

# Relación entre niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 $\alpha$ , IL-1RA en fluido crevicular y velocidad de movimiento dental.

## Estudio Piloto

Barreto M<sup>1</sup>, Ordóñez P<sup>1</sup>, Blanco M<sup>2</sup>, Méndez LM<sup>3</sup>, Suárez A<sup>4</sup>, Sánchez GA<sup>5</sup>, Velosa-Porras J<sup>6</sup>, Pardo MA<sup>7</sup>, Roa NS<sup>8</sup>, Martínez RH<sup>9</sup>.

1. Odontólogas PUJ, Residentes Posgrado de Ortodoncia PUJ.
2. Odontóloga PUJ - Periodoncista PUJ., Profesor Posgrado de Periodoncia PUJ.
3. Ingeniero Mecánico y Msc. UniAndes PhD. (C), Profesor Asociado Universidad Nacional del Colombia.
4. Odontóloga PUJ. Ms en Epidemiología, Candidata PhD en epidemiología. Profesora Facultad de Odontología.
5. Odontólogo Universidad Autónoma de Manizales, Ortodoncista PUJ., Profesor Asistente Posgrado de Ortodoncia PUJ, Director de Departamento del Sistema Craneofacial PUJ.
6. Odontóloga PUJ, Msc en Epidemiología Clínica, PhD (c) en Epidemiología Clínica de la facultad de Medicina de la PUJ, Profesora Asociada de pregrado de la Facultad de Odontología. Centro de Investigaciones Odontológicas, CIO,PUJ.
7. Odontólogo, Universidad Nacional de Colombia, Ortodoncista Universidad de Antioquia, Profesor del Posgrado de Ortodoncia PUJ, Universidad Nacional de Colombia y Universidad Santo Tomás Bucaramanga.
8. Odontóloga PUJ. Msc en Microbiología con énfasis en Inmunología, PhD en Ciencias Biomédicas Universidad Nacional Autónoma de México. Profesora de pregrado y posgrado Facultad de Odontología. Directora Centro de Investigaciones Odontológicas.
9. Odontólogo PUJ, Ortodoncista, M.Sc U of Manitoba (Canadá).

## Resumen

**Antecedentes:** La fuerza mecánica en tratamientos ortodóncicos sobre un diente, es transmitida al periodonto induciendo su movimiento a través del hueso alveolar, favorecido por la liberación de diferentes citocinas; sus altos o bajos niveles y su correlación con la desaceleración del movimiento dental en el tiempo, pueden ser diferentes entre los individuos.

**Objetivo:** Identificar la relación entre los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-1RA en fluido crevicular gingival (FCG) y movimiento dental, posterior a la aplicación de una fuerza ortodóncica controlada, para retraer caninos o primeros premolares al sitio de extracción en individuos sanos con necesidad de tratamiento ortodóncico.

**Método:** Se realizó retracción seccional (13Kpa) de un canino o primer premolar superior con mecánica deslizante en 4 individuos con tratamiento ortodóncico y exodoncias de primeros o segundos premolares, durante 60 días. En 8 tiempos se tomó el FCG y modelos en yeso. Las citocinas de FCG fueron cuantificadas por Luminex® y los modelos escaneados y analizados con el software Orthoanalyzer de 3Shape®.

**Resultados:** La expresión de las citocinas fue diferente entre ellas, fue mayor IL-1RA, seguida por IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , sin diferencias entre los grupos experimental y control ni entre mesial y distal; su mayor expresión fue en el día 7. El movimiento dental entre los grupos, fue diferente en todos los tiempos, éste fluctuó entre 0.98-1.47mm y la velocidad entre 0.015-0.022mm/día. La máxima velocidad y cantidad de movimiento se dio entre 0 y 15 días y la menor al día 21. En los días 30 y 60 la velocidad y el movimiento disminuyó gradualmente.

**Conclusiones:** La relación entre IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en FCG y la velocidad del movimiento dental, fue positiva en los días 7 y 15 y negativa para la IL-1RA. La variabilidad en los niveles de expresión de citocinas y movimiento dental entre pacientes, refleja la respuesta biológica individual.

Palabras clave: *Citocinas, movimiento ortodóncico, interleuquinas, fluido crevicular gingival, centro de resistencia, translación, velocidad de movimiento dental.*

## Introducción

La ortodoncia como especialización de la odontología, permite recuperar la salud oral restableciendo la función oclusal y mejorando la estética. El tratamiento ortodóncico se realiza principalmente moviendo los dientes por medio de la aplicación de fuerzas, lo que produce cambios locales en la vascularización, que generan una reorganización celular y extracelular, induciendo la síntesis y liberación de citoquinas en el ligamento periodontal. Las citoquinas, frecuentemente expresadas por células periodontales, en respuesta a las fuerzas tensionales intervienen en el remodelado tisular, en la diferenciación y proliferación celular; éstas han sido cuantificadas en fluido crevicular humano y se relacionan con: *IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  (1), IL-16, M-CSF y RANK ligando (2)*, neurotransmisores, factores de crecimiento, factores estimulantes de colonias, entre otras (3, 4).

Iwasaki y cols. en 2001 (5) realizaron un estudio en humanos, donde controlaron las condiciones y características de la fuerza aplicada e igualmente encontraron diferencias en la velocidad del movimiento dental entre los sujetos, atribuyéndolo a los marcadores biológicos involucrados en este proceso. No obstante, los hallazgos obtenidos sugieren que los factores individuales como el tamaño radicular, la densidad ósea, la magnitud de la fuerza aplicada, duración, continuidad o intermitencia de esta, influyen en la respuesta biológica, debido a que existe gran variabilidad en la velocidad del movimiento dental entre sujetos a los que se les aplica la misma fuerza (6). Alikhani y cols.(7), cuantificaron las citoquinas involucradas en el movimiento ortodóncico, posterior a la aplicación de una fuerza, durante un periodo de 28 días reportando un aumento de la actividad de las citoquinas.

Desde el punto de vista biomecánico, el movimiento ortodóncico esperado debería ser de traslación o de cuerpo, en una dirección, sin generar inclinación o rotación simultánea (8). Como una forma de evitar estas inclinaciones desfavorables, los clínicos tratan de cerrar los espacios de extracción con un movimiento de traslación "pura". Este movimiento se logra cuando una fuerza pasa por el centro de resistencia del diente, sin embargo, el tratamiento convencional de ortodoncia no permite que una

fuerza actúe directamente en el centro de resistencia, debido a que éste se encuentra en la raíz y las fuerzas son comúnmente aplicadas en la corona del diente donde se coloca el bracket, a una distancia, medida perpendicularmente del centro de resistencia (8). Por lo tanto, es necesario utilizar dos tipos de esfuerzos, una fuerza y un momento simultáneamente, para lograr así un sistema equivalente (9, 10). Para lograr este movimiento es necesario tener conocimiento de ciertas variables, que en esencia son desconocidas en la práctica clínica, entre ellas el tamaño y morfología radicular, la altura de la cresta alveolar, entre otros. Todos estos factores hacen difícil lograr un movimiento de traslación.

Durante la atención clínica, usualmente no se miden las variables anteriormente descritas (9, 11, 12), además de esto, las fuerzas y momentos colocados se convierten en presión en un conjunto de tejidos de distintas características viscoelásticas, no lineales y anisotrópicas (13), por lo cual al aplicar una fuerza similar a un diente de raíz corta y delgada, la fuerza transmitida por milímetro cuadrado de superficie radicular, será mayor que aquella aplicada a un diente con raíz amplia y de mayor longitud (1). Por otra parte, la aplicación de la fuerza y la frecuencia de activación de los aparatos ortodóncicos generalmente se realiza basándose en la experiencia práctica del operador, sin contemplar de manera específica los tiempos del componente biológico dental y la magnitud de la fuerza aplicada, ya que para cada persona la respuesta biológica es diferente y se debe considerar de manera individual (2). En el momento de aplicar fuerzas ortodóncicas de gran magnitud y activaciones muy frecuentes, se produce isquemia en las zonas de compresión del ligamento periodontal, induciendo una necrosis aséptica en este lugar (hialinización), cuya reparación requiere de la migración de vasos sanguíneos y células de las zonas adyacentes sanas para permitir la reparación del periodonto y el remodelado de la pared alveolar, proceso que puede tomar varias semanas y retrasar el movimiento dental (20). Estudios experimentales en animales, sugieren que el estímulo biológico se puede prolongar y producir desplazamiento del diente entre 60 y hasta 80 días después de ejercer la fuerza ortodóncica (14), mientras que estudios en humanos han empleado intervalos de

tiempo aproximadamente de 1 a 30 días (15), lo cual no permite la expresión total del componente biológico y del movimiento dental.

Por lo tanto, se evidencia la necesidad de proponer un tratamiento más ajustado a las características individuales del paciente teniendo en cuenta que, al realizar un tratamiento de ortodoncia, aplicando una fuerza en la corona dental se va a producir una inflamación en el hueso (1, 3) que se debe respetar en cuanto a tiempos de activación, permitiendo que se reduzcan los niveles de citoquinas y así reactivar las fuerzas, continuando con el tratamiento de manera eficaz.

La presente investigación permitirá realizar una aproximación inicial con un soporte científico, que permita predecir el alcance biológico del resultado de ejercer una fuerza ortodóncica; para sugerir una alternativa complementaria en el manejo de tiempos de activación de aparatos ortodóncicos y de esta manera realizar movimientos pertinentes individualizados y con menor riesgo de daño a tejidos dentales, especialmente los de soporte.

El objetivo de la presente investigación fue identificar la relación entre los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-1RA en fluido crevicular gingival y la velocidad del movimiento dental, posterior a la aplicación de una fuerza ortodóncica controlada, para retraer caninos o primeros premolares al sitio de extracción en individuos sanos con necesidad de tratamiento ortodóncico.

## **Materiales y Métodos**

La presente investigación se desarrolló bajo el diseño cuasi-experimental exploratorio con la aprobación del Comité de Investigación y Ética de la Facultad de Odontología de la Pontificia Universidad Javeriana (CIEFOUJ) mediante Aval OD-0175. La población de referencia estuvo conformada por pacientes activos de las clínicas del posgrado de Ortodoncia de la PUJ, en el periodo comprendido entre julio a diciembre del 2018. El tamaño de la muestra (n= 16) fue calculado a través del programa TAMAMU 1.1®,

teniendo en cuenta un Error Tipo I= 0.05; Error Tipo II= 0.2 y una confianza del 95%. En la primera fase del estudio se incluyeron 4 pacientes sistémicamente sanos, sin enfermedad periodontal activa (periodontitis), en edades comprendidas entre 17 y 30 años, que presentaran dentición permanente completa y cuyo plan de tratamiento contemplara la exodoncia de primeros o segundos premolares superiores con fines ortodóncicos, junto con la retracción de los caninos o primeros premolares, según el caso, a los espacios de extracción. Se indicó a los pacientes no ingerir AINES durante el tiempo del estudio. Se excluyeron del estudio pacientes que referían encontrarse en estado de gestación e historia de tabaquismo o tabaquismo activo.

Las variables sujeto de análisis se relacionaron con la expresión de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-1RA y la velocidad de movimiento dental en el tiempo, como variables de respuesta; como variable de efecto se tomó la magnitud de la fuerza aplicada y como variables intervinientes se analizaron la edad, el género, y la condición gingival. Dos co-investigadores fueron entrenados y calibrados para examinar los sujetos y determinar su elegibilidad.

Previa lectura, aceptación y firma del consentimiento informado por parte de los pacientes que cumplieron con los criterios de elegibilidad, se procedió a realizar la valoración clínica y periodontal del paciente, con tratamiento de ortodoncia en curso, donde la etapa de alineación y nivelación se encontrara finalizada junto con la realización de las exodoncias indicadas de primeros o segundos premolares superiores un mes antes de iniciar la toma de muestras. Durante este tiempo, se realizó educación en higiene oral, profilaxis y control de inflamación, junto con la determinación de indicadores de biopelícula por medio de los índices de Löe-Silness y el índice de Turesky Modificado Quigley-Hein, respectivamente, los cuales fueron verificados por un solo operador (16-18). Una vez el paciente se encontraba sin inflamación gingival, se tomaron las muestras de fluido crevicular gingival (FCG) en los intervalos de tiempo relacionados con los días 0, 1, 7, 15, 21, 30, 45 y 60. (Tabla 1).

Tabla No.1. Intervalos de tiempo

Intervalos de tiempo	Días*
T0	Día previo a la activación de la fuerza
T1	Día posterior a la aplicación de la fuerza
T2	7 días posterior a la aplicación de la fuerza
T3	15 días posterior a la aplicación de la fuerza
T4	21 días posterior a la aplicación de la fuerza
T5	30 días posterior a la aplicación de la fuerza
T6	45 días posterior a la aplicación de la fuerza
T7	60 días posterior a la aplicación de la fuerza

\*Los resultados se expresarán en unidad de tiempo-día.

### Cuantificación de citoquinas

De manera previa a la toma del Fluido Crevicular Gingival (FCG), se realizó aislamiento relativo con torundas de algodón de la zona adyacente a la toma de la muestra, se insertaron tiras de papel filtro (*Periopaper<sup>®</sup> strip*), 1mm dentro del surco gingival por 45 segundos y en intervalos de 1 minuto; se obtuvieron 4 tiras de diferentes sitios: 2 en la superficie mesial y 2 en la distal, tanto por vestibular como por palatino. Cada tira fue colocada en el *Periotron 8000* precalibrado (19), para cuantificar los volúmenes de submicrolitros de fluido gingival crevicular recolectados (20). Los valores del Periotron fueron expresados en unidades de periotron (UP), que luego se trasladaron a microlitros ( $\mu\text{L}$ ) (19, 21).

Las muestras de las superficies, mesial y distal, fueron reunidas en un pool respectivamente, en tubos plásticos refrigerados de 200 $\mu\text{L}$  (22) de PBS con inhibidores de proteasas (pH 7.3), el FCG fue eluido en agitación por 10 segundos y posteriormente se centrifugó a 2.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron congelados a -20°C hasta su uso. Se tomaron muestras de FCG en el canino o primer premolar al cual se le aplicó la fuerza, el cual se tomó como diente estudio y al diente contralateral que no se le aplicó fuerza, como control (23).

