaron 15 µL de anticuerpo CD16/32, incubándolo en hielo durante 10 mins. Posteriormente se colocaron 25 µL de anticuerpo CD3-PE, CD4-FITC, CD8-PECy5/PERCP, CD69-Alexa700 y CD25-APCCy7 para la tinción #1 y CD11c-FITC, CD11b-APC y MHCII-PerCP para la tinción #2. El tubo se incubó en hielo durante 30 mins y posteriormente, las células fueron lavadas con 1 ml de PBA y centrifugadas por 5 mins a 1500 RPM, se retiró el sobrenadante y se fijó con 300 µL de paraformaldehído al 1%. Una vez fijadas, se resuspendieron y se colocaron en tubos para análisis de citometría, guardados en oscuridad a 4° C hasta su lectura.
- ❖ **Nódulos cervicales:** Se obtuvieron los nódulos cervicales y fueron disgregados para obtener las células. Se repitió el proceso de la tinción #1, es decir, las células fueron teñidas con los anticuerpos CD3-PE, CD4-FITC, CD8-PECy5/PERCP, CD69-Alexa700 y CD25-APCCy7.

- **Análisis estadístico**

Se analizó la distribución de los datos y se determinó si existen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos mediante ANOVA de dos vías para el movimiento y ANOVA de una vía para los datos de citometría utilizando el software GraphPad Prism 8. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas si *p≤ 0.05.

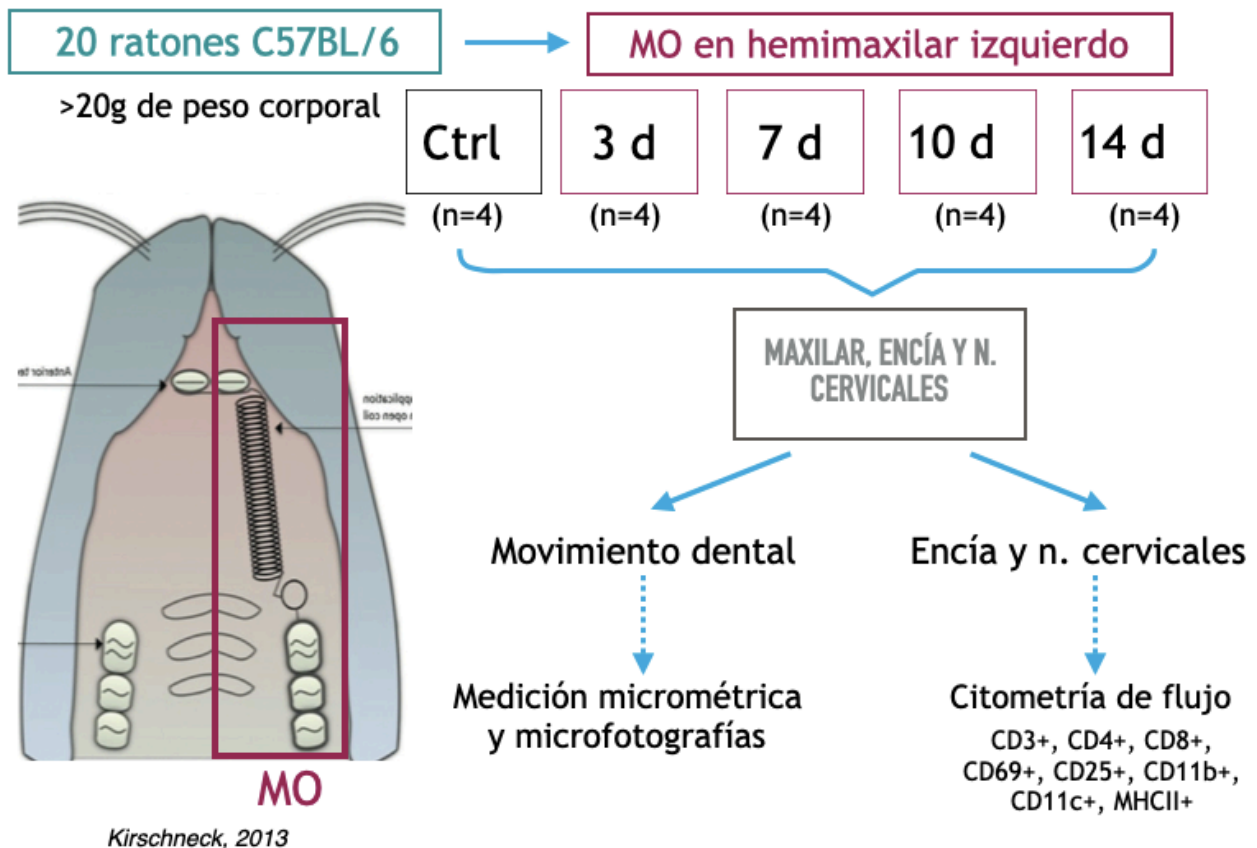


Fig. 8 Estrategia experimental

Resultados

Movimiento ortodóntico

Con el objetivo de evaluar el movimiento dental con respecto al tiempo, se evaluó la distancia como se describió en material y métodos. Observamos que el movimiento dental ortodóntico es progresivo y dependiente del tiempo desde los 3 y hasta los 14 días, donde la distancia entre el primer y segundo molar es significativamente diferente al grupo control. (Fig. 9 A).

