

T
1187

 XOCHIMILCO SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124221

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO E IZTAPALA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

EFFECTOS DE LA DEFORMACION MECÁNICA EN
OSTEOBLASTOS MURINOS CULTIVADOS *IN VITRO*.

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

SALVADOR GARCÍA LÓPEZ

COMITÉ TUTORIAL

DR. RAFAEL BOJALIL PARRA
DR. LUIS FELIPE MONTAÑO
DRA. VELIA A. RAMÍREZ A.

México D.F.

Junio del 2006

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACYT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-200-93.

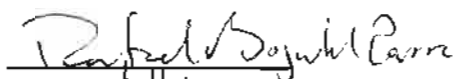
El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud de las
Unidades Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

Salvador García López

El día 14 de Junio del 2006

Jurado:

Tutor: Dr. Rafael Bojalil Parra



Asesor: Dr. Luis F. Montaña



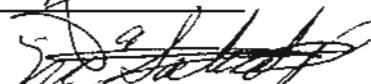
Asesora: Dra. Velia A. Ramírez A.



Sinodal: Dr. Jaime A. Bustos



Sinodal: Dra. María Salud Pérez Gutiérrez



Miembro de la Comisión del Doctorado en Ciencias Biológicas

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Coordinadora del Doctorado en Ciencias Biológicas

Universidad Autónoma Metropolitana

Dra. María Salud Pérez Gutiérrez

Resumen

El esqueleto se remodela continuamente por un proceso coordinado por las células del osteoblasto. La remodelación ósea implica una red compleja de señalamientos de célula-célula que involucra hormonas sistémicas, citocinas producidas localmente, factores del crecimiento y por la influencia mecánica que se ejerce en las células. En este estudio, reportamos los efectos de la deformación mecánica en la síntesis de la IL-6, IL-10, IL-12, y TNF- α en osteoblastos murinos cultivados *in vitro*. Los osteoblastos murinos fueron cultivados en el medio de F12 DMEM, suplementado con suero fetal de becerro al 10% y antibióticos. Los cultivos se mantuvieron a 37°C., en una atmósfera humedecida de 5% de CO₂ y 95% de aire. Los cultivos de 10 cajas petriperm se sometieron a la deformación mecánica durante 6 segundos por cada 1.5 minutos de 0 a 96 horas. El sobrenadante de cada muestra fue recolectado tanto del grupo experimental (n=10) como del grupo control (n=10) durante las 2, 8, 16, 24, 48, 72 y 96 horas y almacenado a -70°C. La concentración de las citocinas fue determinada por inmuno ensayo (ELISA). Los resultados demostraron que los osteoblastos sometidos al proceso de deformación mecánica alteraron la síntesis de la IL-6, IL-10, IL-12 y el TNF- α comparados con su grupo control. Se determinó que durante las primeras 24 horas de deformación hubo sobre producción de TNF- α , seguida de una sobre producción de IL-6 posterior a las 24 horas, ambas citocinas contribuyen a la actividad osteoclástica en la inducción de la resorción ósea. La IL-12 demostró un incremento durante las primeras 24 horas, lo cual podría controlar el proceso de resorción ósea. Sin embargo la IL-10 demostró una reducción significativa durante las primeras 24 horas, lo que contribuye a un retardo en la calcificación de la matriz ósea permitiendo eventos fisiológicos de la remodelación ósea. Por lo tanto, se puede concluir que la deformación mecánica en osteoblastos murinos cultivados *in vitro*, regula la producción de IL-6, IL-10, IL-12 y el TNF- α . Estas citocinas a su vez, tienen efectos sobre la remodelación ósea.

Abstract

The skeleton is continuously remodelled throughout life, a process that is “orchestrated” by cells of the osteoblast lineage. Remodelling involves a complex network of cell-cell signalling involving systemic hormones, locally produced cytokines, growth factors and the mechanical environment of the cells. Here, it is reported on the effect of mechanically-induced strain on the synthesis by murine osteoblasts in monolayer cultures of IL-6, IL-10, IL-12, and TNF- α . Cells released from the calvarias balb/c mouse, were cultured in F-12 / Dulbecco’s modified Eagle’s medium, containing 10% foetal calf serum and antibiotics. Incubation was carried out at 37°C. In a humidified atmosphere of 5% CO₂ with 95% air. Media were collected and the cytokines levels measured by enzyme-linked immunoassay (ELISA) at 2, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 hours. The results have demonstrated that osteoblasts under mechanical deformation altered the synthesis of IL-6, IL-10, IL-12 and TNF - α compared with their control group. It is shown that TNF- α was up regulated during the first 24 hours of deformation, with up regulated production of IL-6 after 24 hours. Both cytokines regulate RANKL which induces osteoclast activity during bone resorption. Also IL-12 was up-regulated during the first 24 hours, which could inhibit bone resorption, nevertheless IL-10 was demonstrate to have a significant reduction during the first 24 hours of mechanical deformation, which contributes to delay the matrix calcification allowing physiological events of bone remodeling. We concluded that mechanical deformation has effects on the regulation of the production of IL-6, IL-10, IL-12 and TNF- α in murine osteoblasts cultivated *in vitro*. These cytokines have known effects upon bone remodeling.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Rafael Bojalil Parra por todas las facilidades que me ha brindado durante la realización de este proyecto doctoral en el Departamento de Inmunología del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” de la ciudad de México. Así mismo, mi agradecimiento a los Doctores Luis Montaña del Departamento de Bioquímica e Inmunología de la Facultad de Medicina de la U.N.A.M y Felipe Massó del Departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez” por su invaluable apoyo científico y a la Dra. Velia Ramírez Amador Coordinadora de la Especialización de Patología y Medicina Bucal de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco por su valioso apoyo.

A Ricardo Márquez y Rashidi Springall por sus valiosos comentarios sobre los ensayos en la ejecución de la técnica de ELISA. A la Srita. Eva Hilda González López, Jefa del Laboratorio de Química del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”, por la ayuda en la realización de los ensayos de la fosfatasa alcalina en los osteoblastos murinos. Gracias a todos aquéllos que laboran en el Departamento de Inmunología así como de otros departamentos del mismo Instituto y que de forma desinteresada me brindaron un gran apoyo.

Mi más profundo agradecimiento al Profesor Murray C. Meikle, quién fuera mi profesor en Inglaterra durante mis estudios en el Guy's, King's and St. Thomas' Hospitals, Facultad de Medicina de la Universidad de Londres y que en forma incondicional me ha brindado su experiencia y conocimiento científico.