La cuantificación de las proteínas inflamatorias en fluido crevicular, se realizó mediante el kit *Milliplex Human Cytokine/Chemokine Panel 1* (Cat. MPXHCYTO -60K), el cual permitió evaluar la concentración de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, IL-1RA y TNF- $\alpha$  (24, 25). El ensayo se realizó en placas de 96 pozos, siguiendo las instrucciones del fabricante (Guía técnica *Luminex*®) (42,43). La lectura fue realizada en el equipo Magpix (Luminex Corporation, Austin, Texas, USA), en el Centro de Investigaciones Odontológicas (CIO) de la PUJ. Las muestras fueron corridas por duplicado y las concentraciones de las proteínas de interés, se determinaron de acuerdo con la curva estándar usando un algoritmo 5PL y los programas Luminex IS2.3 y xPONENT 3.1 y expresadas en pg/mL, valor ajustado al factor de dilución de cada muestra, el cual fue calculado como sigue: se obtuvo el volumen de fluido crevicular extraído mediante la extrapolación de la curva obtenida por las unidades de periotrón (UP), equivalentes a una cantidad conocida de suero humano; éstos valores fueron divididos en el volumen en el que fue diluída cada muestra. La concentración de la proteína fue determinada por el método de Bradford y las concentraciones de proteínas y citocinas, fueron multiplicadas por el factor de dilución de cada muestra, para calcular los valores totales de la citocina por fluido crevicular. Finalmente se dividió el valor total de cada citocina entre el valor de la concentración de proteínas totales, valores tomados para el análisis de resultados (pg/ml) (19).

### ***Modelo de movimiento dental y estandarización de la Fuerza Ortodónica***

Para lograr una presión lo más uniforme posible a lo largo del ligamento periodontal, la fuerza resultante que actúa sobre el diente debe dirigirse a través del centro de resistencia del diente (CR). Para calcularlo, se tomó una tomografía computarizada de rayo de cono del canino experimental, con el fin de determinar la longitud radicular del diente, medido desde el ápice radicular hasta la cresta alveolar y así encontrar el centro de resistencia, a 0.24 veces la longitud radicular, medida desde cervical a apical.

Asimismo, se calculó el área radicular con la siguiente fórmula:

$$A_r = \frac{L_r W_{CEJ}}{2} \quad (8).$$

$A_t$  corresponde al área de la superficie distal de la raíz,  $L_r$  es la longitud radicular corregida y  $W_{CEJ}$  es el ancho buco lingual del canino a nivel de la unión amelo-cementaria.

La calibración de esfuerzos se realizó en un equipo universal de ensayos (Instron®) (26, 27), para caracterizar la fuerza entregada en función de la apertura en las ansas y la longitud de sus brazos. Tomando en cuenta que el Instron® sólo mide fuerzas, fue necesario utilizar un sistema de medición adicional con el fin de determinar los momentos, para ello se empleó el sistema de medición robótica (RMS) que mide las fuerzas y los momentos iniciales que actúan sobre el canino

Las ansas utilizadas en este estudio fueron analizadas para determinar su curva de carga deflexión en fuerzas y momentos en los tres planos del espacio. Para estos fueron colocadas en un grupo de brackets como los utilizados en los pacientes del estudio. Los valores de descarga fueron obtenidos utilizando un robot articulado IRB 140 de precisión industrial marca ABB Robotics 60® (Stäubli, Bayreuth, Alemania) con seis grados de libertad y un sensor de momento de fuerza gamma FT de ATI Industrial Automation nano 12-0.12 3-D (Schunk, Lauffen / Neckar, Alemania), el cual mide fuerzas horizontales con una resolución de 0.0125 N, fuerzas verticales con 0.025N y momentos con 0.06525 Nmm (28).

El estudio buscó producir esfuerzos en el ligamento periodontal de una magnitud de 13kPa (8). Para calcular los esfuerzos, se utilizó la información de la descarga de ansas y el área de la superficie radicular del canino que se orienta hacia distal de acuerdo con  $F = \sigma A$ , donde F es la fuerza en el ansa,  $\sigma$  es el esfuerzo promedio en el ligamento y A el área radicular ya calculada. Se colocaron fuerzas de baja magnitud entre 80 y 100grF (8).

Se construyeron ansas de tres tamaños diferentes (alturas de 7, 8 y 9 mm). Dado que se quería ejercer una presión de 13 kPa, se usaron las curvas de esfuerzos en descarga para encontrar el valor más cercano que produjera una relación



momento/fuerza adecuada para que se dé el movimiento de cuerpo. Según esto, se decidió utilizar ansas de 7mm en los cuatro pacientes y se determinó la tasa de desactivación de la relación momento fuerza, la cual se determinó como 1mm de desactivación por mm de cierre del ansa, como se muestra en la Figura 1.

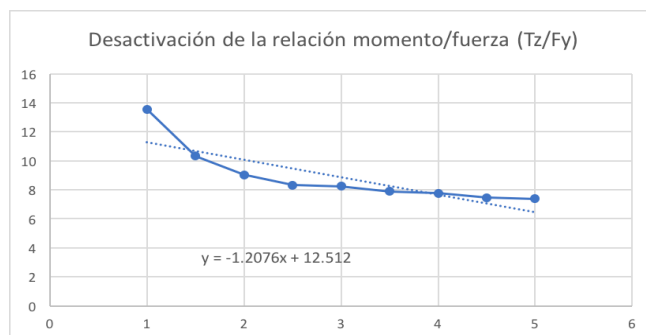


Fig. 1 Desactivación de la relación Momento/Fuerza.

El sistema de esfuerzos se diseñó para generar la retracción individual de un canino o primer bicúspide en casos que requieren extracción de primeros o segundos premolares con un anclaje máximo. El diente contralateral se tomó como control y no se ejercieron movimientos en éste, hasta finalizar el período experimental. Los aparatos utilizados fueron los siguientes: tubos dobles en primer molar, tubo sencillo en segundo molar y brackets en canino, segundo o primer premolar de dimensiones 0,018 x 0,025 pulgadas. Un arco seccional de acero inoxidable de dimensión 0,017 x 0.025 llamado segmento de estabilización, que permitió consolidar el segmento posterior como unidad de anclaje mediante el uso de una ligadura 0.010 continua en forma de 8 entre ellos. La retracción se realizó a partir de un ansa en T elaborada en una aleación de beta titanio con dimensiones 0,016 x 0,022 que se colocó entre el primer molar y el canino o primer premolar a retraer. Esta ansa se colocó abierta y centrada con dos curvas graduales en cada extremo, según lo descrito por Kuhlberg y Burstone en 1997 (29). El sistema de fuerza producido por un ansa en T segmentado consta de varios componentes: el momento alfa, el momento beta, las fuerzas horizontales y las fuerzas verticales. La fuerza para la apertura del ansa se consiguió activando ambos extremos, como se muestra en la Figura 2.

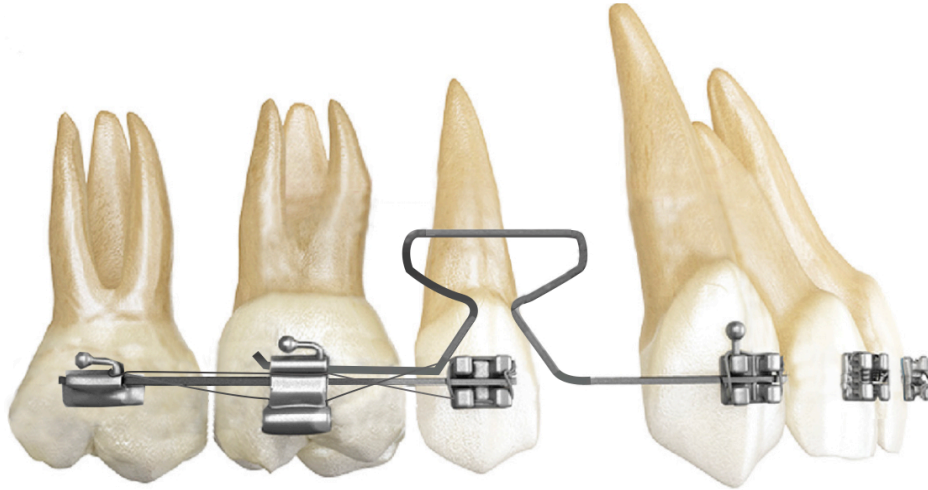


Fig. 2 Mecánica de retracción utilizada en el estudio.

### ***Medición del movimiento dental***

Una vez se activaron los aparatos en las condiciones descritas anteriormente, se tomaron impresiones en alginato de la arcada superior en los intervalos de tiempo desde el día 0 (T0) hasta el día 60 (T7), exceptuando el día 1 (T1) y se vaciaron con yeso Jade Stone tipo V de Whip Mix®. Posteriormente se escanearon los modelos con el escáner de modelos D500 3Shape®. Cada modelo se escaneó en 90 segundos, con una resolución de dos cámaras de 1.3 megapíxeles y una precisión de 10.µm según el fabricante.

Las mediciones se realizaron con el software Orthoanalyzer de 3Shape para evaluar el movimiento gingival, oclusal y cambio rotacional del canino o primer premolar. El movimiento gingival se determinó como la aproximación entre los rebordes gingivales de los dientes próximos al espacio de extracción. El movimiento oclusal se definió como la distancia entre la cúspide vestibular del canino y la cúspide vestibular del segundo premolar, en caso de extracción del primer bicúspide; o entre la cúspide vestibular del primer premolar y la cúspide mesovestibular del primer molar, en caso de extracciones de segundos premolares. El movimiento rotacional se midió a partir del ángulo entre una línea de referencia desde la segunda ruga palatina extendiéndose hasta el reborde distal del canino o primer premolar, y una línea entre este último punto

y el reborde mesial, como se muestra en la Figura 3. Por otro lado, la velocidad de movimiento dental se determinó como la cantidad de desplazamiento por día y se calculó dividiendo la cantidad de movimiento oclusal entre el número de días.

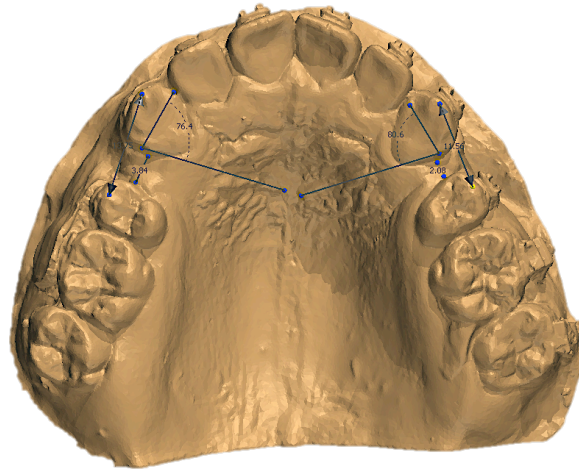


Fig. 3 Evaluación del movimiento dental 3Shape.

### **Análisis estadístico:**

El análisis de datos se realizó mediante la prueba no paramétrica exacta de Wilcoxon para correlacionar la concentración de citoquinas y el movimiento dental respecto al tiempo de observación. Se realizó un análisis preliminar de la información con el fin de descartar inconsistencias en la base de datos. Para el análisis estadístico posterior se realizó un análisis descriptivo completo tanto de los sujetos como de los dientes objeto del estudio, basado en el cálculo de frecuencias absolutas y relativas para las variables cuantitativas. Se realizó un análisis estratificado de los valores de citocinas para cada uno de los tiempos de observación y por localización con el fin de describir cada uno de estos grupos. La comparación de citocinas y movimiento dental entre los grupos experimental y control para cada uno de los tiempos se hizo por Kruskal Wallis y U Mann-Whitney. Adicionalmente se obtuvieron los coeficientes de correlación de Spearman. Todos los análisis se realizaron con el software Stata 14 SE.

## Resultados:

Se evaluaron 4 pacientes durante 8 tiempos: 0, 1, 7, 15, 21, 30, 45 y 60 días. 3 sujetos de sexo femenino (75%) y 1 sujeto de sexo masculino (25%), la edad promedio de los 4 sujetos fue de 18.5 años (DE=1.29 años), con una edad mínima de 17 años y un máximo de 20. (Tabla 2).

Tabla 2. Caracterización de los sujetos participantes en el estudio.

		n=4	
Variable		n	%
Género	Femenino	3	75%
	Masculino	1	25%
Edad <sup>(a)</sup>		18,5 (1,29)	18,5 (17-20)

<sup>(a)</sup> Edad reportada en Promedio (DE) y Mediana (Min-Máx)

Todos los pacientes mantuvieron buena higiene oral y no presentaron signos de inflamación ni acúmulo de placa bacteriana a lo largo del estudio, por lo que mantuvieron valores de Índice gingival e Índice de Placa similares a los iniciales, como se muestra en la Tabla 3. Además, los sujetos no tomaron ninguna medicación, incluyendo analgésicos. La Tabla 4 describe los eventos y tiempos del estudio.

Tabla 3. Niveles de índice gingival y de placa.

		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Índice gingival	Paciente 1	0.55	0.58	0.54	0.52	0.51	0.51	0.48	0.50
	Paciente 2	0.45	0.46	0.45	0.43	0.42	0.44	0.45	0.43
	Paciente 3	0.58	0.59	0.60	0.58	0.58	0.57	0.55	0.56
	Paciente 4	0.43	0.44	0.42	0.41	0.41	0.40	0.39	0.40
Índice de placa	Paciente 1	1.30	1.32	1.30	1.30	1.31	1.30	1.28	1.29
	Paciente 2	1.20	1.21	1.19	1.22	1.20	1.18	1.18	1.20
	Paciente 3	1.35	1.36	1.34	1.34	1.33	1.35	1.33	1.35
	Paciente 4	1.22	1.23	1.21	1.23	1.22	1.20	1.19	1.20

Tabla 4. Tabla de eventos durante el estudio clínico.