Se observó una diferencia de movimiento significativa a los 10 y 14 días respecto al grupo de 3 días y también un movimiento significativo a los 14 días respecto al grupo de 7 días. (Fig. 9 B) La media de la distancia entre los puntos de referencia en los hemimaxilares control fue de 455 μm , mientras que en el grupo de 3d fue de 537 μm , en el de 7d fue de 595 μm , en el de 10d fue de 652 μm y en el de 14 d fue de 718 μm , por lo que en este último grupo, se demuestra un movimiento ortodóntico de 263 μm .

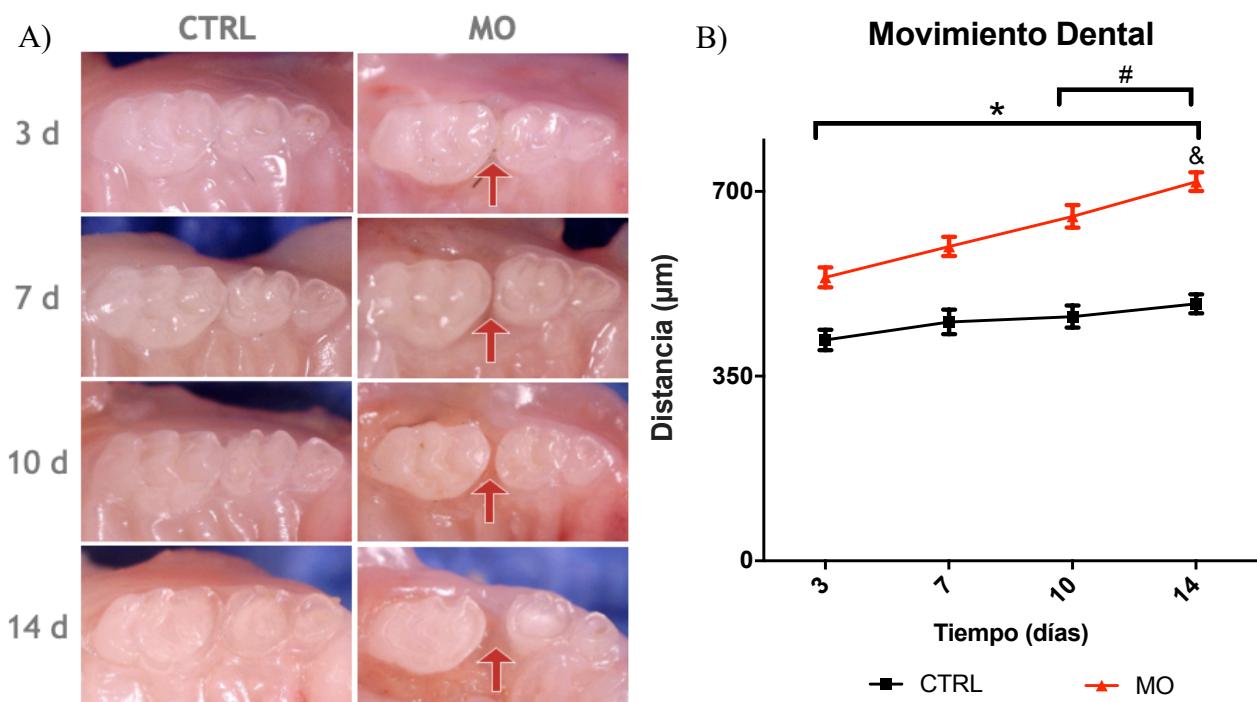


Fig. 9 A) Microfotografía digital de los hemimaxilares tras la aplicación del aparato ortodóntico y su respectivo hemimaxilar contralateral como control. B) Media y SEM de los cambios en el movimiento dental entre 1^{er} y 2^{do} molar maxilar a diferentes tiempos. * $p < 0.05$ vs CTRL, # $p < 0.05$ vs 3 días, & $p < 0.05$ vs 7 días. Two way ANOVA, Tukey post Hoc.

Activación de linfocitos

En la citometría de flujo realizada en encía se observó un incremento gradual del número de linfocitos, alcanzando su pico máximo a los 10 días y disminuyendo a los 14, mientras que el porcentaje de linfocitos CD3^+ disminuye y vuelve a normalizarse sin significancia estadística. En cuanto a la cantidad de linfocitos CD4^+ , los grupos experimentales se mantienen en niveles similares al grupo control, mientras que los CD8^+ disminuyen de manera significativa a los 3 días (Fig 10). El MO en encía provocó un incremento de linfocitos activados $\text{CD3}^+\text{CD4}^+\text{CD69}^+$ a los 3 días, que disminuyeron a los 7 días y volvieron a incrementarse a los 10 y 14 días en comparación con el control, mientras que en los linfocitos CD8^+ no hubo resultados estadísticamente significativos para la activación (Fig 11).