ÍNDICE

	Resumen	iv
	Abstract	v
	Agradecimientos	vi
1	Introducción	1
	Antecedentes	2
2.	Planteamiento del problema	10
3	Hipótesis	11
4	Objetivos	12
4.1	Objetivo General	12
4.2	Objetivos específicos	12
5	Método	13
5.1	Químicos y reactivos	13
5.1.1	Cultivos primarios de osteoblastos murinos	13
5.1.2	Deformación mecánica de los osteoblastos murinos	17
6	Resultados	18
7	Discusión	24
8	Conclusiones	30
	Referencias bibliográficas	31
	Anexo 1	39
	Publicaciones derivadas del presente proyecto	41

FIGURAS

Figura 1.	Regulación de la resorción del hueso por los osteoblastos	6
Figura 2.	Osteoblastos derivados del cráneo de raton Balb/c	16
Figura 3.	Interacción osteoblasto-osteoclasto	28

A Rosina y Carolina

1 Introducción

La importancia de la deformación mecánica en mantener la estructura del tejido esquelético ha sido estudiada desde mediados del siglo XIX por von Meyer (1867) y Wolf (1892). El tejido óseo es remodelado continuamente a través de la vida por la resorción del hueso viejo por medio de los osteoclastos y la formación de nuevo hueso por los osteoblastos. La resorción y formación ósea se da en forma regulada, logrando un proceso de renovación del tejido óseo en el que se mantiene su estructura íntegra (Frost, 1963). La remodelación ósea está dirigida por la línea celular del osteoblasto que lleva a cabo un proceso complejo en el que participan las células del hueso, hormonas sistémicas, citocinas producidas localmente, factores de crecimiento que se encuentran secuestrados dentro de la matriz ósea y por la estimulación mecánica que se ejerce en las células del tejido óseo. Las hormonas sistémicas y la estimulación mecánica influyen en el proceso de controlar la síntesis o acción de las citocinas durante el proceso de remodelación ósea. Las primeras citocinas que demostraron en participar en algunos eventos fisiológicos asociados con la remodelación ósea fueron la Interleucina 1 (IL-1) (Gowen *et al.*, 1983; Heath *et al.*, 1985) seguida del factor de necrosis tumoral (TNF) (Bertolini *et al.*, 1986) y la Interleucina-6 (Ishimi *et al.*, 1990) entre otras. Sin embargo, en la actualidad aún se desconoce el mecanismo por el cual la deformación mecánica induce la remodelación ósea a través de las citocinas. El determinar los aspectos celulares y moleculares que participan en tal proceso, es fundamental tener claro el conocimiento biológico y así desarrollar nuevas terapéuticas.

Antecedentes

La carga mecánica que es aplicada al esqueleto mantiene la estructura y función del tejido óseo (Skerry, 1999). Estudios realizados *in vivo*, demostraron que la deformación mecánica del tejido óseo regula el metabolismo óseo (Huiskes *et al.*, 2000), ya que se demostró que la ausencia de carga mecánica sobre el tejido óseo causó reducción en la producción de matriz, disminuyendo el contenido de mineral e inhibiendo la formación de hueso nuevo (Vico *et al.*, 2001; Basso y Heersche, 2002). Aunque varios investigadores han estudiado la interacción entre el osteoblasto y el osteoclasto poco se sabe de la inducción fisiológica por el cual la deformación mecánica influye en el tejido óseo después de aplicar una carga sobre éste.

La estructura del hueso está conformada de cuatro tipos de células, osteoblastos, osteoclastos, osteocitos, y un tipo de células aplanadas que se encuentran en reposo rodeando a la superficie del hueso. El osteoblasto junto con los condroblastos, fibroblastos, adipositos y mieloblastos se derivan de células del mesénquima (Kember, 1960; Young, 1962), mientras que los osteoclastos son células de origen hematopoiético derivada de la línea del monocito-macrófago (Friedestein, 1976; Owen, 1988; Beresford, 1989). La diferenciación del osteoblasto se debe al *core-binding factor alpha-1* (Cbfa-1), miembro de la familia de factores de transcripción, que pertenece a la familia del gen Runt (Ogawa, *et al.*, 1993). Cbfa-1, también es denominada factor específico del osteoblasto 2 (Osf2); regula la expresión de genes que inducen la síntesis de osteocalcina,

colágeno Tipo I, sialoproteínas y osteopontinas entre otras. Estudios realizados en cultivos celulares han demostrado que la deficiencia de Cbfa-1 produce anomalías esqueléticas correlacionados en la disostosis cleidocraneal (Komori *et al.*, 1997; Otto *et al.*, 1997). La principal función del osteoblasto es sintetizar los componentes que constituyen la matriz extracelular del hueso. Estas incluyen las macromoléculas estructurales, como el colágeno tipo I, el cual forma el 90 por ciento de la matriz orgánica, proteoglicanos, proteínas no colágenas y proteínas de adhesión (Burgess y Maciag, 1989). Los proteoglicanos y colágenos ayudan a la conformación estructural del hueso, modulan los factores de crecimiento y activan diferentes citocinas (Burgess y Maciag, 1989); además ayudan a la regulación de las enzimas que degradan al hueso (Ruoslahti y Yamaguchi, 1991). Una característica importante del osteoblasto, es que tiene la capacidad de regenerar el hueso tanto *in vivo* como *in vitro* por el mismo osteoblasto. Estudios realizados en cultivos de osteoblastos, demostraron que las proteínas morfogenéticas de hueso (BMPs) son importantes en la determinación del fenotipo del osteoblasto. Estas proteínas pertenecen a la familia del factor transformante de crecimiento beta (TGF- β), y estimulan la expresión de marcadores fenotípicos en el osteoblasto como son la fosfatasa alcalina, la síntesis de la osteocalcina, la respuesta al adenosin monofostato cíclico (AMPc) y al colágeno tipo I.

El ejercicio físico a través de la actividad muscular induce que el tejido óseo se remodele (Duncan y Turner, 1995), al conocer este hecho, la deformación mecánica de células óseas empezó a tener gran interés para su estudio. Durante los primeros experimentos de cultivos de osteoblastos probaron que la

remodelación del hueso era mediada por la vía de las prostaglandinas y por la producción del adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Rodan *et al.*, 1975; Harell *et al.*, 1977). Después se mostró que podía activar el inositol fosfato (IP) (Sandy *et al.*, 1989). No obstante los aspectos moleculares en la inducción de la remodelación ósea a través de la deformación mecánica no se ha podido entender en su totalidad. Los cambios en la forma del osteoblasto, por la deformación mecánica, producen una variedad de efectos mediados por las integrinas como la fibronectina y la vitronectina (Wang *et al.*, 1993) incrementando su actividad metabólica. Posteriormente se demostró que los osteoblastos también pueden responder a cualquier fluido que comprima a las células (Owan *et al.*, 1997), aumentando la expresión de osteopontina.