Monitoreo de HO (IG,IP)	<b>Pre-tto (Día 0)</b>	<b>Inicio de retracción del canino o primer premolar superior &gt; 1 mes</b>	<b>Día 1, 7,15,21,30,45 y 60 posterior a la retracción del canino o premolar superior</b>
Colocación y activación de ansa de retracción de canino o primer premolar superior	1 mes después de realización de la exodoncia del primer o segundo premolar superior		
Monitoreo de MDO y Toma de FCG	Pre-tto (Dia 0)	Inicio de retracción del canino o primer premolar superior > 1 mes	Día 1, 7, 15, 21, 30, 45 y 60 posterior a la retracción del canino o premolar superior
Impresiones en alginato y modelos de estudio	Pre-tto (Dia 0)	Inicio de retracción del canino o primer premolar superior > 1 mes	Día 1, 15, 21, 30, 45 y 60 posterior a la retracción del canino o premolar superior
Escaneo de Modelos 3D Shape	Pre-tto (Dia 0)	Inicio de retracción del canino o primer premolar superior > 1 mes	Día 1, 15, 21,30,45 y 60 posterior a la retracción del canino o premolar superior
*SS, acero inoxidable; HO, higiene oral; IG, índice gingival; IP, índice de biopelícula; MDO, movimiento dental ortodóncico; FCG, fluido crevicular gingival.			

Con respecto a los niveles de expresión de las citoquinas estudiadas en fluido crevicular gingival y el movimiento dental, la Tabla 5 describe las medianas y los rangos de estas para los ocho tiempos de observación por grupo control y estudio. Como se puede observar, hay una tendencia a tener valores fluctuantes de citocinas en cada uno de los tiempos que pueden ser explicados por la respuesta individual.

El movimiento dental se observa por gingival a partir del día 7, el cual incrementa en el día 15 para luego disminuir; por el contrario, hay una tendencia a aumentar el movimiento dental en oclusal desde el día 15 a lo largo del tiempo y a ser mayor que el gingival en las mediciones posteriores del experimento para el grupo estudio en comparación con el control. En cuanto los niveles de citocina, la tendencia es a aumentar al inicio de la aplicación de la fuerza para luego disminuir a lo largo del tiempo sin producirse un cambio importante entre los grupos.

Tabla 5. Caracterización de los niveles de movimiento de aproximación y mediciones de citoquinas para los tiempos del estudio.

Tiempo	Variable	Grupo Control (n=8)		Grupo Estudio (n=8)	
		Mediana	Rango	Mediana	Rango
Día 0	Movimiento de aproximación en Oclusal	0	(0 - 0)	0	(0 - 0)
	Movimiento de aproximación en Gingival	0	(0 - 0)	0	(0 - 0)
	Rotación (<A)	0	(0 - 0)	0	(0 - 0)
	IL-17 $\alpha$	5,04	(0 - 60,06)	4,61	(0 - 69,81)
	IL-1RA	38325	(19960 - 81072)	49950	(16099 - 122258)
	IL-1 $\beta$	49,79	(3,86 - 142,2)	62,15	(8,223 - 291)
	IL-6	2,23	(0 - 10,35)	5,16	(0 - 35,67)
	TNF- $\alpha$	12,42	(0 - 65,07)	21,75	(0 - 99,75)
Día 1	Movimiento de aproximación en Oclusal	0	(0 - 0)	0	(0 - 0)
	Movimiento de aproximación en Gingival	0	(0 - 0)	0	(0 - 0)
	Rotación (<A)	0	(0 - 0)	0	(0 - 0)
	IL-17 $\alpha$	3,14	(0 - 23,61)	3,11	(0 - 21,29)
	IL-1RA	32737	(9369 - 214528)	36964	(24967 - 167206)
	IL-1 $\beta$	89,22	(4,977 - 276,8)	74,82	(7,434 - 787,7)
	IL-6	1,89	(0,2439 - 14,31)	2,16	(0,7783 - 17,23)
	TNF- $\alpha$	13,63	(0 - 111,5)	13,57	(0 - 72,28)
Día 7	Movimiento de aproximación en Oclusal	0	(-0,02 - 0,02)	0	(0,12 - 0,32)
	Movimiento de aproximación en Gingival	0,01	(-0,12 - 0,03)	0,16	(0,05 - 0,58)
	Rotación (<A)	0,08	(-0,3 - 0,36)	-2,73	(-5,49 - 1,08)
	IL-17 $\alpha$	26,31	(0 - 114,3)	13,44	(1,587 - 74,19)
	IL-1RA	145988	(23787 - 494348)	64799	(33639 - 264419)
	IL-1 $\beta$	170,50	(16,75 - 330,3)	180,50	(36,8 - 785,8)
	IL-6	8,13	(0 - 18,27)	4,05	(1,861 - 7,393)
	TNF- $\alpha$	41,86	(0 - 139,4)	53,29	(7,695 - 182,3)
Día 15	Movimiento de aproximación en Oclusal	-0,01	(-0,01 - 0)	0,31	(0,19 - 0,38)
	Movimiento de aproximación en Gingival	-0,01	(-0,04 - 0,02)	0,20	(0,07 - 0,39)
	Rotación (<A)	0,10	(-0,36 - 0,27)	0,41	(-1,68 - 1,81)
	IL-17 $\alpha$	3,18	(0 - 12,39)	1,11	(0 - 33,89)
	IL-1RA	47081	(26879 - 874615)	50295	(10207 - 155753)
	IL-1 $\beta$	41,68	(7,361 - 815,3)	85,58	(4,891 - 195,9)
	IL-6	1,39	(0,7028 - 100,3)	2,01	(0,3231 - 19,55)
	TNF- $\alpha$	16,61	(2,894 - 1231)	9,60	(0 - 104,3)
Día 21	Movimiento de aproximación en Oclusal	-0,01	(-0,13 - 0,03)	0,11	(-0,02 - 0,12)
	Movimiento de aproximación en Gingival	-0,02	(-0,03 - 0,02)	0,06	(-0,05 - 0,1)
	Rotación (<A)	0,11	(-0,28 - 0,43)	1,45	(0,37 - 2,06)
	IL-17 $\alpha$	0	(0 - 88,24)	5	(0 - 33,07)

	IL-1RA	92439	(909,4 - 406071)	35878	(12163 - 116020)
	IL-1 $\beta$	39,27	(2,656 - 458,7)	32,43	(11,77 - 285,7)
	IL-6	4,38	(0 - 14,92)	2,20	(0,3923 - 12,67)
	TNF- $\alpha$	36,13	(0 - 1147)	11,51	(0 - 116,5)
<b>Día 30</b>	Movimiento de aproximación en Oclusal	0,04	(-0,05 - 0,07)	0,15	(0,07 - 0,44)
	Movimiento de aproximación en Gingival	0,02	(-0,02 - 0,03)	0,16	(0,07 - 0,34)
	Rotación (<A)	-0,03	(-0,38 - -0,01)	0,19	(-0,26 - 2,23)
	IL-17 $\alpha$	6,98	(0 - 44,63)	1,75	(0 - 32,99)
	IL-1RA	41621,00	(9226 - 105278)	45754,00	(13581 - 196034)
	IL-1 $\beta$	16,09	(4,187 - 1077)	32,92	(7,747 - 358)
	IL-6	0,48	(0,2701 - 87,52)	4,63	(0,3702 - 72,18)
	TNF- $\alpha$	1,12	(0 - 333,3)	13,61	(0 - 339,4)
<b>Día 45</b>	Movimiento de aproximación en Oclusal	-0,03	(-0,07 - 0,01)	0,20	(0,13 - 0,31)
	Movimiento de aproximación en Gingival	0	(-0,03 - 0,02)	0	(-0,06 - 0,15)
	Rotación (<A)	0,03	(-0,35 - 0,36)	1,00	(0,22 - 2,39)
	IL-17 $\alpha$	2,76	(0 - 4,032)	8,64	(0 - 14,08)
	IL-1RA	23615	(10888 - 116020)	41495	(24214 - 79510)
	IL-1 $\beta$	29,43	(5,303 - 140)	32,76	(14,18 - 906,6)
	IL-6	2,39	(0,1581 - 8,486)	2,32	(1,769 - 65,53)
	TNF- $\alpha$	30,18	(0 - 73,74)	28,74	(10,37 - 193,7)
<b>Día 60</b>	Movimiento de aproximación en Oclusal	0,06	(0,01 - 0,15)	0,15	(0,02 - 0,19)
	Movimiento de aproximación en Gingival	-0,01	(-0,02 - 0,27)	0,06	(-0,05 - 0,27)
	Rotación (<A)	0,13	(-0,52 - 0,43)	0,27	(0,02 - 2,48)
	IL-17 $\alpha$	6,18	(0 - 51,56)	1,93	(0 - 91,99)
	IL-1RA	70648,00	(9043 - 264419)	75736,00	(6704 - 406071)
	IL-1 $\beta$	95,72	(7,385 - 1309)	46,67	(3,563 - 241,4)
	IL-6	5,21	(0,4309 - 28,47)	2,74	(0 - 12,61)
	TNF- $\alpha$	49,23	(0 - 465,5)	21,83	(4,591 - 443,8)
<b>Total</b>	IL-17 $\alpha$	4,24	(0 - 114,3)	3,85	(0 - 91,99)
	IL-1RA	45273	(909,4 - 874615)	51629	(6704 - 406071)
	IL-1 $\beta$	48,28	(2,656 - 1309)	67,31	(3,563 - 906,6)
	IL-6	2,35	(0 - 100,3)	2,58	(0 - 72,18)
	TNF- $\alpha$	21,29	(0 - 1231)	21,32	(0 - 443,8)

### ***Expresión de citoquinas en fluido crevicular***

En general la expresión de las citocinas fue diferente entre ellas ( $p=0,0001$ ), la citocina que se observó en mayor concentración fue la IL-1RA ( $p<0,0001$ ), seguida por la IL-1 $\beta$  y la TNF- $\alpha$ , éstas últimas expresadas de manera similar; mientras que los niveles de

IL-17A e IL-6 fueron de concentraciones bajas (Figura 4). No hubo diferencias entre los grupos experimental y control ni entre el lado mesial y distal, tampoco entre la expresión de todas las citocinas evaluadas IL-17A, IL1RA, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en los tiempos (0-7) posterior a la aplicación de la fuerza ortodónica con el fin de retraer el canino al sitio de extracción.

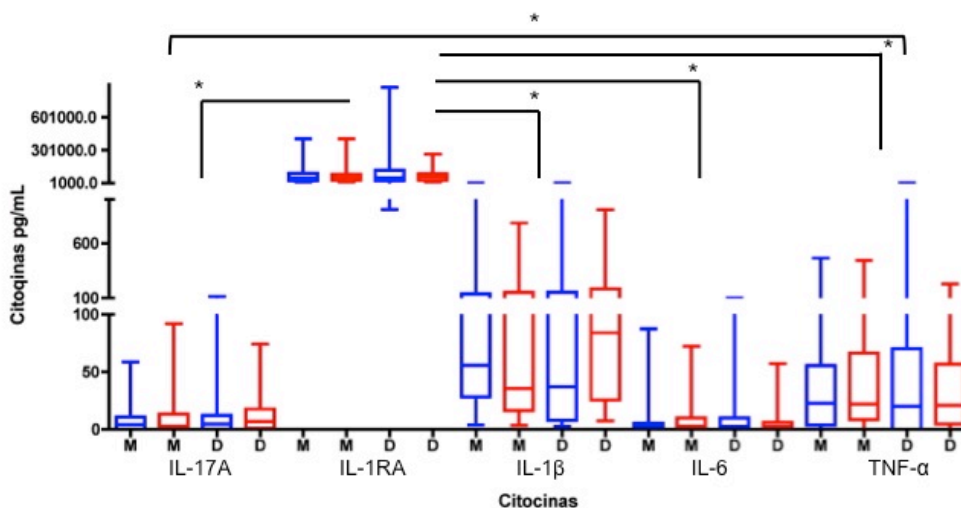


Fig. 4. Expresión de citocinas en fluido crevicular.

En la Figura 4 se muestran los niveles de citocinas de IL-17A, IL-1RA, IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en pg/mL, de muestras de fluido crevicular gingival de sujetos sometidos a una activación de canino o premolar al sitio de extracción en 8 tiempos. Se presentan los resultados del diente experimental (cajas rojas) y el diente control (cajas azules). (n=4 individuos) M: mesial, D: Distal. \*p<0,05.

Con fines de evaluar el comportamiento de los niveles de expresión de las citocinas por mesial y distal de los dientes control y estudio en los períodos de tiempo del experimento en los cuatro pacientes, se muestran las siguientes figuras 5 a, b, c, d y e.



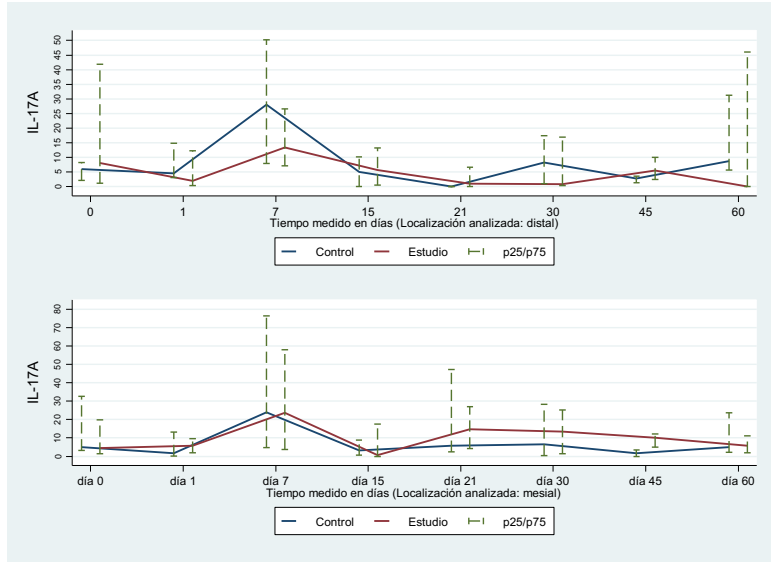


Fig. 5a. Niveles de expresión de IL-17A en mesial y distal a lo largo del tiempo de medición posterior a la activación.