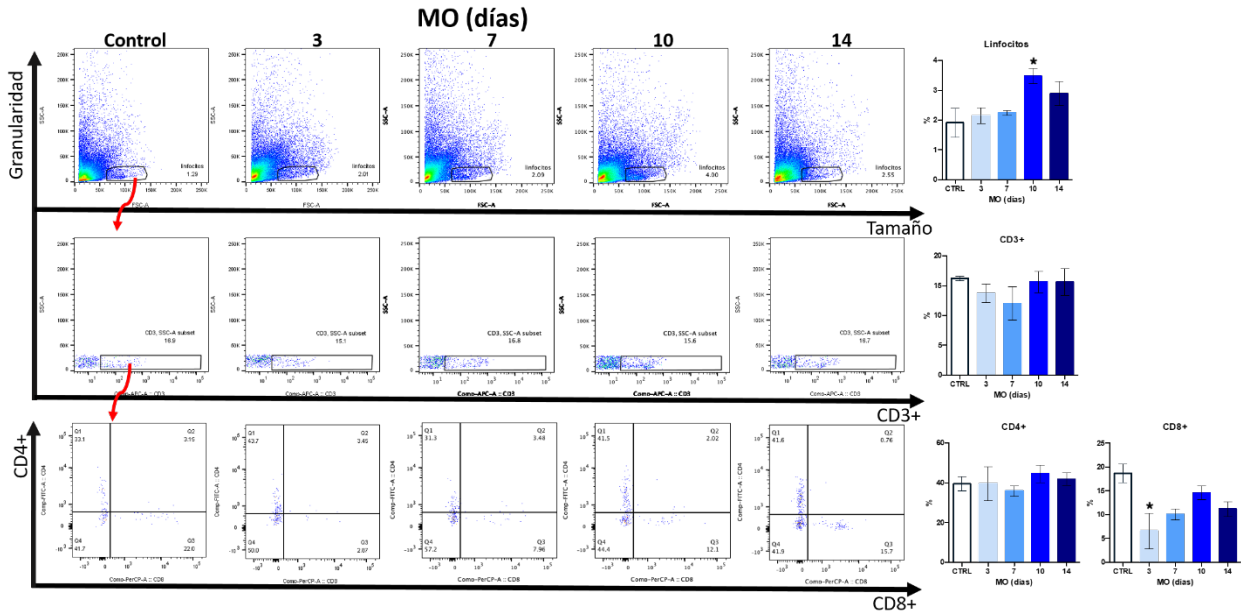


Fig. 10 Linfocitos CD3 CD4 y CD8 en encía a distintos tiempos del MO. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