La resorción ósea es un proceso complejo que involucra la remoción tanto mineral como la parte orgánica de la matriz ósea. Los osteoclastos son los responsables de este proceso, que sólo ocurre en la zona de resorción subosteoclástica. Los osteoclastos acidifican el medio permitiendo la disolución del mineral, junto con la participación de las metaloproteinasas (MMPs) (Sellers *et al.*, 1978; Murphy *et al.*, 1989; 1991; Heath *et al.*, 1982; 1984; Müller *et al.*, 1988; Meikle *et al.*, 1992) y de las cisteinas proteinasas (CPs). La remodelación ósea es usualmente regulada por una interacción compleja célula-célula y por la interacción de la matriz del hueso con las células que involucran la producción de enzimas activadoras e inhibidoras, además por moléculas reguladoras como las citocinas y factores de crecimiento. Así mismo participan hormonas como la hormona paratiroidea (HPT) (McSheehy y Chambers, 1986), la vitamina D₃ (Kumenawa *et al.*, 1991), la hormona del crecimiento y hormonas sexuales que actúan en una forma compleja. Estudios

moleculares y celulares han manifestado que grupos específicos de la colagenasa penetran el colágeno intersticial, la gelatinasa (Murphy *et al.*, 1989) degrada los tipo IV, V, VII y IX, junto con otras enzimas como la estromelisin (Senior *et al.*, 1990) que actúan en los diferentes tipos de colágeno. Además de producir las MMPs el osteoblasto (Figura 1), también produce un inhibidor tisular de las metaloproteinasas (TIMP) que contrarresta la producción de las metaloproteinasas el cual el más común es el TIMP-1 (Murphy *et al.*, 1991). La expresión de MMPs y TIMP producido por las células óseas es regulada por una variedad de citocinas, particularmente por la IL-1, factores de crecimiento y hormonas (Murphy *et al.*, 1989; Pavloff *et al.*, 1992; Kumenawa *et al.*, 1991).

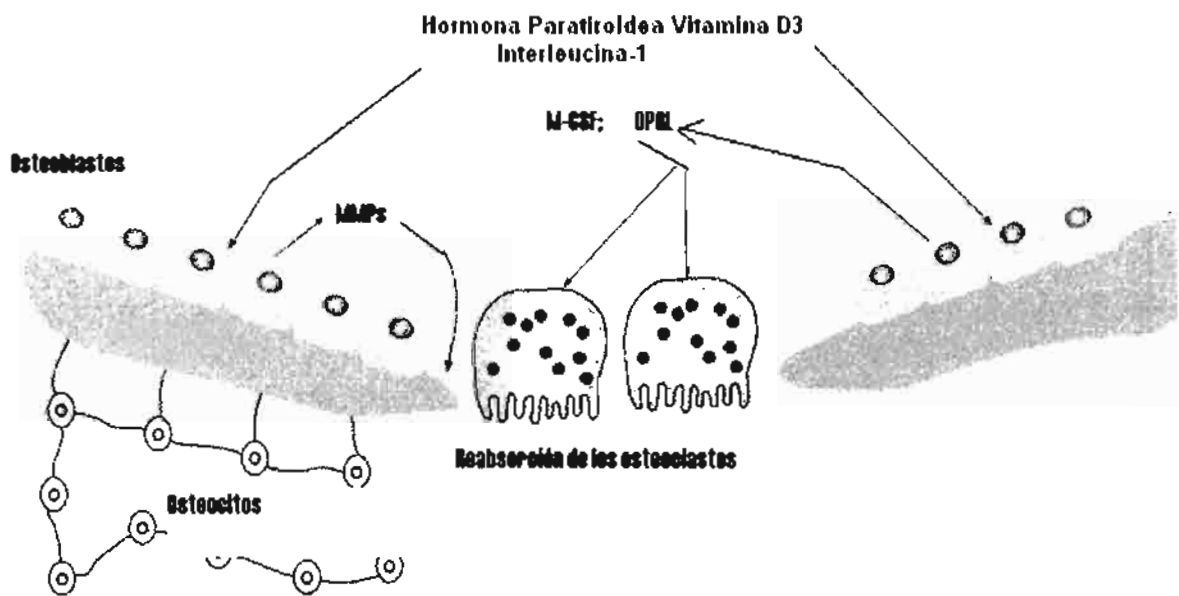


Figura 1.

Figura 1. Regulación de la resorción del hueso por los osteoblastos. La fase inicial consiste de la degradación de la superficie por la acción de las metaloproteinasas (MMPs) que son secretadas por el osteoblasto en respuesta a la hormona paratiroidea (PTH), la $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y las citocinas (IL-1). También los osteoblastos secretan el M-CSF, y el OPG/RANKL, quienes estimulan a los osteoclastos en la formación y función.

Las citocinas que participan en la remodelación ósea expresadas por el osteoblasto, son moléculas de bajo peso molecular ($\text{MW} < 25\text{kDa}$) que regulan o modifican la acción de otra célula, en forma autocrina o paracrina. También exhiben actividades biológicas sobrepuestas con efectos pleitrópicos. Además de las citocinas, participan en la remodelación ósea, el TNF, el interferon, factores de crecimiento y factores estimulantes de colonias (Meikle, 2002).

La interleucina 6 (IL-6) miembro de la familia gp130, que incluyen a la cardiotropina-1, factor neutrófilo ciliar (CNTF), interleucina 11 (IL-11), oncostatina-M (OSM) y neutrofina-1, que parecen tener un transductor de señal común (gp 130), en las que se producen estructuras y actividades similares a una variedad de células como son las hematopóieticas, los hepatocitos, las células de las neuronas y las células óseas (Heyman y Russelle, 2000). Esta citocina tiene efectos en la osteoclastogénesis y en la inducción de la resorción ósea (Kotake *et al.*, 1996), junto con la IL-1, el TNF y la HPT. Sin embargo, cuando los osteoclastos de cultivos celulares de médula ósea son estimulados por IL-6 por inducción de la IL-1 y se les adicionó el antagonista de la IL-1, se observó la inhibición en la formación de osteoclastos por medio de la IL-6 (Devlin *et al.*, 1998). La IL-6

también estimula la actividad de los osteoclastos, por un mecanismo indirecto el cual incrementa la interacción entre el osteoblasto y el osteoclasto, no obstante, se conoce que los osteoblastos expresan IL-6, pero no inducen la resorción del hueso por sí misma (Hattersley *et al.*, 1998). Recientemente se ha estudiado que la IL-6 es responsable de estimular la producción osteoblastica y de regular la actividad osteoclástica a través del factor Nuclear κ B (RANKL) (Kwan *et al.*, 2004).