En la Figura 5a se representa en cada punto de análisis la mediana y la desviación estándar entre los grupos: diente experimental (líneas rojas) y diente control (líneas azules) en cada uno de los tiempos evaluados.

En cuanto la IL-17A (Fig. 5a) se observó que tanto para el diente control como el estudio por distal, hay un pico en su expresión en el día 7, este fue menor en el grupo estudio que el control y luego disminuye sus valores en ambos grupos, sin embargo, hay gran variabilidad en los datos tanto para el día 0 y 60 para el diente estudio por distal, en el cual los niveles de esta citocina disminuyen en el día 30 y 60 a 0 pg/mL más que en el grupo control. Si se evalúa por mesial, se observó un comportamiento más uniforme y similar para el diente control y estudio, con variabilidad en sus datos para el día 7. Esta citocina parece ser más incrementada en mesial en el diente experimental.

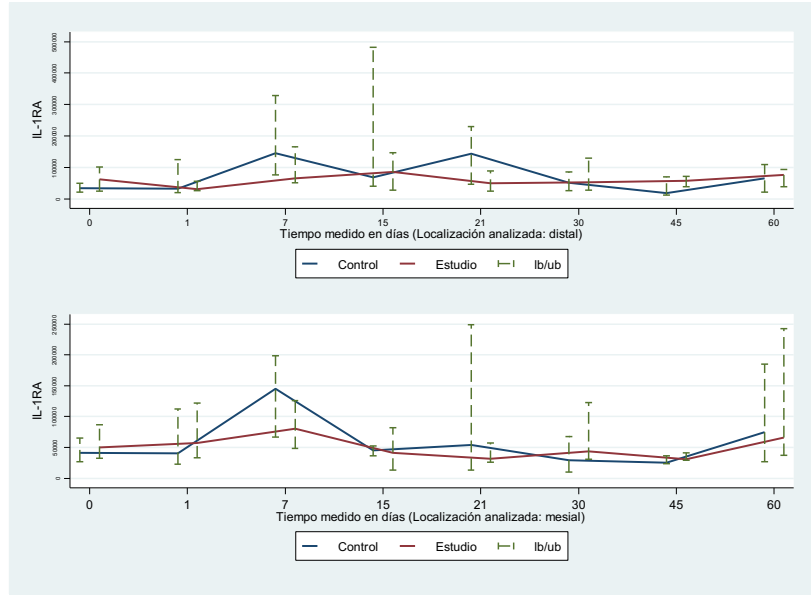


Fig. 5b. Niveles de expresión de IL-1RA en mesial y distal a lo largo del tiempo de medición posterior a la activación.

En la Figura 5b se representa en cada punto de análisis la mediana y la desviación estándar entre los grupos: diente experimental (líneas rojas) y diente control (líneas azules) en cada uno de los tiempos evaluados.

La IL1-RA (Fig. 5b) los datos se comportaron dispersos tanto en mesial como en distal entre los tiempos y sus niveles fueron muy similares en mesial y distal para el diente experimental. El diente estudio presentó valores más bajos que el diente control especialmente en el día 7 y 21. En el diente estudio por distal, se puede observar un leve incremento en el nivel de expresión en el día 15, luego disminuye levemente para el día 21 y mantiene valores similares hasta el día 60 con un nivel más alto que el basal. Por mesial, alcanza su mayor expresión en el día 7 para luego disminuir en el día 15 y 21 y mantener valores similares durante el estudio hasta el tiempo 45, para nuevamente incrementar sus niveles en el tiempo 60 con valores similares al día 7 y mayores que el basal. Es una citocina altamente expresada desde sus niveles basales (T0), que en ningún tiempo evaluado se negativizó, pero baja posterior a la fuerza ortodóncica.

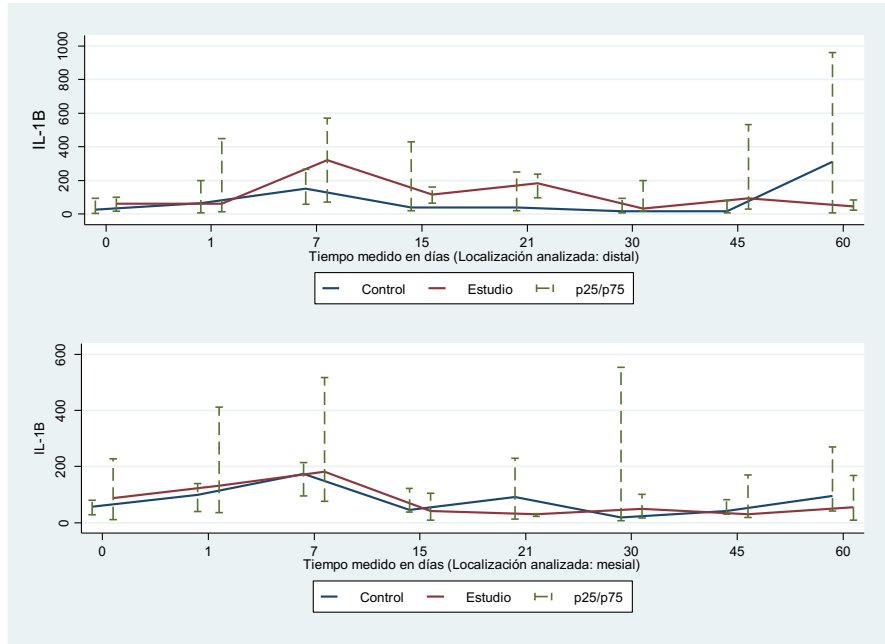


Fig. 5c. Niveles de expresión de IL-1 $\beta$  en mesial y distal a lo largo del tiempo de medición posterior a la activación.

En la Figura 5c se representa en cada punto de análisis la mediana y la desviación estándar entre los grupos: diente experimental (líneas rojas) y diente control (líneas azules) en cada uno de los tiempos evaluados.

Con respecto a la IL-1 $\beta$  (Fig. 5c), en el diente estudio, por mesial y distal, alcanza su pico en el día 7, para disminuir en el día 15; pero en el día 21, en el lado mesial se observa un comportamiento inverso. En este grupo, los cambios más notorios fueron en distal mostrando niveles de expresión mayores que el control en los tiempos 7, 15 y 21, sin embargo, ambos grupos mostraron comportamientos similares entre los primeros tiempos, exceptuando para el día 60, tiempo en el que se incrementó el nivel de la citocina en el diente control y disminuyó en el diente estudio a 0. Existe gran variabilidad en el día 1, 7, 45 y 60 para el diente estudio.

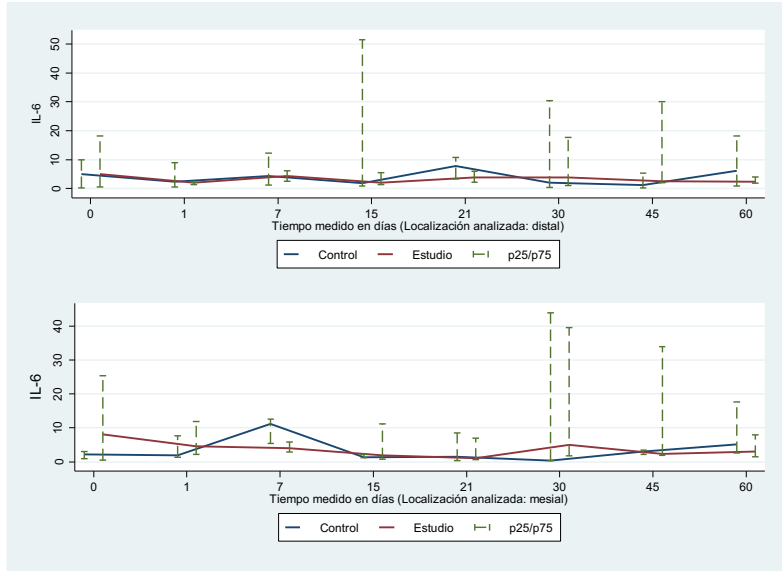


Fig. 5d. Niveles de expresión de IL-6 en mesial y distal a lo largo del tiempo de medición posterior a la activación.

En la Figura 5d se representa en cada punto de análisis la mediana y la desviación estándar entre los grupos: diente experimental (líneas rojas) y diente control (líneas azules) en cada uno de los tiempos evaluados.

La IL-6 (Fig.5d), tiene un comportamiento más uniforme entre el diente control y estudio su expresión es baja y estable en el tiempo, sin embargo muestra gran variabilidad en sus mediciones en los día 15, 30 y 45. En el diente estudio aumenta sus niveles para el día 30 tanto por mesial como distal. Es la única citocina incrementada a nivel basal por mesial en el grupo experimental y después de la activación en el tiempo 60 se pierde, por el contrario hasta este tiempo, el diente control mantiene niveles bajos de esta citocina con un pico en el tiempo 7 por mesial y 21 por distal.

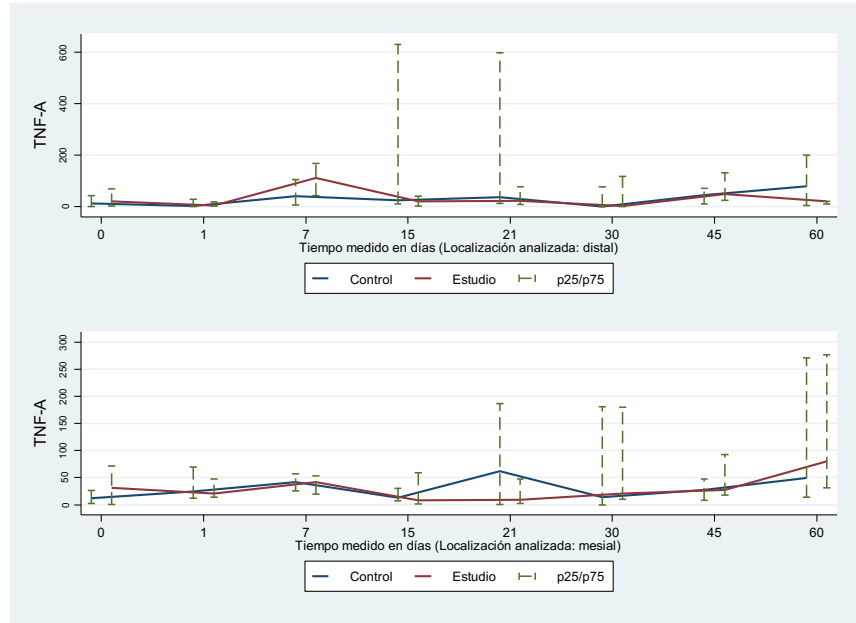


Fig. 5e. Niveles de expresión de TNF $\alpha$  en mesial y distal a lo largo del tiempo de medición posterior a la activación.

En la figura 5e se representa en cada punto de análisis la mediana y la desviación estándar entre los grupos: diente experimental (líneas rojas) y diente control (líneas azules) en cada uno de los tiempos evaluados.

Para los valores de TNF- $\alpha$  (Fig.5e) se observa que tanto para el diente control como el estudio por distal los valores son similares en la mayoría de los tiempos, sin embargo hay variabilidad para el día 15 y 21. En el diente estudio, alcanza su mayor expresión en el día 7 especialmente por distal. Para el día 60, por distal disminuye y por mesial aumenta, a un nivel más alto que en los tiempos anteriores. Llama la atención el incremento de esta citocina en el diente control en los tiempos 21 y 60 por mesial y 60 por distal.

En resumen, se pudo observar que hubo variabilidad en todas las citoquinas durante las observaciones para cada uno de los tiempos, el día 7 posterior a la activación, es el tiempo de mayor expresión de la mayoría de las citoquinas estudiadas, posteriormente la expresión de cada una fluctúa hasta descender por debajo de sus niveles basales en el tiempo 60, excepto para IL-17A, TNF- $\alpha$  e IL-6 por mesial en el diente control y de la

IL-1RA por mesial y distal en el diente experimental y control y de TNF- $\alpha$  por mesial en el diente experimental, citoquina altamente expresada en todos los tiempos y con un pico alto en el tiempo 60 días por mesial mayor que el basal.

### ***Movimiento dental***

El movimiento dental después de la aplicación de la fuerza ortodóncica controlada, fue evaluado como la aproximación dental en oclusal, en gingival y como la rotación del canino o primer bicúspide superior, según el caso. Los errores de medición en dobles determinaciones según el método de Dahlberg (30) encontrados fueron de 0.0029 mm para la aproximación oclusal, de 0.0068 mm para la gingival y de 0.6617° para la rotación.

En la Figuras 6, 7 y 8 se muestra la cantidad de movimiento dental en milímetros (mm) y grados (°) en el tiempo, después de hacer una fuerza ortodóncica. Los números representan el tiempo de valoración de la medición por días: 1: de 0 a 7, 2: de 7 a 15, 3: De 15 a 21, 4: De 21 a 30, 5: 30-45 y 6: de 45 a 60 días. Las cajas azules representan los valores del diente control y las cajas rojas del diente experimental. \*  $p < 0,05$  (n=4).

Al comparar por la prueba U de Mann-Whitney el movimiento dental en oclusal entre los grupos control y estudio posterior a la aplicación de una fuerza, se encontraron diferencias significativas en todos los tiempos (T): T1 ( $p=0,0286$ ), T2 ( $p=0,0209$ ), T3 ( $p=0.0194$ ), T4 ( $p=0,0286$ ), T5 ( $p=0.0294$ ) y T6 ( $p=0.0209$ ) (Figura 6).