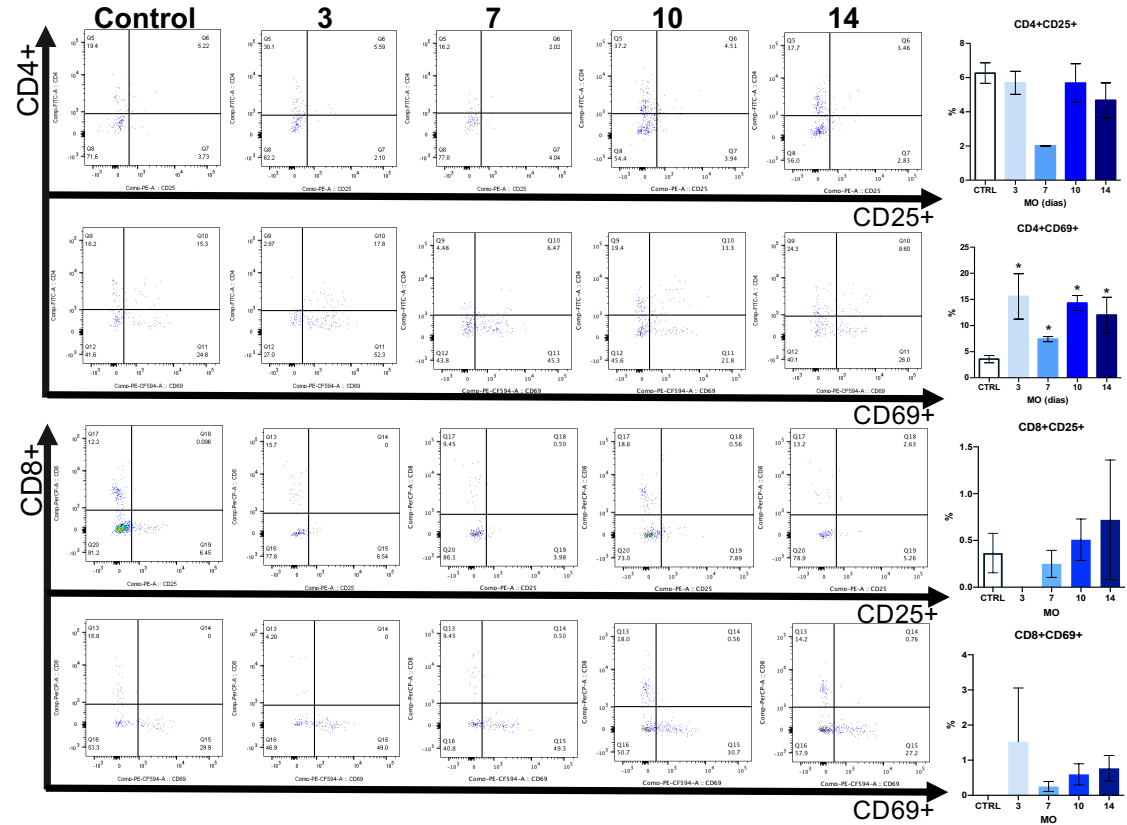


Fig. 11. Activación de linfocitos T en encía a distintos tiempos de MO. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

En ganglio cervical, el MO aumentó el número de linfocitos a los 10 y 14 días respecto al grupo control y al grupo de 3 días, mismo comportamiento observado en los linfocitos CD3⁺. También se observó un incremento en los linfocitos CD3⁺CD4⁺ a los 7, 10 y 14 días (Fig 12) que además expresaron el marcador de activación CD25 los mismos tiempos y solo a los 10 y 14 días expresaron el marcador de activación CD69. Por el contrario, en los linfocitos CD8⁺, se observó una disminución a los 10 días comparado con el grupo de 7 días, donde la cantidad aumenta significativamente respecto al grupo control (Fig 13). Los linfocitos CD3⁺CD8⁺ se incrementaron a los 7 días tras el MO, pero disminuyeron a los 10 días sin expresar marcadores de activación.

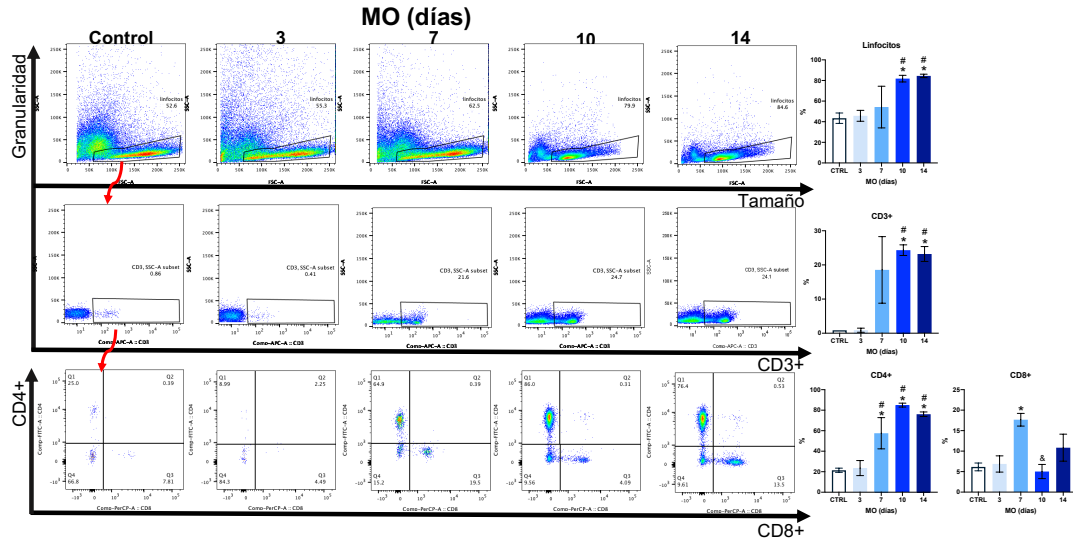


Fig. 12 Linfocitos en ganglio cervical a distintos tiempos de MO. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL, # p<0.05 vs 3 días, & p<0.05 vs 7 días. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