El TNF- α es una citocina multifuncional producida principalmente y activada por los macrófagos y que ejerce diversas funciones. El TNF- α (proteína madura) es expresada bajo condiciones fisiológicas y por una adhesión proteolítica del precursor pro TNF- α , una proteína de tras membrana tipo II de la unión Ala76-Val77, esta citocina induce la osteoclastogénesis (Black *et al.*, 1997), por sobre regulación del RANKL activando la diferenciación de los osteoclastos a través de un mecanismo autocrino (Zou *et al.*, 2001), tanto *in vitro* (Thompson *et al.*, 1987), como *in vivo* (Kóning *et al.*, 1988). Además se ha demostrado que la participación del TNF- α en la pérdida de hueso es notable en la periodontitis, en los implantes perdidos y en otra forma de osteolisis del hueso cuando se trata de un proceso inflamatorio (Bingham *et al.*, 2002). Los osteoclastos activados por el TNF- α , tienen la capacidad de inducir la resorción del hueso con la presencia de la IL-1 α siempre y cuando hay un problema patológico inflamatorio (Kobayashi *et al.*, 2000). La IL-1 junto con el TNF- α juegan un papel importante en la resorción ósea en cualquier enfermedad inflamatoria patológica en el hueso (Dinarello, 1994 ;Kobayshi *et al.*, 2000), tanto la IL-6 como el TNF- α participan en la inducción de la resorción ósea en la remodelación ósea sin embargo, poco se sabe cómo responde estas citocinas bajo la deformación mecánica. En el proceso de

remodelación ósea además de las citocinas antes mencionadas también se cree que participan otras 20 citocinas, y en este caso sólo se referirán la IL-10 y IL12, las cuales fueron estudiadas en este proyecto para evaluar su papel durante la deformación mecánica en la remodelación ósea. La IL-10 fue descrita inicialmente como un producto derivado de las células murinas Th2 que inhibe la síntesis de las citocinas de células Th1 (Moore *et al.*, 1993), ahora se sabe que también es producida por una gama de diferentes células como los CD4 +, Th0 y las células Th1, CD8 +, células T, células B, queratinocitos, varias líneas de células tumorales y de importancia particular, los monocitos/macrófagos (De Waal *et al.*, 1991; Yssel *et al.*, 1992; O'Garra., 1998). La IL-10 Inhibe varias funciones de los macrófagos (De Waal *et al.*, 1991) y estimulan el crecimiento de mastocitos (Thompson *et al.*, 1991). Aunque esta citocina tiene actividades pleiotrópicas, también se ha mostrado que tiene efectos en la diferenciación del osteoblasto (Van Vlasselaer, *et al.*, 1993), así como un potente inhibidor de la formación de osteoclastos (Owen *et al.*, 1996) que en forma selectiva inhibe la diferenciación de osteoclastos progenitores (Xu *et al.*, 1995). Por otra parte la IL-12, es una citocina producida por macrófagos y linfocitos B, que tiene múltiples efectos en las células T y células NK, incluyendo el estímulo de la actividad citotóxica, de proliferación, de promoción en el desarrollo de las Th1, del Interferón-Gamma (INF- γ), y de la producción del TNF (Banchereau y Steinman, 1998). En un estudio Undawa (1997) concluyó que el INF- γ es un inhibidor poderoso de la osteoclastogenesis cuando se utilizó una dosis dependiente de IL-12, posteriormente Horwood *et al.*, (2001) informó que la IL-12 es una citocina estimulante y poderosa en la que puede inhibir la formación de los osteoclastos en co-cultivos de células de hueso

de ratón *in vitro*, el efecto resultó dosis dependiente durante el período de cultivo. También se ha demostrado que La IL-12 inhibe la formación del osteoclastos en cultivo de células de médula de hueso de ratón tratadas con M-CSF (Kitaura *et al.*, 2002), e induce la apoptosis de las células vecinas con la participación del TNF- α y en la formación mediada por osteoclastos de células derivadas de la médula de hueso de ratón, demostrando que la IL-12 pueden inhibir la formación de osteoclastos, relacionada tanto en la resorción fisiológica del hueso inducida por los RANKL, como la resorción patológica del hueso inducida por el TNF- α . Posteriormente se ha reportado que la IL-12 inhibe la formación de osteoclastos en la formación positiva-trap de cultivo con el M-CSF inducido como precursores de los osteoclastos (Nagata *et al.*, 2003). Por todo lo estudiado y demostrado anteriormente, el propósito de este estudio fue de evaluar el papel de las citocinas en el proceso fisiológico de la remodelación ósea inducida por la deformación mecánica en osteoblastos murinos cultivados *in vitro*, para determinar los aspectos celulares y moleculares involucrados en dicho proceso.

2. Planteamiento del problema

La carga mecánica que es aplicada al esqueleto, mantiene la estructura y función del tejido óseo. Durante el proceso de la remodelación ósea participan diferentes citocinas. ¿Sin embargo se puede explicar la remodelación ósea debida a la deformación mecánica por la producción de citocinas?

3. Hipótesis

La deformación mecánica intermitente incrementa la producción de interleucinas en osteoblastos murinos cultivados *in vitro*. Estas citocinas contribuyen a los sucesos relacionados con la remodelación ósea.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Evaluar los efectos de la deformación mecánica intermitente en osteoblastos murinos cultivados *in vitro* en la producción de citocinas para determinar los eventos que están involucrados en la remodelación ósea.

4.2 Objetivos específicos

- 1- Establecer un modelo de cultivo celular de osteoblastos derivados del cráneo de ratón balb/c *in vitro*.
- 2- Evaluar los efectos de la deformación mecánica intermitente en osteoblastos murinos cultivados *in vitro* sobre la producción de la IL -6, IL-10, IL-12 y el TNF- α .

5. Método

Diseño del estudio

El presente estudio fue experimental en el que se derivaron osteoblastos del cráneo de ratones recién nacidos Balb/c y se cultivaron *in vitro* en cajas petriperm de 30mm con bases flexibles para ser sometidos a deformación mecánica intermitente de 0 a 96 horas (n=10). El grupo control no fue sometido a deformación (n=10). Se recolectaron los sobrenadantes de las 2, 8, 16, 24, 72 y 96 horas, los cuales fueron guardados a -70°C. Los sobrenadantes fueron analizados por ELISA para determinar los efectos de la deformación mecánica en osteoblastos murinos sobre la producción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α .

5.1 Químicos y reactivos

Los anticuerpos murinos de la IL-6, IL-10, IL-12 y TNF α fueron obtenidos de la compañía Pharmigen (USA). Medios de cultivo, antibióticos, suero fetal de ternera y tripsina EDTA fueron obtenidos de la compañía Gibco (Grand Island, N.Y). Ratones hembras recién nacidas Balb/c fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez de los cuales fueron sacrificados de acuerdo a las guías de investigación aprobadas por el comité ético del Instituto.

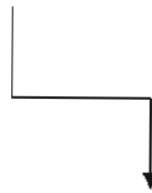
5.1.1 Cultivos primarios de osteoblastos murinos.

Los osteoblastos murinos fueron preparados y caracterizados por la modificación de un método previamente descrito por Heath *et al.*, (1984). El cráneo de 30

ratones hembras recién nacidas (1-2 días) les fueron extraídos los huesos frontales y parietales, estos fueron removidos asépticamente y eliminando el tejido adherente como piel, músculo y tejido nervioso. Los huesos fueron expuestos a su digestión enzimática por medio de tripsina EDTA (10 mg/ml (Gibco, USA), los osteoblastos desprendidos de la primer digestión enzimática de 20 minutos y de la segunda digestión durante los próximos 40 minutos fueron eliminados. Los huesos del cráneo restante fueron lavados en solución buffer de fosfatos (PBS) y cortados en pedazos con un bisturí antes de una tercera digestión enzimática durante otros 20 minutos. El medio fue centrifugado a 1000 rpm durante 5 minutos, los osteoblastos obtenidos fueron contados en una cámara de New Bayer ajustados a 1×10^6 células en 1 ml para ser resuspendidos en cajas petri de 6 pozos de 35 mm en un medio de cultivo F-12 Dulbecco modificado (Ham's F12-Dulbecco's modified Eagles's medium -DMEM) con un 20% de suero fetal bovino (FCS Giberfanr) 100 U/ml de penicilina, 100 μ g/ml de estreptomicina y 0.25 μ g/ml de anfotericina, creciendo las células a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y un 5% de CO₂ . El medio de cultivo fue reemplazado cada 48 o 72 horas dependiendo del cambio de pH que se presentó.