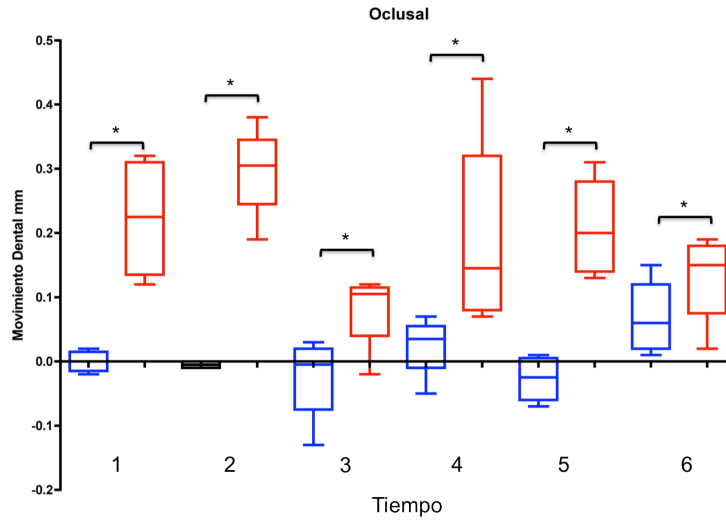


Fig. 6. Movimiento dental en oclusal posterior a la aplicación de una fuerza.

En cuanto el movimiento dental en gingival entre los grupos control y estudio posterior a la aplicación de una fuerza, se encontraron diferencias significativas en el tiempo 2 con un valor de  $p=0.0209$ , en el tiempo 3 con un valor de  $p=0.0209$  y en el tiempo 5 con un valor de  $p=0.0209$  (Figura 7).

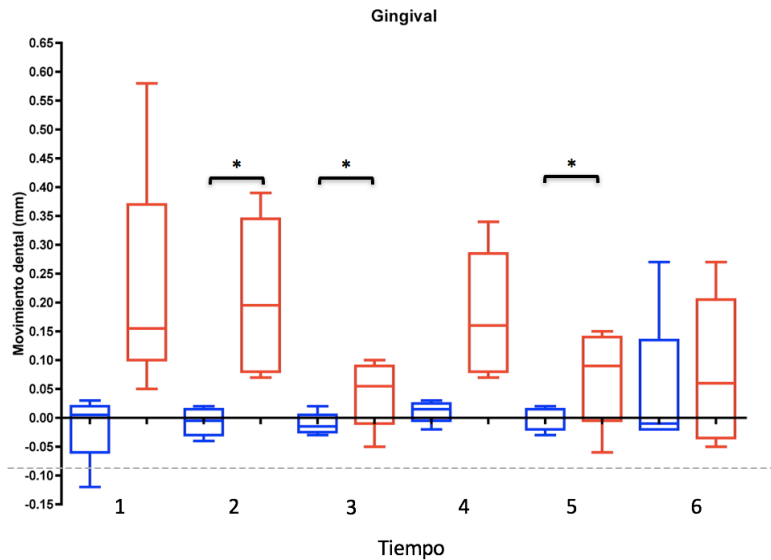


Fig. 7. Movimiento dental en gingival posterior a la aplicación de una fuerza.

Por otro lado, en el movimiento rotacional entre los grupos control y estudio posterior a la aplicación de una fuerza, se encontraron diferencias significativas en el tiempo 4 con un valor de  $p=0.0433$  y en el tiempo 6 con un valor de  $p=0.0433$  (Figura 8).

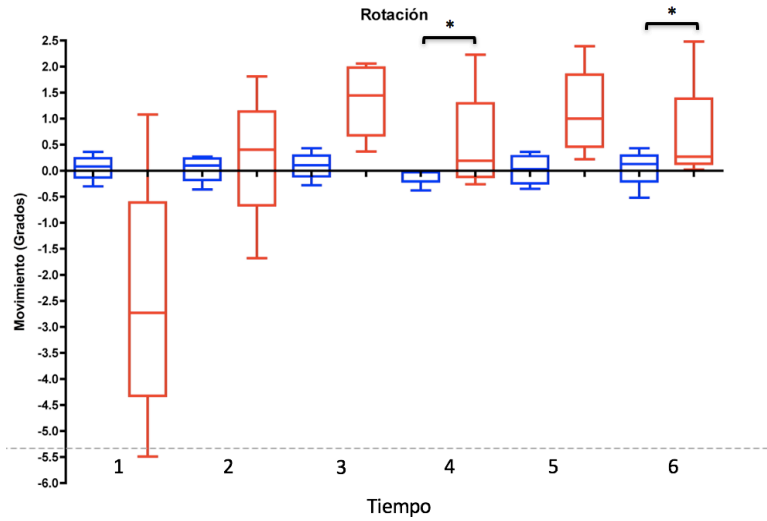


Fig. 8. Movimiento dental en rotación posterior a la aplicación de una fuerza.

La Figura 9 muestra distancias de aproximación oclusal y gingival del lado experimental de cada paciente durante todo el tiempo del estudio. La diferencia entre ambas fluctuó entre 0.26 mm y 0.57 mm y, consistentemente la aproximación fue mayor en oclusal que en gingival, mostrando una ligera tendencia a la inclinación coronal.

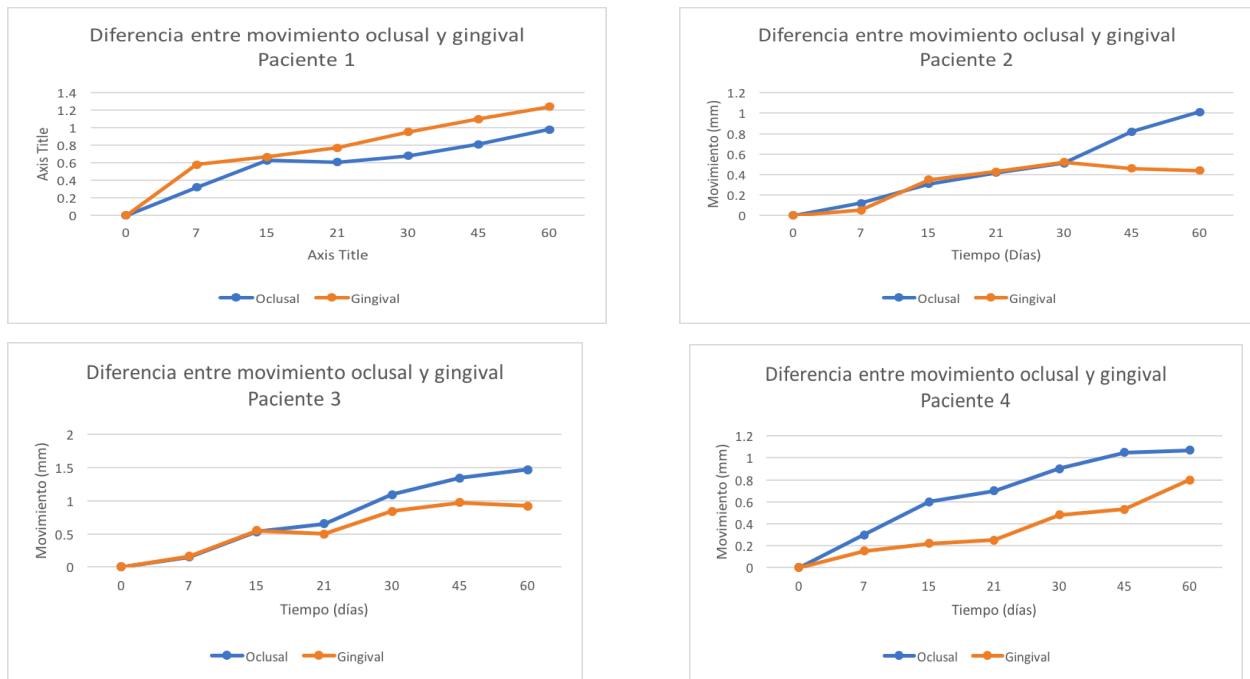


Fig. 9. Distancia de aproximación oclusal y gingival del lado experimental de cada paciente durante todo el tiempo del estudio.



La Figura 10 muestra los valores encontrados para el movimiento de rotación. En promedio durante la fase experimental hasta el día 7 se presentó una rotación, que se corrigió entre los días 7 y 15, para luego mantenerse relativamente constante hasta el día 60. El rango de rotación durante el estudio fue de  $-0.06^\circ$  y  $0.59^\circ$ , siendo los valores negativos un movimiento hacia mesopalatino o distovestibular y los valores positivos mesovestibular o distopalatino.

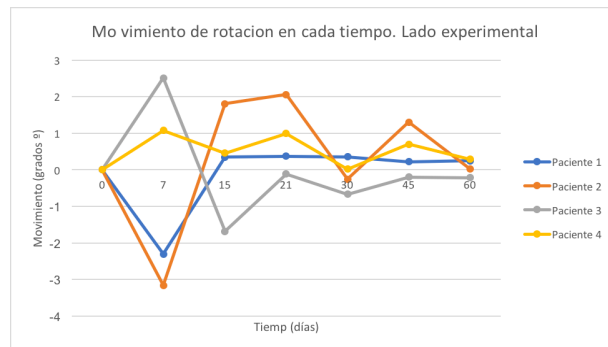


Fig. 10. Movimiento de rotación observado en cada paciente en el tiempo posterior a una activación ortodóncica.

La Figura 11 muestra el movimiento dental acumulado medido a nivel oclusal de todos los pacientes durante el período total del estudio. Se observó que, para los 60 días, el movimiento fluctuó entre 0.98mm y 1.47mm. La tendencia general fue, hasta día 15, de un incremento constante de la cantidad de movimiento, seguido de un período entre los días 15 y 21 con poco incremento del mismo. A partir de este punto, el movimiento incrementó nuevamente.

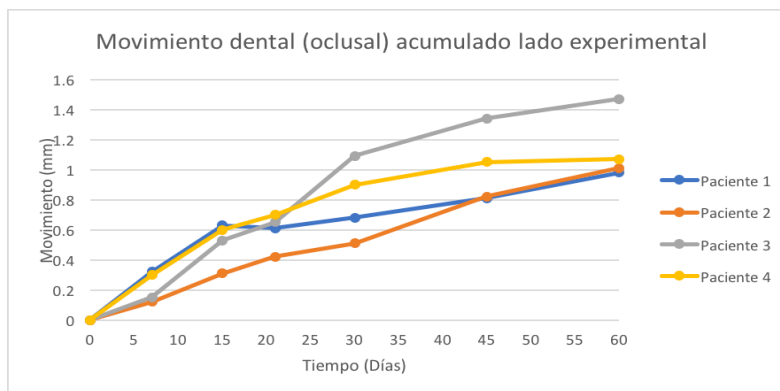


Fig. 11. Movimiento dental oclusal acumulado durante el periodo total del estudio.

Adicionalmente el movimiento oclusal se midió como su magnitud entre tiempos de observación. La Figura 12 muestra el promedio para los 4 pacientes. Inicialmente hasta el día 15, ocurrió gran cantidad de movimiento, el cual se redujo en un 74% entre el día 15 y el día 21, posteriormente aumentó de nuevo en una proporción menor al movimiento inicial. Este movimiento mostró tendencia a conservarse hasta el día 45, a partir del cual disminuyó hasta el final del experimento.

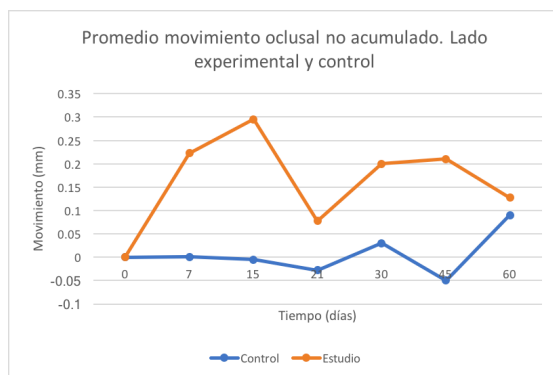


Fig. 12. Movimiento dental no acumulado durante el periodo total del estudio en el lado control y experimental.

### ***Velocidad del movimiento dental***

La velocidad del movimiento dental en los cuatro pacientes, como se observa en la Figura 13, fueron muy similares entre los pacientes. En el paciente 1 fue de 0.016 mm/día, 0.015 mm/día en paciente 2, 0.027mm/día en paciente 3 y 0.022 mm/ día en el paciente 4.

La velocidad de movimiento dental durante todo el período experimental fluctuó entre 0.015 mm/día y 0.022 mm/día en los cuatro pacientes. En los pacientes 1, 3 y 4, la máxima velocidad de movimiento estuvo en el día 7, mientras que en el paciente 2 esto ocurrió en el día 15. En todos los pacientes se observa una velocidad aumentada hasta el día 15, seguido por un marcado descenso entre el día de la máxima velocidad y el día 21, después del cual hay un incremento hasta el día 30 para finalmente disminuir en tres de los cuatro pacientes, como se observa en la Figura 14.

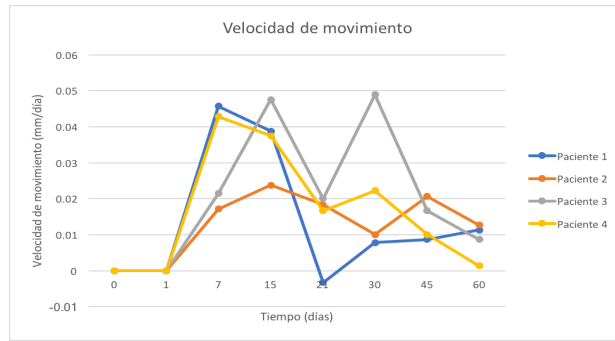


Fig. 13. Velocidad del movimiento dental posterior a una activación ortodóncica en el tiempo de 4 pacientes.