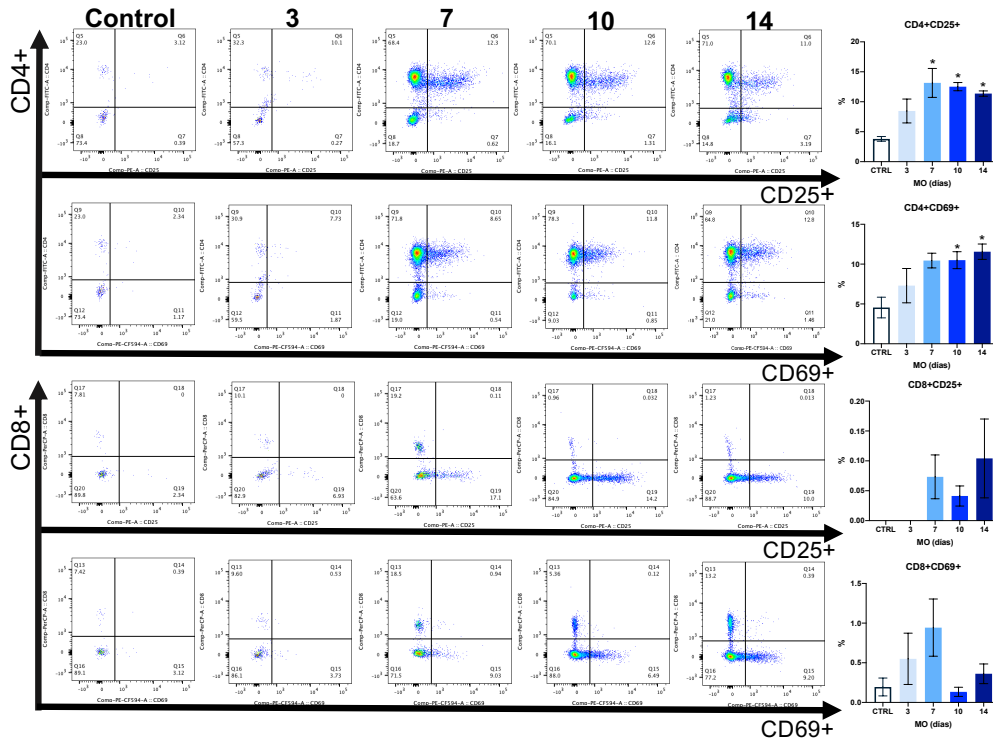


Fig. 13 Activación de linfocitos en ganglio cervical a distintos tiempos de MO. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

Presentación y coestimulación

En encía se observó un incremento de la población de células de la región de granulocitos a los 3 días que fueron disminuyendo en tiempos posteriores, pero no se observaron cambios en las poblaciones CD11b⁺; CD11c⁺ o CD11b⁺ CD11c⁺ con respecto al control (Fig 14); las células CD11c⁺MHCII⁺ y las CD11c⁺CD11b⁺MHCII⁺ disminuyeron a los 3 y 14 días del MO respectivamente en comparación con el control (Fig 15).

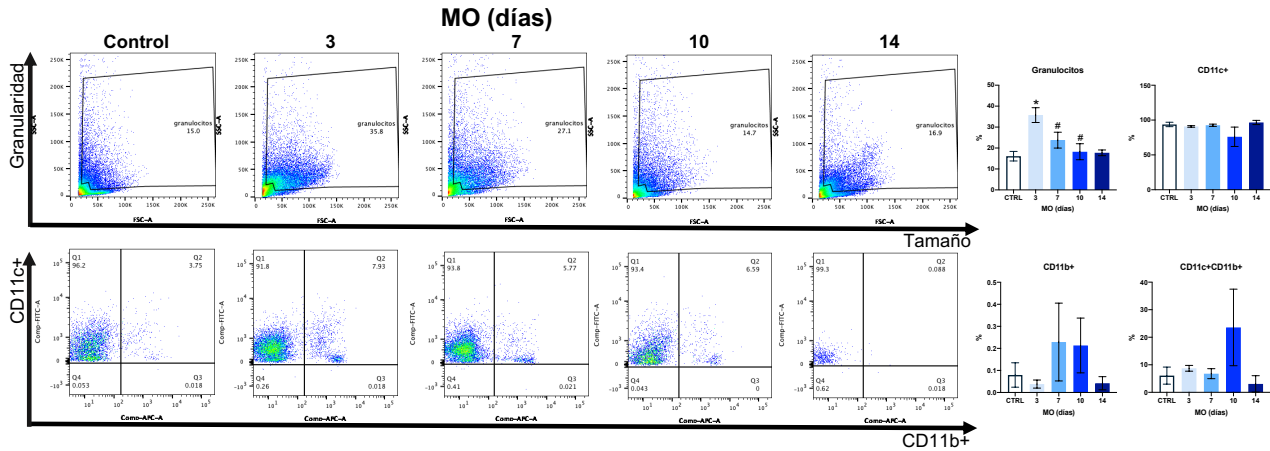


Fig. 14 Granulocitos en encía a distintos tiempos de MO. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL. # p<0.05 vs 3 días. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