Figura 2. Osteoblastos derivados del cráneo e raton balb/c

Ratones hembras Balb/c proporcionadas por el bioterio del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez" de la Ciudad de México. Estos especímenes fueron sacrificados de acuerdo a las normas éticas establecidas por el propio Instituto.

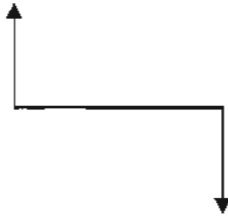


El cráneo de 20 ratones hembras (Balb/c) recién nacidas (1-2 días), los cuales les fueron extraídos asépticamente los huesos frontales y parietales, eliminando todo tejido adherente como piel, músculo y tejido nervioso.





Exposición de los huesos a digestión enzimática por medio de tripsina EDTA (10 mg/ml (Gibco, USA). Los osteoblastos desprendidos entre 20 y 40 minutos fueron eliminados. Los huesos del cráneo restantes fueron lavados en solución buffer de fosfatos (PBS) y cortados en pedazos pequeños con un bisturí antes de una tercera digestión enzimática durante otros 20 minutos.



Osteoblastos murinos de 4 semanas de cultivos.

5.1.2 Deformación mecánica de los osteoblastos murinos

El sistema fue basado en un modelo de cajas de petri (Banes *et al.* 1985; García S. 1995; García y *col.*, 1995) que en resumen es el siguiente: Utilizando cajas de petri Petriperm (30mm, In Vitro systems, Alemania) con bases flexibles hechas de polifluoritano, fueron deformadas sobre anillos de caucho en una base de acrílico, se aplicó vacío de -11 mg de Hg produciendo un aumento de la superficie del área en un 5% (1.5mm) a temperatura de 37°C durante el experimento. Una atmósfera de CO₂ estuvo presente durante la deformación de la base de la caja petri. Grupos de 10 cultivos fueron aleatoriamente colocados tanto controles como experimentales y fueron incubados secuencialmente en el mismo lugar. La única diferencia fue que el grupo control no fue expuesto a la deformación mecánica. Esta deformación fue aplicada intermitentemente por 6 segundos cada 1.5 minutos de 0 a 96 horas. El sobrenadante fue recolectado después de la deformación intermitente durante las 2, 8, 24, 48, 76 y 96 horas de cultivo y centrifugado a 1000 rpm para remover cualquier partícula extraña. El sobrenadante fue almacenado a -70°C para poder determinar la producción de IL-6, IL-10, IL-12 y el TNF- α por medio de un ensayo de ELISA (Enzyme-linked immunoassay) (García-López *et al.*, 2005)

Análisis estadístico

Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM): (n=10). La prueba de T - Student fue utilizada para detectar diferencias significativas. Los resultados fueron analizados con el programa Prism (USA) para computadora personal.

6 Resultados

Para investigar los efectos sobre la producción de citocinas por medio de la deformación mecánica en osteoblastos murinos, se registró en forma cuantitativa (pg/ml) de acuerdo al diseño del estudio se tomó el promedio de cada sobrenadante a las 2, 8, 24, 48, 72 y 96 horas. Como parte del análisis de los resultados se separaron dos grupos que corresponden al grupo control (n=10, sin deformación mecánica) y el grupo experimental (con deformación mecánica, n=10) seleccionados aleatoriamente para ambos grupos utilizando un paquete estadístico (Prism U.S.A.) para computadora personal y se realizó la prueba de T para distinguir su diferencia significativa entre el grupo control y el grupo experimental.

En el experimento se derivaron osteoblastos del cráneo de ratones recién nacidos Balb/c y se cultivaron *in vitro* en cajas petriperm de 30mm con bases flexibles para ser sometidos a deformación mecánica intermitente de 0 a 96 horas (n=10). El grupo control no fue sometido a deformación (n=10). Se recolectaron los sobrenadantes de las 2, 8, 16, 24, 72 y 96 horas y fueron guardados a -70°C . Los sobrenadantes fueron analizados por ELISA para determinar los efectos de la deformación mecánica en osteoblastos murinos sobre la producción de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α .

Los resultados mostraron que los osteoblastos murinos cultivados *in vitro* sintetizaron en forma constante IL-10, su producción aumentó paulatinamente a partir de las 2 horas hasta las 48 horas posteriormente empezó un decremento llegando a los mismos niveles de las 2 horas (gráfica 1 y 2). La deformación mecánica de los

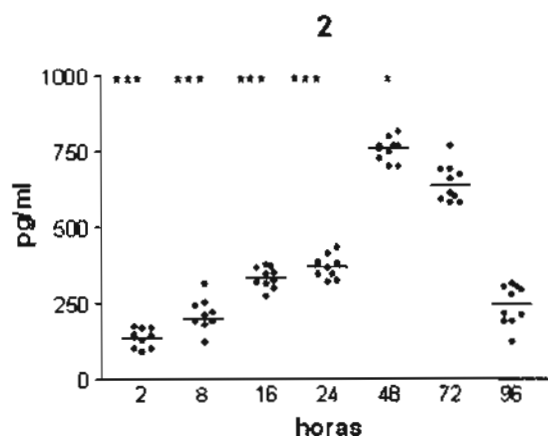
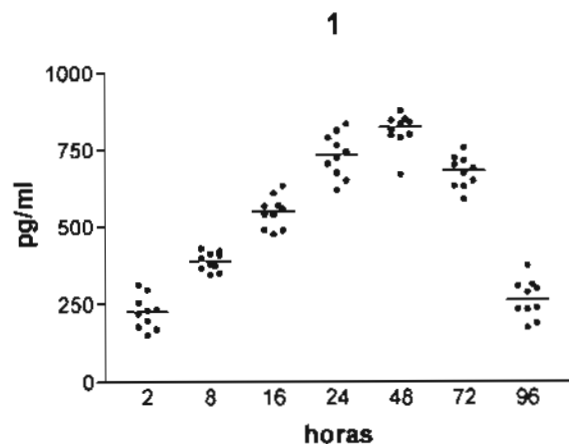
osteoblastos murinos provocó disminución desde las 2 hasta las 24 horas en forma significativa en la producción de IL-10 (gráfica 2) comparada con los cultivos del grupo control (gráfica 1; $p < 0.001$). Sin embargo a las 48, 72 y 96 horas no hubo diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos.