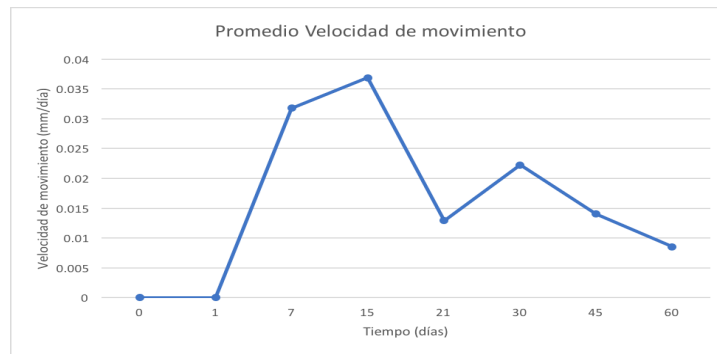


Fig.14. Velocidad del movimiento dental promedio posterior a una activación ortodóncica en el tiempo

En la Figura 15 se representan las medianas de las velocidades por días para las unidades evaluadas, se observa una mayor velocidad de movimiento dental en tiempos tempranos.

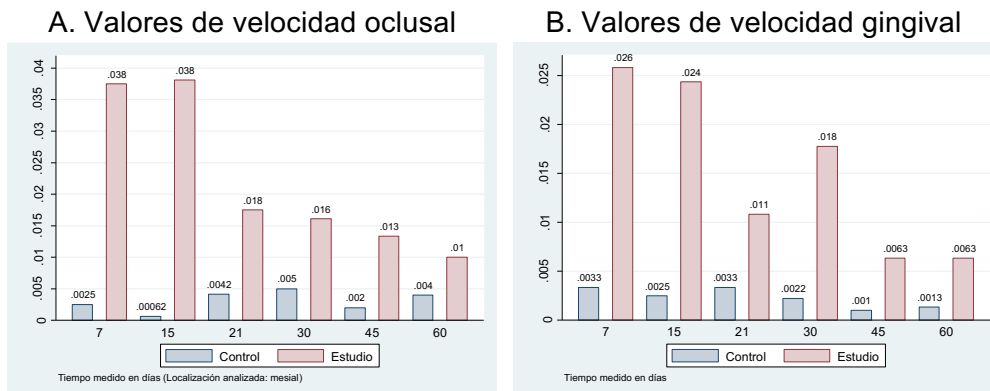


Fig. 15. Velocidad del movimiento oclusal (A) y gingival (B). Se representan las medianas obtenidas en el diente control y experimental.

Como una forma de ver la relación entre el movimiento previo y posterior, se construyó la información que se presenta en la figura 16. En ésta se evidenció que, para las condiciones del estudio, la asociación entre observación durante un período dado y el movimiento posterior es de moderada a baja. Aun así, la tendencia general fue de una muy pequeña disminución del movimiento en la medida que aumentó el tiempo de observación del experimento.

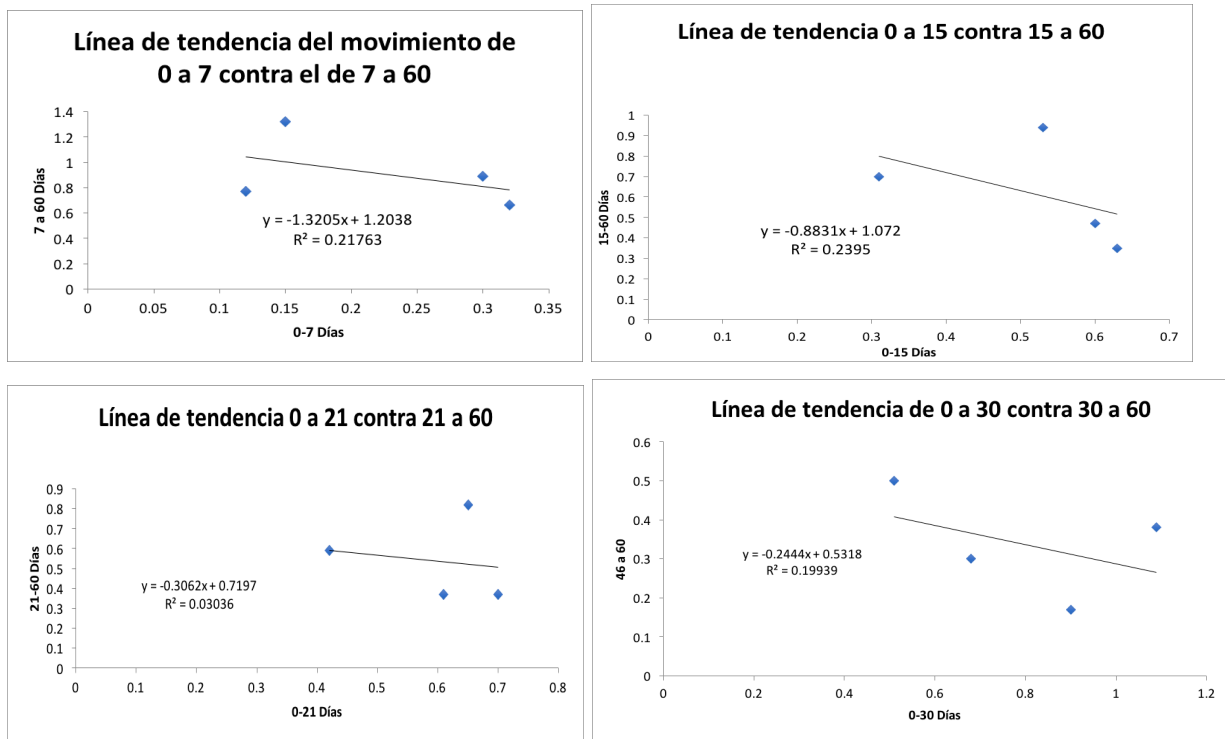
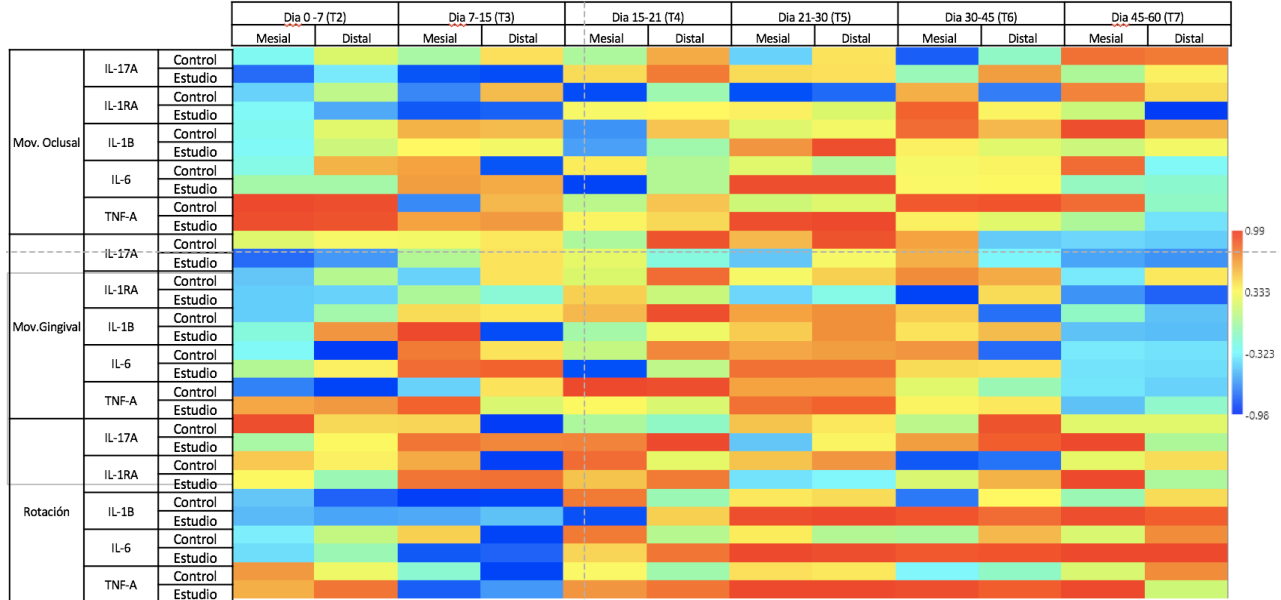


Fig. 16. Relación entre el movimiento previo y posterior.

***Correlación entre los niveles de citocinas, la magnitud y velocidad del movimiento dental en el tiempo, posterior a una fuerza ortodóncica***

Con fines de evaluar la posible correlación entre la magnitud de los movimientos registrados en las unidades dentales experimentales de los sujetos del estudio, la velocidad de su movimiento con los niveles de citoquinas reportados en el tiempo, se calcularon los correspondientes coeficientes de correlación de Spearman, acompañado del intervalo de confianza. Los resultados se observan en las Tablas 6 y 7 respectivamente.

Tabla 6. Correlación entre el movimiento dental, los niveles de citoquinas en las unidades dentales experimentales de los sujetos de estudio en cada uno de los tiempos



Al analizar la correlación en cuanto el nivel de citoquinas y el movimiento dental para cada uno de los tiempos en el diente estudio (Tabla 6), a continuación se describe por citoquina los hallazgos:

Para IL-17A se observó una correlación positiva (recuadros rojos fuertes) por distal en T4 en el movimiento oclusal (baja la citoquina y no hay movimiento oclusal significativo); y para el movimiento de rotación en T4 (baja el nivel de citoquina y baja el movimiento de rotación) y T6 (sube el nivel de la citoquina y sube el movimiento de rotación) por distal y por mesial en T7 (baja el nivel de citoquina y baja el movimiento de rotación). No se encontró correlación positiva de esta citoquina con el movimiento gingival.

Por el contrario, se encontró una correlación negativa (recuadros azules fuertes) en T2 por mesial y T3 en mesial y distal con el movimiento oclusal y en T2 por mesial con el movimiento gingival (alto nivel de citoquina y muy bajo movimiento).

De lo anterior se puede decir que IL-17A participa en el movimiento de rotación a los 45 días posteriores a la activación y que sus niveles incrementados en tiempos tempranos no se correlacionan con ningún tipo de movimiento dental.

Para la IL-1RA, se observó una correlación positiva de la presencia de la citocina en el movimiento de rotación por distal en el T3, T4 y por mesial para el T3 y T7; para el movimiento oclusal solo en mesial de T6. No hay correlación positiva de IL-1RA para el movimiento gingival.

Se observa una correlación negativa fuerte con el movimiento oclusal por mesial y distal en T3, y distal de T7, con el movimiento gingival en mesial de T6 y distal de T7, No hubo correlación negativa con el movimiento de rotación.

Para IL-1 $\beta$ , se encontró una correlación positiva con el movimiento oclusal en distal de T5, en el movimiento gingival en mesial de T3 y con el movimiento de rotación T5 para y rotación en mesial y distal en los tiempos T5, T6 y T7.

Las correlaciones negativas fueron pocas, con el movimiento gingival en distal de T3, con el movimiento de rotación en mesial de T4 y sin correlación negativa fuerte en el movimiento oclusal.

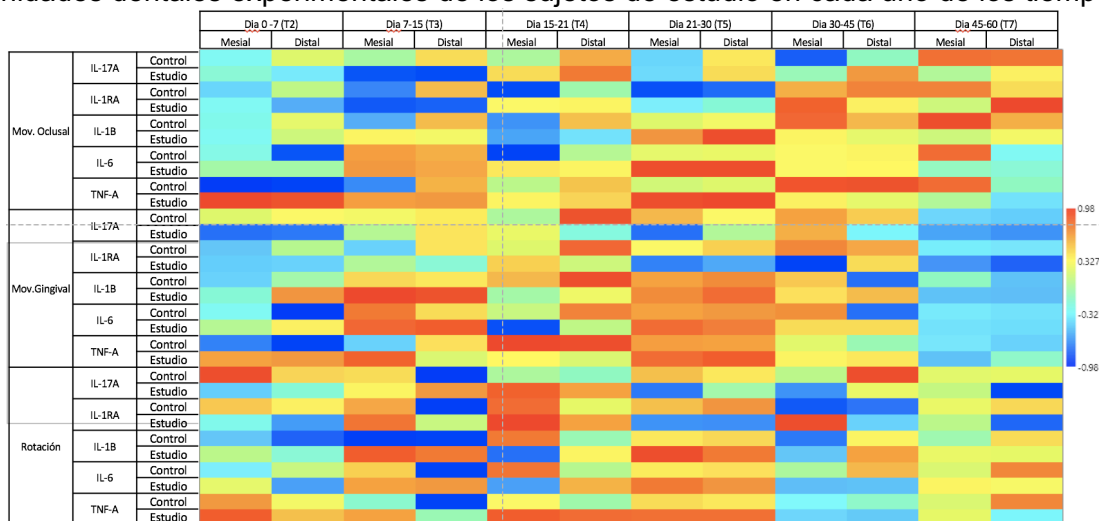
Para IL-6 se encontró una correlación positiva con el movimiento oclusal en mesial y distal en T5, para el movimiento gingival en,mesial y distal de T3 y T5 y con el movimiento de rotación en mesial y distal de T5, T6, T7. Se encontró una correlación negativa con el movimiento oclusal, gingival y de rotación en mesial de T4

Para TNF- $\alpha$ , hubo una correlación positiva para el movimiento oclusal en mesial y distal de T2 y T5, con el movimiento gingival en mesial de T3 y mesial y distal de T5 y con el movimiento de rotación en distal de T2, en mesial y distal de T5 y T6 y mesial en T7. No se observó correlación negativa de la presencia de la citocina con ningún tipo de movimiento dental.

De manera general se puede decir, que para el movimiento oclusal la citocina con la que presenta mayor correlación es la TNF- $\alpha$  y en tiempos tempranos, para el

movimiento gingival la citocina con la que presenta mayor correlación es la IL-1 $\beta$  en el T3 y para el movimiento de rotación se observó una correlación fuerte con las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en tiempos tardíos.

Tabla 7. Correlación entre la velocidad del movimiento dental, los niveles de citoquinas en las unidades dentales experimentales de los sujetos de estudio en cada uno de los tiempos



Por otro lado, al analizar la correlación en cuanto el nivel de citoquinas y la velocidad de movimiento dental para cada uno de los tiempos en el diente estudio (Tabla 7), se observó una correlación positiva en la velocidad del movimiento oclusal en distal de T4 y con la velocidad del movimiento de rotación en mesial de T4. No hubo correlación positiva de la IL-17A con la velocidad del movimiento gingival. Se encontró correlación negativa con la velocidad del movimiento oclusal por mesial y distal en T3, con la velocidad del movimiento gingival en mesial de T5 y con la velocidad del movimiento de rotación en distal de T7.