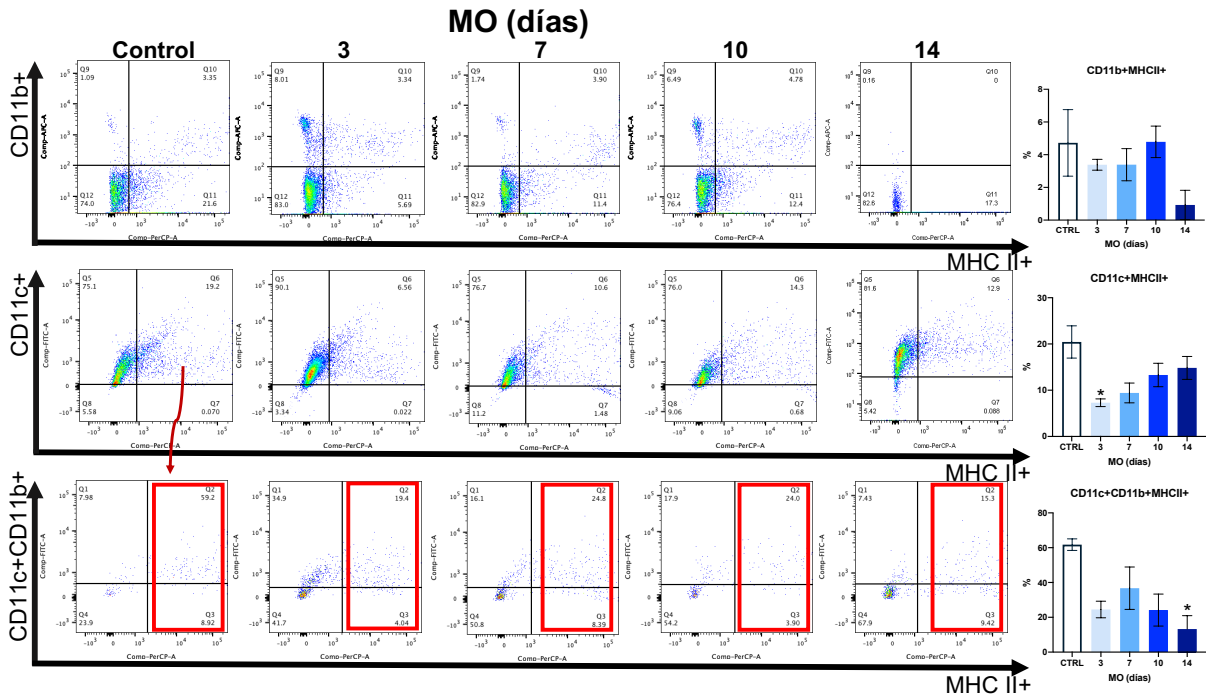


Fig. 15 Expresión de MHCII en células presentadoras de antígeno en encía a distintos tiempos de MO. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL, # p<0.05 vs 3 días, & p<0.05 vs 7 días. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

Observamos una disminución de las células CD11b⁺ a los 3 días y las células CD11c⁺ a los 10 y 14 días en comparación con el control. No observamos cambios en granulocitos ni en la expresión de MHCII en las células presentadoras de antígeno. (Fig 16 y Fig 17).

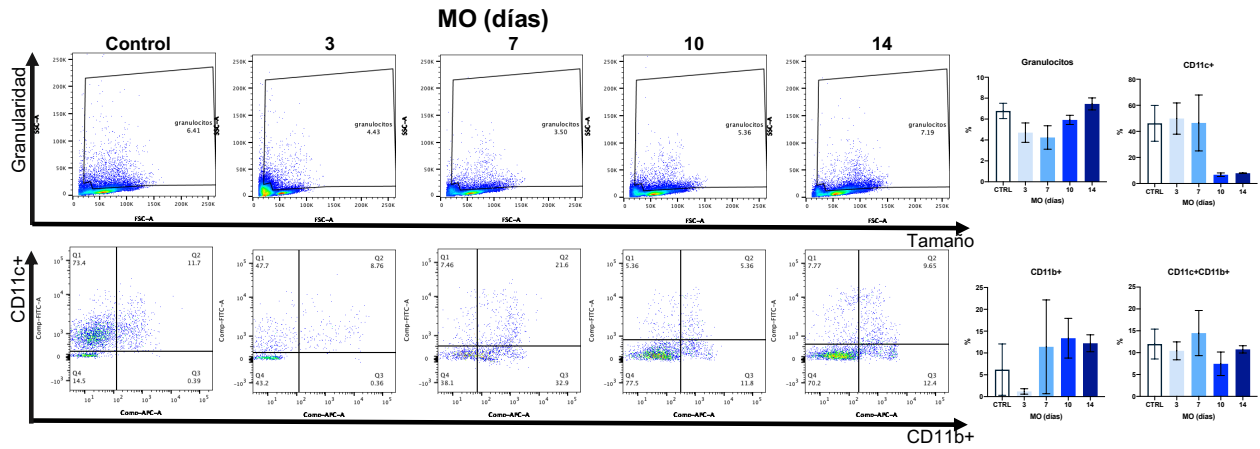


Fig. 16 Granulocitos en ganglio a distintos tiempos de MO. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