En relación a la IL-12, los osteoblastos murinos la produjeron en forma constante y su producción se mantuvo en forma estable hasta las 96 horas del período de cultivo en el grupo control (gráfica 3). En contraste la IL-10, con la deformación mecánica de los osteoblastos murinos cultivados *in vitro*, tuvo un efecto estimulante sobre la síntesis de IL-12 a partir de las 2 y hasta las 24 horas (gráfica 4) comparados con el grupo control (gráfica 3; $p < 0.001$). A partir de las 48 horas, el efecto estimulante regresó a niveles similares al del grupo control sin presentar diferencias estadísticamente significativas (gráfica 4).

Así mismo, se observó que la IL-6, también se expresa en forma constitutiva esta citocina en los osteoblastos murinos de las 2 hasta las 96 horas (gráfica 5). Aunque las células deformadas incrementan significativamente la producción de ésta citocina a las 24 horas y aún más a las 48 horas ($p < 0.001$) comparadas con el del grupo control (gráfica 6). El efecto estimulante durante la deformación mecánica de los cultivos murinos se perdió a partir de las 72 horas.

Por otra parte, TNF- α también se expresa en forma constante desde las 2 hasta las 96 horas (gráfica 7) en los osteoblastos murinos cultivados *in vitro*. La deformación mecánica incrementa la producción de TNF- α desde las 2 hasta las 24 horas ($p < 0.001$) comparadas con su grupo control y a partir de las 48 horas regresó a niveles similares al grupo control.

Gráfica 1 y 2. Producción de Interleucina-10 en cultivos de monocapas de osteoblastos murinos del grupo control (1) y deformados mecánicamente (2).

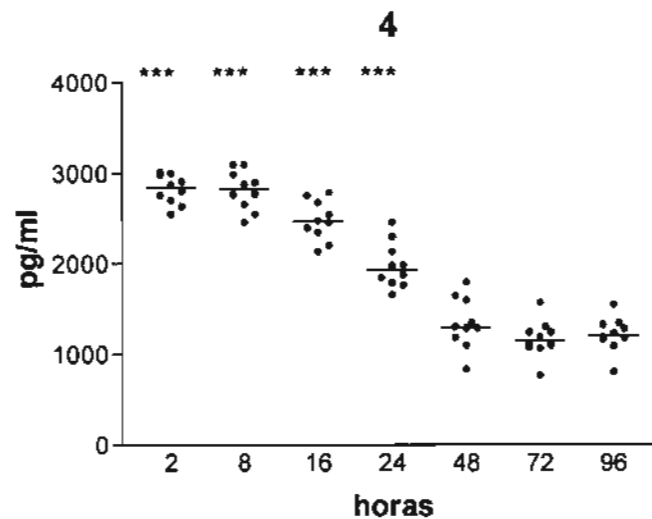
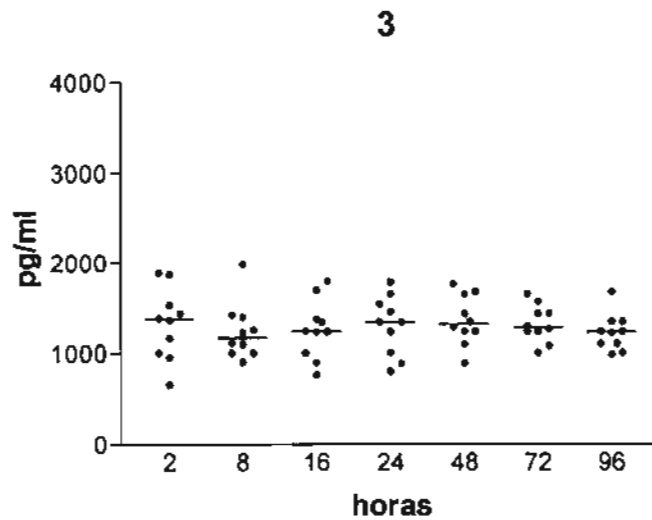


Graficas 1 y 2 Monocapas de cultivos de osteoblastos murinos fueron sujetos a la deformación mecánica durante 6 segundos cada 1.5 minutos de 2 a 96 horas, comparados con osteoblastos no estimulados. El sobrenadante fue analizado para IL-10 por medio de la prueba de ELISA. La primera gráfica representa el control (osteoblastos no deformados) y la segunda gráfica el experimental (deformado mecánicamente). Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM): (n=10). La prueba de T de Student fue utilizada para detectar diferencias significativas.

*** ($p < 0.001$) de IL-10 en los osteoblastos deformados comparados con los no deformados.

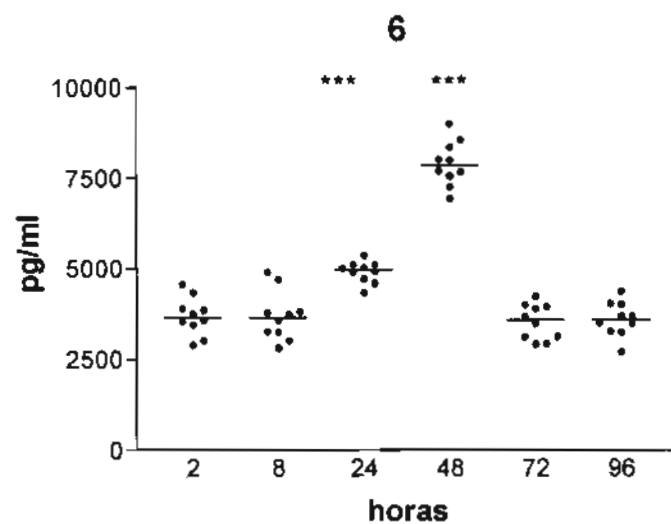
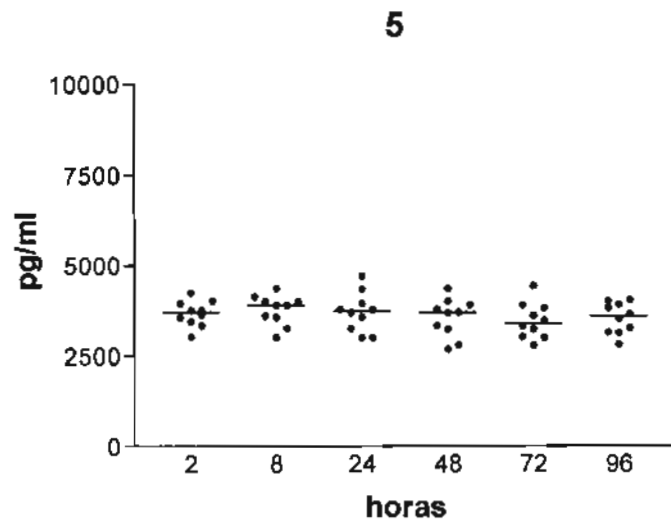
* ($p < 0.01$) de IL-10 en los osteoblastos deformados comparados con los no deformados.

Gráficas 3 y 4. Producción de Interleucina-12 en cultivos de monocapas de osteoblastos murinos del grupo control (3) y deformados mecánicamente (4).