Para la IL-1RA, se observó una correlación positiva con la velocidad del movimiento oclusal por mesial en T6 y por distal en T7, con la velocidad del movimiento de rotación en mesial en T3, T4 y T6 y no se observó correlación positiva de ésta citocina con la velocidad del movimiento gingival. Se encontró, una correlación negativa fuerte en mesial y distal de T3 con la velocidad del movimiento oclusal, en mesial de T6 con la velocidad del movimiento gingival y por distal de T7 en la velocidad del movimiento de rotación.

Para IL-1 $\beta$ , se encontró una correlación positiva con la velocidad del movimiento oclusal en distal en T5, con la velocidad del movimiento gingival en mesial y distal de T3 y con la velocidad del movimiento de rotación en mesial y distal de T3 y T5. Así mismo, se observó una correlación negativa en mesial del T4 con la velocidad del movimiento de rotación.

Para IL-6 se encontró una correlación positiva con la velocidad del movimiento oclusal por mesial y distal en T5, con la velocidad del movimiento gingival en T3 y mesial de T5. Y no se observó correlación positiva con la velocidad del movimiento de rotación ni correlación negativa en la velocidad de cualquier movimiento dental.

Para TNF- $\alpha$ , hubo una correlación positiva fuerte por mesial y distal en el T2 y T5 con la velocidad del movimiento oclusal, por mesial del T3 y mesial y distal del T5 con la velocidad del movimiento gingival y en mesial del T2, por mesial y distal del T4 y T5 en la velocidad del movimiento de rotación. No se observaron correlaciones fuertes negativas para esta citocina.

En cuanto la velocidad del movimiento oclusal, gingival y de rotación, no hay una citocina particular que se correlacione directamente con su efecto en el tiempo.

## **Discusión**

En el presente estudio, se investigaron 5 citocinas, en fluido crevicular gingival luego de la aplicación de una fuerza ortodóncica en relación con el tiempo de tratamiento y el tipo de estrés ejercido sobre el periodonto, tanto en el lado de tensión como de compresión.

Las exodoncias pueden acelerar la velocidad del movimiento dental y aumentar significativamente la actividad de los biomarcadores de inflamación y alterar los resultados, por lo que las extracciones se realizaron 1 mes antes de comenzar la retracción. Así mismo se conoce que numerosas variables tales como la edad, género,



estado periodontal, enfermedades sistémicas y medicamentos pueden afectar el movimiento dental. Para disminuir la influencia de estos factores se aceptaron pacientes que cumplieran con los criterios de inclusión, así como el control periódico del estado gingival e higiene oral, para enfocarse en mediadores asociados a la inflamación por el movimiento dental (7, 31).

La recolección de fluido crevicular gingival, es un método no invasivo y se ha utilizado ampliamente para el análisis del movimiento dental humano, el cual permite la detección de diferentes citocinas (32, 33). La cuantificación de citocinas se realizó a partir de una medida simultánea y discriminativa de diferentes citocinas en una sola muestra, utilizando el kit de una prueba de inmunoensayos multiplex (Luminex®). Las técnicas previamente utilizadas para la cuantificación de citocinas, como ELISA, requieren mayor tiempo de laboratorio y requieren mayor volumen de muestra. Se ha comprobado que la técnica utilizada en este estudio, tiene múltiples ventajas sobre las demás, como beneficios costo efectivos al procesar múltiples citocinas simultáneamente, uso de un 80% menos de volumen de muestra, disminución de insumos de laboratorio, entre otros (34)

Los marcadores inflamatorios seleccionados para el análisis de este estudio fueron IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17 $\alpha$ , IL-1RA, basándose en su rol de inflamación y asociación con el movimiento dental ortodóncico.

Si bien, no se observaron diferencias significativas entre los sitios mesial y distal y entre los dientes del grupo experimental y de control, los niveles de la mayoría de las citocinas fueron más altos en los sitios del diente estudio en comparación con los sitios del diente control, después de la aplicación de la fuerza.

La IL-1 $\beta$  y la TNF- $\alpha$  son citoquinas pro-inflamatorias que están implicadas durante las etapas iniciales del movimiento dental ortodóncico, debido a sus efectos directos sobre la reabsorción ósea alveolar y la respuesta aguda de inflamación. Durante el estudio, se aumentaron sus niveles desde el día 1 hasta el día 7, disminuyendo sus valores

desde el día 15 al 60, llegando a obtener valores iguales o menores al día 0. En la literatura se reporta que estos biomarcadores tienen su mayor expresión a las 24 horas después de la aplicación de la fuerza (7, 14, 32, 33, 35-38). Iwasaki y cols. en el 2001, encontraron diferencias en la concentración de IL-1 $\beta$  dependiendo del sitio de recolección de la muestra, ya sea mesial o distal, en donde los niveles en distal fueron mayores que los del mesial (5, 39). Sin embargo, en este estudio al comparar los niveles de IL-1 $\beta$  entre mesial (tensión) y distal (compresión) presentaron comportamientos similares, donde se encontraron mayores expresiones en el lado de compresión en los días 7, 15 y 21. Esta diferencia en los resultados entre los lados mesial y distal con los estudios previamente mencionados que utilizaron el mismo esfuerzo de 13Kpa como en la presente investigación, se puede explicar porque generalmente se discrimina el lado de tensión del de compresión como entidades anatómicamente independientes. Sin embargo, autores como Kappor y cols. en el 2014 y Dudic y cols. en el 2006, reportaron que en el lado de compresión y tensión se encuentra niveles altos de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  (35, 38). Por lo tanto, se entiende que los mediadores recolectados del fluido crevicular gingival en mesial o distal no son indicativos de la actividad de la zona de compresión o tensión, debido a que, en ambos lados del diente, existen microzonas de tensión y compresión para llevar a cabo la remodelación ósea necesaria para el movimiento dental ortodóncico (25, 35, 40, 41). Esto puede explicar las similitudes entre los lados de tensión y compresión en los niveles de la expresión de las citocinas en este estudio.

La IL-6, es considerada como una citocina pro-inflamatoria potencializada por la IL-1 $\beta$  y la TNF- $\alpha$  (14, 42). Sin embargo, Bruunsgaard y cols en el 2001, describieron su carácter anti-inflamatorio al promover la liberación de los receptores antagonistas de estas citocinas (43). Se ha encontrado que sus niveles aumentan a las 24 horas después de la aplicación de una fuerza continua (31, 44). En este estudio, la IL-6 se expresa con valores disminuidos y estables en el tiempo con leves aumentos en sus niveles en los días 7 y 30, lo que sugiere que puede estar involucrada con la etapa temprana de remodelación ósea y una segunda curva de expresión, como muestran los resultados del Alhashimi y cols en el 2001 (42). No obstante no es claro si la IL-6 tiene

un papel anti-inflamatorio o pro-inflamatorio durante el movimiento dental porque en este estudio no se observó un aumento o disminución significativo de sus valores durante todos los tiempos de medición, coincidiendo con los resultados de Ren y cols en el 2007 (14).

La IL-17A, también conocida como IL-17, induce la osteoclastogénesis y ha sido reportada en condiciones autoinmunes, sin embargo, no es ampliamente reconocida en el movimiento dental ortodóncico. Hayashi y cols en el 2012 reportaron que la IL-17A y su receptor fueron detectados en el ligamento periodontal durante el movimiento dental, y que estimula la producción de IL-6 en los fibroblastos del ligamento periodontal (45). En el presente estudio se encontró su pico máximo de expresión en el día 7, coincidiendo con el pico de movimiento dental. Asimismo, Frieder y cols. en el 2018 describen que los niveles de esta citocina aumenta por la acción de otros mediadores inflamatorios, particularmente la TNF- $\alpha$  (46). Esto concuerda con los resultados de este estudio, ambas citocinas aumentaron en los días 7 y 45, simultáneamente, lo que sugiere su papel altamente relacionado con el aumento del movimiento dental ortodóncico.

Con respecto a la IL-1RA o receptor antagonista de la IL-1, es la responsable de controlar los efectos de la IL-1 $\beta$ , por lo que tiene un rol anti-inflamatorio que lleva a una disminución del movimiento dental ortodóncico (47). Iwasaki y cols. en el 2009 (15) y Kappor y cols. en el 2014 (35) han reportado que valores altos de IL-1RA se asocia con una disminución en la velocidad del movimiento dental, corroborándolo con los resultados del presente estudio, cuando aumentan los niveles de esta citocina, el movimiento dental disminuye en el día 15 (5, 39, 48). Asimismo, los autores anteriormente mencionados, han reportado que para que se dé un movimiento dental predecible es necesario un control de la reabsorción ósea por medio del balance entre la actividad de la citocina IL-1 $\beta$  y su receptor antagonista IL-1RA. En la presente investigación no fue posible determinar el Índice de actividad, debido a que los altos niveles de IL-1RA inhibirían la acción de la IL-1 $\beta$ , al comparar con los resultados de

Iwasaki y cols. en el 2001 (5), sin embargo se pudo apreciar una velocidad de movimiento dental comparable con estudios previos (35).

En cuanto a la **medición del movimiento dental**, su error de medición fue de 0.0029 mm, según el método de Dahlberg (30), el cual se considera bajo comparado con el que se obtiene tradicionalmente, tomando medidas a partir de modelos de yeso. Se ha demostrado que los modelos digitales tienen una fiel reproductibilidad de las características dentales con un alto grado de precisión, con respecto a las medidas tomadas de modelos de yeso (49, 50). Asimismo se decidió utilizar el scanner de laboratorio 3shape D500 porque al comparar la precisión de éste con el escáner intraoral, la evidencia sugiere que las condiciones intraorales como la saliva y espacio limitado, puede disminuir la precisión de la imagen (51).

El diseño de la mecánica ortodóncica buscó realizar un movimiento de traslación, es decir un movimiento por igual de la corona y raíz del diente, buscando que la fuerza pase por el centro de resistencia (8). Para ello se caracterizaron ansas en T de 7mm, 8 mm y 9 mm en alambres de titanio molibdeno. Adicionalmente usando tomografías de haz de cono se determinó la distancia al centro de resistencia asumiendo que este se encontraba a 0,24% de la longitud radicular (8, 52). Con esta información se activaron las ansas para lograr las relaciones momento fuerza adecuadas, las cuales se mantuvieron relativamente constantes durante todo estudio, experimentando una tasa de desactivación de 1mm por mm de cierre del ansa. Se puede deducir que el movimiento fue de traslación ya que la relación momento/fuerza se mantuvo. Las mediciones finales muestran que la inclinación fue relativamente pequeña por lo que el método se consideró confiable.

Este estudio comparó los efectos de aplicar un esfuerzo de 13 kPa para poder retraer un canino o premolar superior al sitio de extracción y demostrar la relación entre la cantidad y velocidad de movimiento dental con los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-1RA. Este nivel de esfuerzo se pudo transmitir a través de una fuerza menor a 100grF, y resultó en un movimiento dental con incremento inicial que disminuyó entre

los días 15 y 21 para volver a aumentar después del día 21. Estas fases de movimiento fueron descritas inicialmente por Pilon (53) y Reitan (54). Estudios previos (8, 39) han demostrado que esfuerzos de 4, 13 y 21Kpa y fuerzas de bajas magnitudes (menores a 100grF), genera un movimiento constante, y que fuerzas mayores a 100grF generaron un movimiento con una fase de latencia de duración de hasta 21 días antes que ocurra movimiento dental. En este estudio, en el que utilizamos fuerzas de baja magnitud, se pudo observar que el movimiento dental fue constante, sin embargo, se observó una disminución en la cantidad y velocidad de movimiento dental de 6 días, entre los tiempos de medición 15 y 21.

En cuanto a la cantidad total de movimiento oclusal, Iwasaki y cols en el 2006 (48) reportaron un movimiento distal de 4.14mm en 84 días con un esfuerzo de 13kPa. Igualmente, Alikhani y cols. en el 2018 (7) determinaron un total de movimiento de 1.10mm en 56 días. Es importante indicar, que los estudios previamente mencionados, utilizaron una fuerza constante con activación permanente, mientras que la mecánica del presente estudio consistió en un ansa en T con una sola activación al inicio del estudio, teniendo en cuenta que presenta una tasa de desactivación de 46grF por cada mm y de 323grFmm por cada mm. Esta tasa de desactivación fue mucho menor que la reportada por Kuhlberg y Burstone (29). El movimiento dental total del presente estudio fue de 1.13mm durante 60 días, similar al de estudios que presentaban mecánicas parecidas (7).

Por otro lado, la velocidad de movimiento reportada en este estudio fluctuó entre 0.015mm/día y 0.022 mm/día en los cuatro pacientes, este hallazgo fue similar al de Iwasaki y cols en el 2005 (48), el cual fue de 0.024mm/día en la retracción de caninos y para Iwasaki y cols en el 2006 de 0.054mm/día (35, 39), teniendo en cuenta que en los estudios anteriormente mencionados, se esperaría una mayor velocidad dado que utilizaron fuerzas constantes, mientras que en este estudio se utilizó una fuerza que se activó al principio del experimento e iba disminuyendo a medida que se iba desactivando el ansa. Esto se puede explicar con base a la biología de movimiento dental, porque hubo expresión de la IL-1 $\beta$ , TNF-  $\alpha$ , IL-6, IL-17 generando una

remodelación ósea para que sea posible el movimiento dental ortodóncico. Autores como Iwasaki y cols. en el 2001 y 2005 (5, 39) soportan que hay variación en la velocidad del movimiento dental debido a las diferencias de los niveles de mediadores de inflamación en cada sujeto, por lo que la variabilidad individual es determinante en el movimiento dental ortodóncico y la expresión de los niveles de citocinas (15, 35, 48).