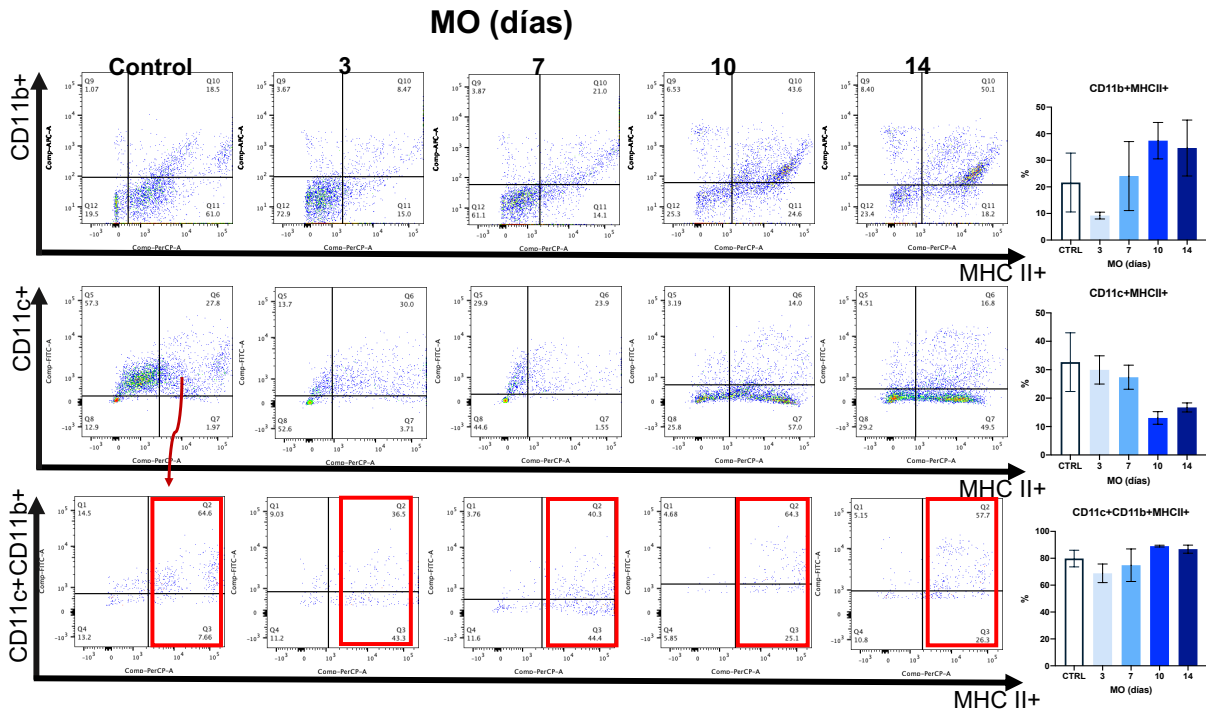


Fig. 17 Expresión de MHCII en células presentadoras de antígeno en ganglio a distintos tiempos. n=4 por grupo * p<0.05 vs CTRL. One way ANOVA, Tukey post Hoc.

Discusión

En el presente estudio, demostramos un movimiento ortodóntico significativo entre el grupo control y a los 3, 7, 10 y 14 días (82, 140, 197 y 263 μm respectivamente), los cuales son resultados similares a los presentados en estudios previos donde miden el MO con fuerza de 0.35 N a los 7 días en ratones BALB/c (Y. Zhou et al. 2017) (A Da Silva et al. 2012); contrario a Jettar V et al., quienes demuestran un movimiento de 600 micras a los 7 días con misma cantidad de fuerza aplicada pero con un aparato colocado en ratas Wistar, lo que posiblemente explique la diferencia de distancia por MO. Esto sugiere que la remodelación ósea necesaria para el movimiento dental se lleva a cabo de forma rápida en un inicio y al aplicar una fuerza controlada, es llevada a cabo de manera sostenida con el paso de tiempo sin llegar a la producción de una zona de hialinización.

La citometría de flujo es una técnica para el estudio de características de poblaciones de forma simultánea y directa. Es por esto, que su uso nos permitió la identificación de marcadores celulares en el tejido gingival, así como en nódulos cervicales, ya que los estudios previos similares solamente hablan del comportamiento de células del sistema inmune ante inflamación crónica causada por patologías destructivas, tales como gingivitis y periodontitis. (Mizraji G et al. 2013).

Como lo reportado por Y. Zhou, nuestro estudio demuestra la presencia de linfocitos T en la remodelación ósea provocada por fuerza mecánica, debido a que existe mayor cantidad de linfocitos T tanto en encía como en ganglio cervical. De acuerdo con lo reportado anteriormente, se encuentra un aumento en los linfocitos T CD3+CD4+ (Jeong-Chae et al. 2011). A los tres días del MO, los linfocitos CD4 activados en encía se incrementaron, probablemente debido a la expansión clonal *in situ* de estos linfocitos de memoria debido al estímulo mecánico; a los 7 días se incrementa el porcentaje de linfocitos activados en el ganglio cervical que se mantiene hasta los 14 días del MO, mientras que en la encía disminuyen los linfocitos activados a los 7 días pero se vuelven a incrementar a los 10 y 14 días, por lo que es probable que a estos tiempos los linfocitos observados en la encía migraran desde los nódulos cervicales.

En el estudio de los linfocitos CD8⁺, se ha reportado que su función en la regulación ósea es limitar la resorción (Rajeev A. et al. 2013), lo que podría coincidir con la disminución de éstos en encía a los 3 días, permitiendo la resorción necesaria para el remodelado, así como su aumento a los 7 días en ganglio para limitar la osteoclastogénesis una vez que ya haya habido resorción.