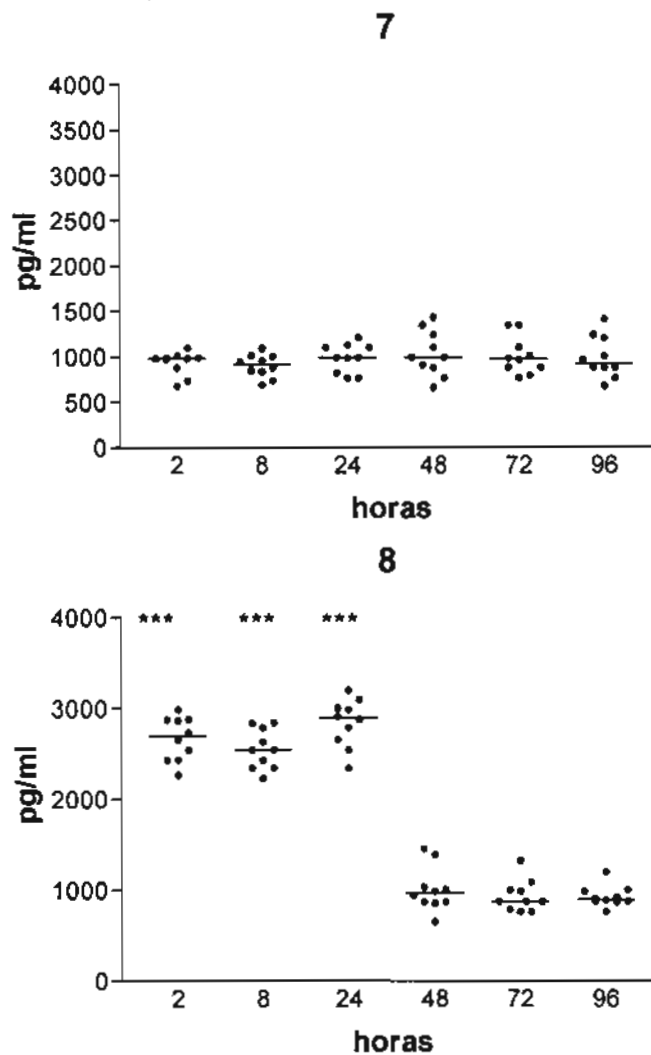
Gráficas 3 y 4 Monocapas de cultivos de osteoblastos murinos fueron sujetas a la deformación mecánica durante 6 segundos cada 90 segundos de 2 a 96 horas, comparados con osteoblastos no estimulados. El sobrenadante fue analizado para la IL-12 por medio de la prueba de ELISA. La primera gráfica (3) representa el control (osteoblastos no deformados) y la segunda gráfica el grupo experimental (4) deformados mecánicamente. Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM): (n=10). La prueba de T de Student fue utilizada para determinar diferencia significativa. *** Incremento altamente significativo a las 2, 8, 16, y 24 horas ($p < 0.001$) de IL-12 en los osteoblastos murinos deformados mecánicamente comparados con los no deformados.

Gráficas 5 y 6. Producción de Interleucina-6 en cultivos de monocapas de osteoblastos murinos del grupo control (5) y deformados mecánicamente (6).



Gráficas 5 y 6 Monocapas de cultivos de osteoblastos murinos fueron sujetas a la deformación mecánica durante 6 segundos cada 90 segundos de 2 a 96 horas, comparados con osteoblastos no estimulados. El sobrenadante fue analizado para la IL-6 por medio de la prueba de ELISA. La primera gráfica (5) representa el control (osteoblastos no deformados) y la segunda gráfica el grupo experimental (6) deformados mecánicamente. Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM); (n=10). La prueba de T de Student fue utilizada para determinar diferencia significativa. *** Incremento altamente significativo a las 24 y 48 horas ($p < 0.001$) de IL-6 en los osteoblastos murinos deformados mecánicamente comparados con los no deformados.

Gráficas 7 y 8. Producción del TNF- α en cultivos de monocapas de osteoblastos murinos del grupo control (7) y deformados mecánicamente (8).



Gráficas 7 y 8. Monocapas de cultivos de osteoblastos murinos fueron sujetas a la deformación mecánica durante 6 segundos cada 90 segundos de 2 a 96 horas, comparados con osteoblastos no estimulados. El sobrenadante fue analizado para el TNF- α por medio de la prueba de ELISA. La primera gráfica (7) representa el control (osteoblastos no deformados) y la segunda gráfica el grupo experimental (8) deformados mecánicamente. Los resultados son expresados en promedio \pm (SEM): (n=10). La prueba de T de Student fue utilizada para determinar diferencia significativa. *** Incremento altamente significativo a las 2, 8 y 24 horas ($p < 0.001$) del TNF- α en los osteoblastos murinos deformados mecánicamente comparados con los no deformados

7. Discusión

En el presente estudio se utilizó un modelo previamente establecido y validado para derivar osteoblastos a partir del cráneo de ratón (Heath *et al.*, 1985), los osteoblastos obtenidos fueron sembrados en cajas petri perm (In Vitro Germany), las cuales tienen la propiedad de que la base se puede deformar en forma convexa (Hasegawa *et al.*, 1985; Banes *et al.*, 1985; Sandy *et al.*, 1989, García-López *et al.*, 1999; 1999; 2003), demostrando mejores resultados que los que han sido realizados con la distorsión de las células en una forma lineal (Harell *et al.*, 1977). Durante el estudio se observó que no hubo diferencia discernible en la forma y orientación de las células entre el grupo control y los cultivos mecánicamente deformados.

El proceso de deformación de la base de la caja de cultivo alteró la síntesis de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α por las células estimuladas en comparación con su grupo control no estimulado. De las citocinas estudiadas sólo se disminuyó la síntesis de IL-10 y se incrementaron las de IL-6, IL-12 y TNF- α . El hecho de que la deformación mecánica haya tenido un efecto inmediato sobre la producción de citocinas, coincide con los estudios realizados *in vivo* (Lanyon y Baggott., 1976; Lanyon and Hartman, 1976; Hert *et al.*, 1971), donde se observó que hay una respuesta rápida de tipo osteogénico, por parte del hueso al aplicar una carga, debido probablemente a la reactivación de las células óseas en reposo que cubren la superficie del hueso (Pead *et al.*, 1988; Chambers *et al.*, 1993) y que no depende de una fase previa de resorción ósea (Chow *et al.*, 1998). En estudios realizados empleando la hormona paratiroidea, demostraron también que dicha hormona induce la formación de hueso