Con respecto a los cambios rotacionales o angulares, se ha definido que la retracción seccional de los caninos no evita la rotación e inclinación del diente y en varios estudios se diseñaron mecánicas para rotar en vez de mover el diente de traslación. Sin embargo en otros estudios previos (8) con mecánicas similares a la presente investigación, encontraron que las mecánicas seccionales con fuerzas controladas y de baja magnitud, logran un movimiento de traslación, con una rotación leve de 2°. En este estudio se encontró que, en todos los pacientes, inicialmente se presentó una rotación de los dientes retraídos, la cual fue corrigiendo hasta finalizar el estudio. Esta rotación coincide con el período en el cual el movimiento dental es mayor y su corrección se asocia con la disminución en la tasa de movimiento dental. Con esto se puede observar que los hallazgos de este estudio fueron similares a los encontrados con Iwasaki y cols. en el 2006 (48), al lograr un movimiento de traslación con mínimo movimiento rotacional.

Un hallazgo importante, en la presente investigación, se relacionó con la presencia de movimiento dental y expresión de las citocinas hasta el día 60 después de la aplicación de la fuerza. Si bien este movimiento es menor que en los días iniciales, al igual que las expresiones de los biomarcadores, supone actividad celular y de remodelado óseo activo 2 meses después de la activación de la mecánica. Esto sugiere que se deben respetar los tiempos biológicos de los tejidos de soporte del diente para realizar activaciones no tan frecuentes como se realizan en la actualidad en la práctica clínica, y de esta manera llevar a cabo tratamientos más personalizado y eficientes.

Se recomienda que en la segunda etapa de este estudio es importante incluir mayor número de pacientes con el fin de obtener resultados representativos, investigar con

otros rangos de esfuerzos, diferentes citocinas asociados a movimiento dental y estudiar a mayor detalle la etapa de disminución de movimiento dental entre los días 15 y 21 para determinar la presencia o ausencia de la fase de latencia.

## **Conclusiones**

1. La relación entre los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en fluido crevicular gingival y la velocidad del movimiento dental, después de la aplicación de una fuerza ortodóncica de retracción, fue positiva en los días 7 y 15 y negativa para la IL-1RA.
2. Se encontró movimiento dental y expresión de las citocinas hasta el día 60 después de la aplicación de la fuerza, en menor magnitud que en días iniciales.
3. La mayor expresión de los niveles de IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17A, IL-1RA en fluido crevicular gingival fue al día 7 (T3) después de la aplicación de una fuerza ortodóncica.
4. La variabilidad en los niveles de expresión de citocinas entre pacientes refleja la respuesta biológica individual, determinando las diferencias en la cantidad y velocidad de movimiento.
5. Se logró el movimiento constante de un canino o primer premolar en cuerpo con poca rotación e inclinación, con un sistema de retracción caracterizado por relación momento/fuerza relativamente estable, fuerzas de baja magnitud (menores a 100grF) y nivel de esfuerzo deseado de 13kPa en el ligamento periodontal.
6. La máxima velocidad y cantidad de movimiento se da entre los días 0 y 15 y la menor al día 21. En los días 30 y 60 la velocidad y el movimiento va gradualmente disminuyendo.

## **Agradecimientos**

Se hace extensivo el agradecimiento a IECO S.A por la colaboración en el escaneo de modelos para efectuar las mediciones de movimiento dental y a la Vicerrectoría de Investigación por el apoyo financiero para la ejecución del proyecto.

## Bibliografía

1. Krishnan V, Davidovitch Z. Cellular, molecular, and tissue-level reactions to orthodontic force. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 2006;129(4):469 e1-32.
2. Tobón D, Aristizabal D, Álvarez C, Urrea J. Cambios radiculares en pacientes tratados ortodondicamente. *CES Odontología*. 2015;27(2):37-46.
3. Stashenko P, Obernesser M, Dewhirst F. Effect of immune cytokines on bone. *Immunological investigations*. 1989;18(1-4):239-49.
4. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*. 2003;31(1):32-42.
5. Iwasaki L, Haack J, Nickel J, Reinhardt R, Petro T. Human interleukin-1 $\beta$  and interleukin-1 receptor antagonist secretion and velocity of tooth movement. *Archives of Oral Biology*. 2001;46(2):185-9.
6. Iwasaki LR, Crouch LD, Tutor A, Gibson S, Hukmani N, Marx DB, et al. Tooth movement and cytokines in gingival crevicular fluid and whole blood in growing and adult subjects. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2005;128(4):483-91.
7. Alikhani M, Chou MY, Khoo E, Alansari S, Kwal R, Elfersi T, et al. Age-dependent biologic response to orthodontic forces. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2018;153(5):632-44.
8. Iwasaki LR, Haack JE, Nickel JC, Morton J. Human tooth movement in response to continuous stress of low magnitude. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2000;117(2):175-83.
9. Smith RJ, Burstone CJ. Mechanics of tooth movement. *American journal of orthodontics*. 1984;85(4):294-307.
10. Burstone CJ. The biomechanics of tooth movement. *Vistas in orthodontics*. 1962:197-213.
11. Sandy JR, Farndale RW, Meikle MC. Recent advances in understanding mechanically induced bone remodeling and their relevance to orthodontic theory and practice. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics : official publication of the American Association of Orthodontists, its constituent societies, and the American Board of Orthodontics*. 1993;103(3):212-22.
12. Louw J, Smith B, McDonald F, Palmer R. The management of developmentally absent maxillary lateral incisors—a survey of orthodontists in the UK. *British dental journal*. 2007;203(11):E25-E.
13. Taber LA, Humphrey JD. Stress-modulated growth, residual stress, and vascular heterogeneity. *Journal of biomechanical engineering*. 2001;123(6):528-35.
14. Ren Y, Hazemeijer H, de Haan B, Qu N, de Vos P. Cytokine profiles in crevicular fluid during orthodontic tooth movement of short and long durations. *Journal of periodontology*. 2007;78(3):453-8.



15. Iwasaki L, Chandler J, Marx D, Pandey J, Nickel J. IL-1 gene polymorphisms, secretion in gingival crevicular fluid, and speed of human orthodontic tooth movement. *Orthodontics & craniofacial research*. 2009;12(2):129-40.
16. Löe H. The gingival index, the plaque index and the retention index systems. *Journal of periodontology*. 1967;38(6 Part II):610-6.
17. Silness J, Löe H. Periodontal disease in pregnancy: Iii. Response to local treatment. *Acta odontologica scandinavica*. 1966;24(6):747-59.
18. Turesky S, Gilmore ND, Glickman I. Reduced plaque formation by the chloromethyl analogue of vitamin C. *Journal of periodontology*. 1970;41(1):41-3.
19. Chapple I, Landini G, Griffiths G, Patel N, Ward R. Calibration of the Periotron 8000® and 6000® by polynomial regression. *Journal of Periodontal Research*. 1999;34(2):79-86.
20. Ciantar M, Caruana D. Periotron 8000: calibration characteristics and reliability. *Journal of periodontal research*. 1998;33(3):259-64.
21. Medina ME, Sierra LI, Cano N, Henao C, Velilla P, Patiño PJ. Presencia de Interleuquina 8 en fluido crevicular de pacientes con periodontitis agresiva. *Revista Facultad de Odontología Universidad de Antioquia*. 2009;16(1 y 2).
22. Griffiths GS. Formation, collection and significance of gingival crevice fluid. *Periodontology 2000*. 2003;31:32-42.
23. Obregón Miano FA, Garrido M, Dezerega A, Hernández Ríos M. Actividad de metaloproteinasa de matriz extracelular-9 en fluido crevicular gingival durante la respuesta reparativa en periodontitis apical asintomática. *Revista clínica de periodoncia, implantología y rehabilitación oral*. 2015;8(1):54-9.
24. Matos Lima J. Preventive effects of fatty acids and phytochemicals in ApcMin/+ mouse, a model of colorectal cancer: University of East Anglia; 2010.
25. Grant M, Wilson J, Rock P, Chapple I. Induction of cytokines, MMP9, TIMPs, RANKL and OPG during orthodontic tooth movement. *European journal of orthodontics*. 2012;35(5):644-51.
26. Meling T, Ødegaard J, Holthe K, Meling EØ, Segner D. A formula for the displacement of an arch wire when subjected to a second-order couple. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 1998;113(6):632-40.
27. Johnson E. Relative stiffness of beta titanium archwires. *The Angle Orthodontist*. 2003;73(3):259-69.
28. Fuck L-M, Drescher D. Force systems in the initial phase of orthodontic treatment—a comparison of different leveling archwires. *Journal of Orofacial Orthopedics/Fortschritte der Kieferorthopädie*. 2006;67(1):6-18.
29. Kuhlberg AJ, Burstone CJ. T-loop position and anchorage control. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 1997;112(1):12-8.
30. Dahlberg G. SURGERY OF THE HAND Surgery of the Hand, ed. By, RM Handfield-Jones. MC.
31. Alikhani M, Raptis M, Zoldan B, Sangsuwon C, Lee YB, Alyami B, et al. Effect of microosteoperforations on the rate of tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2013;144(5):639-48.
32. Uematsu S, Mogi M, Deguchi T. Interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-6, tumor necrosis factor- $\alpha$ , epidermal growth factor, and  $\beta$ 2-microglobulin levels are elevated in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *Journal of Dental Research*. 1996;75(1):562-7.

33. Grieve WG, Johnson GK, Moore RN, Reinhardt RA, DuBois LM. Prostaglandin E (PGE) and interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) levels in gingival crevicular fluid during human orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 1994;105(4):369-74.
34. Ray CA, Bowsher RR, Smith WC, Devanarayan V, Willey MB, Brandt JT, et al. Development, validation, and implementation of a multiplex immunoassay for the simultaneous determination of five cytokines in human serum. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2005;36(5):1037-44.
35. Kapoor P, Kharbanda OP, Monga N, Miglani R, Kapila S. Effect of orthodontic forces on cytokine and receptor levels in gingival crevicular fluid: a systematic review. *Progress in orthodontics*. 2014;15(1):65.
36. Luppapornlarp S, Kajii TS, Surarit R, Iida J. Interleukin-1 $\beta$  levels, pain intensity, and tooth movement using two different magnitudes of continuous orthodontic force. *The European Journal of Orthodontics*. 2010;32(5):596-601.
37. Lee K-J, Park Y-C, Yu H-S, Choi S-H, Yoo Y-J. Effects of continuous and interrupted orthodontic force on interleukin-1 $\beta$  and prostaglandin E 2 production in gingival crevicular fluid. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2004;125(2):168-77.
38. Dudic A, Kiliaridis S, Mombelli A, Giannopoulou C. Composition changes in gingival crevicular fluid during orthodontic tooth movement: comparisons between tension and compression sides. *European Journal of Oral Sciences*. 2006;114(5):416-22.
39. Iwasaki LR, Crouch LD, Tutor A, Gibson S, Hukmani N, Marx DB, et al. Tooth movement and cytokines in gingival crevicular fluid and whole blood in growing and adult subjects. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2005;128(4):483-91.
40. Tuncer BB, Özmeriç N, Tuncer C, Teoman İ, Çakılcı B, Yücel A, et al. Levels of interleukin-8 during tooth movement. *The Angle orthodontist*. 2005;75(4):631-6.
41. d'Apuzzo F, Cappabianca S, Ciavarella D, Monsurrò A, Silvestrini-Biavati A, Perillo L. Biomarkers of periodontal tissue remodeling during orthodontic tooth movement in mice and men: overview and clinical relevance. *The Scientific World Journal*. 2013;2013.
42. Alhashimi N, Frithiof L, Brudvik P, Bakhiet M. Orthodontic tooth movement and de novo synthesis of proinflammatory cytokines. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2001;119(3):307-12.
43. Bruunsgaard H, Pedersen M, Pedersen BK. Aging and proinflammatory cytokines. *Current opinion in hematology*. 2001;8(3):131-6.
44. Ren Y, Maltha JC, Van' t Hof MA, Von den Hoff JW, Kuijpers-Jagtman AM, Zhang D. Cytokine levels in crevicular fluid are less responsive to orthodontic force in adults than in juveniles. *Journal of clinical periodontology*. 2002;29(8):757-62.
45. 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 diseases*. 2012;18(4):375-88.
46. Frieder J, Kivelevitch D, Menter A. Secukinumab: a review of the anti-IL-17A biologic for the treatment of psoriasis. *Therapeutic advances in chronic disease*. 2018;2040622317738910.
47. Di Domenico M, D'apuzzo F, Feola A, Cito L, Monsurrò A, Pierantoni G, et al. Cytokines and VEGF induction in orthodontic movement in animal models. *BioMed Research International*. 2012;2012.

48. Iwasaki LR, Gibson CS, Crouch LD, Marx DB, Pandey JP, Nickel JC. Speed of tooth movement is related to stress and IL-1 gene polymorphisms. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 2006;130(6):698. e1-. e9.
49. Rossini G, Parrini S, Castroflorio T, Deregibus A, Debernardi CL. Diagnostic accuracy and measurement sensitivity of digital models for orthodontic purposes: a systematic review. *American journal of orthodontics and dentofacial orthopedics*. 2016;149(2):161-70.
50. Fleming P, Marinho V, Johal A. Orthodontic measurements on digital study models compared with plaster models: a systematic review. *Orthodontics & craniofacial research*. 2011;14(1):1-16.
51. Shafiei I, Bahrami M, Nokar S. Dimensional accuracy of intraoral and laboratory scanners: A literature review. *BIOSCIENCE BIOTECHNOLOGY RESEARCH COMMUNICATIONS*. 2017;10(4):790-6.
52. Tanne K, Koenig HA, Burstone CJ. Moment to force ratios and the center of rotation. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 1988;94(5):426-31.
53. Pilon JJ, Kuijpers-Jagtman AM, Maltha JC. Magnitude of orthodontic forces and rate of bodily tooth movement. An experimental study. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 1996;110(1):16-23.
54. K R. Effects of force magnitude and direction of tooth movement on different alveolar bone types. *Angle Orthod*. 1964;34:244-55.