En encía parece que las células CD11c⁺ CD11b⁺ no participan en la presentación de antígeno *in situ* y en el ganglio cervical estas células presentadoras de antígeno disminuyeron, por lo que es probable que la presentación de antígeno y activación de linfocitos se lleve a cabo en otro sitio como en el tejido linfoide asociado a la mucosa nasal (NALT) o en la zona de resorción ósea, como lo propuesto por Alhashimi N et al. 2004, donde demuestran que la hiperexpresión e interacción de CD40 y CD40L en células del PDL puede estimular la activación celular y la síntesis de citocinas, proponiendo a la molécula de CD40 como el antígeno en la zona de resorción.

Conclusiones

El MO experimental en ratones C57BL/6 induce el incremento de los linfocitos activados CD4⁺ CD69⁺ de forma temprana (3 y 7 días) y posteriormente (10 y 14 días) se incrementan en el ganglio cervical. Debido a que se observa menor cantidad de células presentadoras de antígeno que expresan MHC-II en encía o en el ganglio cervical, es probable que la presentación de antígeno y activación de linfocitos se lleve a cabo en un sitio diferente a la encía o el ganglio cervical en este modelo de estudio.

Bibliografia

1. Murshid SA. The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement: A review. *Arch Oral Biol.* 2017;73:25-33.
2. Rygh P. Ultrastructural changes in tension zones of rat molar periodontium incident to orthodontic tooth movement. *American journal of orthodontics.* 1976;70(3):269-81.
3. Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko CC. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *The Kaohsiung journal of medical sciences.* 2018;34(4):207-14.
4. Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochimica medica.* 2013;23(1):43-63.
5. Lerner UH, Kindstedt E, Lundberg P. The critical interplay between bone resorbing and bone forming cells. *Journal of clinical periodontology.* 2019;46 Suppl 21:33-51.
6. Jettar V, Napimoga MH, Freitas F, Clemente-Napimoga JT, Suzuki SS, Montalli VA, et al. Effects of Photobiomodulation on SOFAT, A T-cell-derived Cytokine, May Explain Accelerated Orthodontic Tooth Movement. *Photochem Photobiol.* 2018;94(3):604-10.
7. Hayashi N, Yamaguchi M, Nakajima R, Utsunomiya T, Yamamoto H, Kasai K. T-helper 17 cells mediate the osteo/odontoclastogenesis induced by excessive orthodontic forces. *Oral Dis.* 2012;18(4):375-88.
8. Yamada K, Yamaguchi M, Asano M, Fujita S, Kobayashi R, Kasai K. Th17-cells in atopic dermatitis stimulate orthodontic root resorption. *Oral diseases.* 2013;19(7):683-93.
9. Reddy M, Eirikis E, Davis C, Davis HM, Prabhakar U. Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods.* 2004;293(1-2):127-42.
10. Lei L, Cui L, Mao Y, Zhang X, Jiang Q, Dong S, et al. Augmented CD25 and CD69 expression on circulating CD8+ T cells in type 2 diabetes mellitus with albuminuria. *Diabetes & metabolism.* 2017;43(4):382-4.
11. Shipkova M, Wieland E. Surface markers of lymphocyte activation and markers of cell proliferation. *Clin Chim Acta.* 2012;413(17-18):1338-49.
12. Sancho D, Gomez M, Sanchez-Madrid F. CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends Immunol.* 2005;26(3):136-40.
13. Liu P, Jiang H, Che M, Fu R, Wang H, Li L, et al. Abnormal CD25 expression on hematopoietic cells in myelodysplastic syndromes. *Leukemia research.* 2018;67:12-6.
14. Pacifici R. T cells, osteoblasts, and osteocytes: interacting lineages key for the bone anabolic and catabolic activities of parathyroid hormone. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2016;1364:11-24.
15. Yan Y, Liu F, Kou X, Liu D, Yang R, Wang X, et al. T Cells Are Required for Orthodontic Tooth Movement. *J Dent Res.* 2015;94(10):1463-70.
16. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. CD40-CD40L expression during orthodontic tooth movement in rats. *The Angle orthodontist.* 2004;74(1):100-5.
17. Kirschneck C, Proff P, Fanghaenel J, Behr M, Wahlmann U, Roemer P. Differentiated analysis of orthodontic tooth movement in rats with an improved rat model and three-dimensional imaging. *Ann Anat.* 2013;195(6):539-53.
18. Taddei SR, Moura AP, Andrade I, Jr., Garlet GP, Garlet TP, Teixeira MM, et al. Experimental model of tooth movement in mice: a standardized protocol for studying bone remodeling under compression and tensile strains. *J Biomech.* 2012;45(16):2729-35.
19. Mizraji G, Segev H, Wilensky A, Hovav AH. Isolation, processing and analysis of murine gingival cells. *Journal of visualized experiments : JoVE.* 2013(77):e50388.