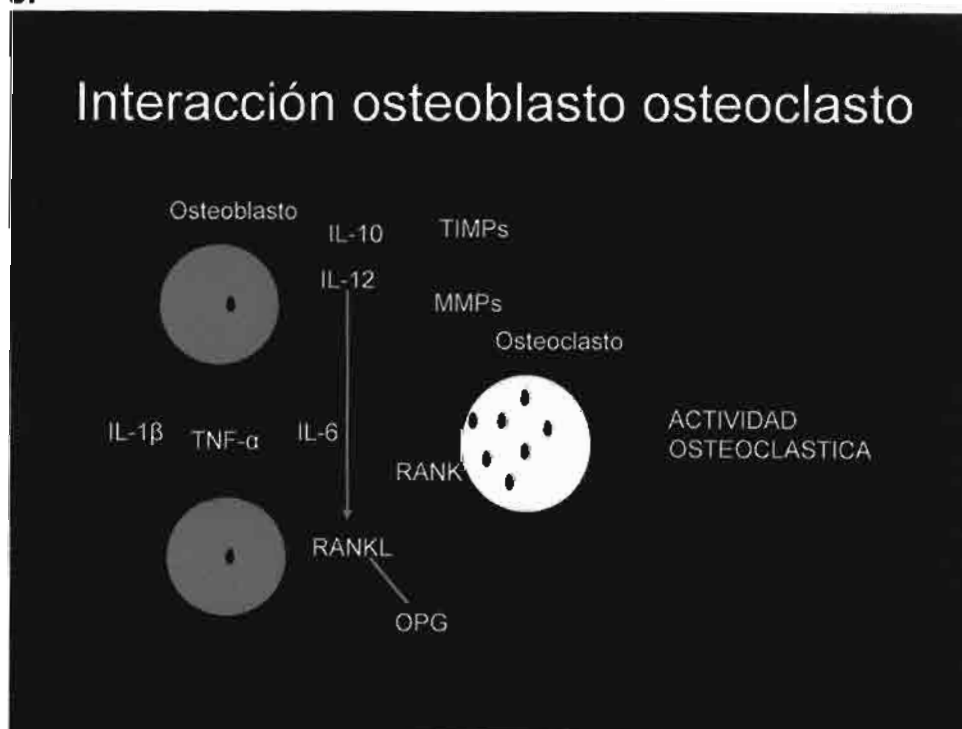
sin que se requiera una fase previa de resorción ósea (Hock *et al.*, 1989). Aunque la formación y resorción del hueso se consideran como procesos simultáneos durante la remodelación ósea, la evidencia científica ha demostrado que hay una fase inicial de resorción que no es una condición esencial previa de la osteogénesis. Se sabe que dos proteínas de superficie de la célula, el receptor activador del factor nuclear kappa B (RANK) y su ligando RANKL, son reguladores claves en la formación y función del osteoclasto. Este último es expresado por osteoblastos y células del estroma del hueso, participando en la diferenciación del osteoclasto (Yasuda *et al.*, 1998; 1998). Tomando en consideración la evidencia anterior, se diseñó un experimento para determinar si la deformación mecánica de los osteoblastos murinos incrementa la síntesis del TNF- α , y demostrando que efectivamente existe un incremento en la síntesis de TNF- α durante las primeras 24 horas, el cual se inicia a partir de la segunda hora a partir del estímulo. Por lo tanto, se mostró que sí hay una respuesta inmediata a la deformación mecánica. De acuerdo a lo postulado por Nanes (2003) podríamos considerar que al menos parcialmente la sobre producción de esta citocina, contribuye a disminuir la función de los osteoblastos maduros durante la fase inicial de la deformación mecánica, afectando la producción de la matriz e inhibiendo la diferenciación de los nuevos osteoblastos. Además un fenómeno no menos importante es la sobre producción de TNF- α en combinación con IL-1 (García-López *et al.*, 2003) que inicia en una cascada de eventos durante las primeras 24 horas y que culmina en la activación del factor de transcripción NF- κ B y JNK (c-Jun N-terminal cinasa) dado que la IL-1 induce la formación de dos heterodímeros que participan en la activación celular mediada por esta citocina, el receptor tipo I de IL-1 (IL-1R1) y la proteína receptora

accesoria IL-1RAcP, las cuales activan y reclutan a la molécula MyD88 del receptor de IL-1 asociada con las cinasas IRAK (cinasa asociada al receptor de IL-1) y TRAF-6 (factor asociado al receptor de TNF-6; Baud *et al.*, 1999). La activación de estas moléculas en el osteoblasto sobre regula la expresión de RANKL, el cual se une al RANK del osteoclasto, induciendo de esta manera diferenciación y actividad osteoclástica. En el presente trabajo, a partir de las 24 horas de deformación se observó un incremento en la producción de IL-6. Esta citocina también induce actividad osteoclástica y resorción ósea, mediada por RANKL (Kwan *et al.*, 2004). En este caso la expresión del RANKL se da a través de la activación de una tirosina cinasa de la familia Janus (JAK) modulando la activación de los factores de transcripción STAT. La IL-6 también activa la vía de la cascada de MAPK (cinasa de la proteína activada por mitógenos) quien activa a la Src-3 cinasa fosfatidilinositol dependiente en la activación de factor Akt, controlando la producción de RANKL. La sobreproducción de TNF- α durante las primeras 24 horas y la sobre producción de IL-6 posterior a las 24 horas de estimulación mecánica, indica que ambas citocinas sobre regulan RANKL, induciendo la actividad osteoclástica durante la resorción del hueso. La sobreproducción de IL-6 posterior a las 24 horas, podría deberse al incremento previo en la síntesis de TNF- α (Kurokouchi K, *et al.*, 1998). Por otro lado, Rubin y colaboradores (2000) estudiaron que la presión mecánica aplicada a las células del estroma de la médula de hueso, disminuye en un 60% los niveles del RNAm del RANKL. Los estudios realizados por Kusumi *et al.*, (2005) confirmaron también la reducción del RANKL en osteoblastos parecidos a humanos sometidos a la deformación mecánica, observando una inducción negativa de P38 MAPK (Sugiura *et al.*, 2004; Alvarado-Kristensson y Andersson., 2005; Kusumi *et al.*, 2005).

Tomando en consideración las observaciones anteriores, podría pensarse que la deformación mecánica reduce la expresión del RNAm de RANKL, aunque en el estudio no se determinó esta disminución en los osteoblastos directamente, si se pudo observar que la deformación mecánica de los osteoblastos murinos indujo una sobreproducción de IL-12 durante las primeras 24 horas, lo cual podría contribuir a inhibir la expresión de RANKL (García-López *et al.*, 2005). Nagata *et al.*, (2003), mostró que la inhibición de RANKL por la IL-12 en cultivos de hueso de médula de ratón, está mediada por IFN- γ . En este grupo de trabajo recientemente se determinó que la deformación mecánica también sobre regula la osteoprotegerina (OPG), el efecto se observó después de las 24 horas de deformación, este incremento en la OPG probablemente también contribuye a la inhibición de la expresión de RANKL (García-López *et al.*, 2006). Es interesante además observar que de manera similar ocurre con las células involucradas en la respuesta inmune, ya que el aumento de IL-12 se vio acompañado de una disminución en la producción de IL-10 de forma significativa durante las primeras horas. Se ha reportado que los niveles elevados de IL-10 coadyuvan a la diferenciación osteoblástica en la médula ósea murina (Van Vlaselaer *et al.*, 1993), inhibiendo la actividad de fosfatasa alcalina, la síntesis de colágena tipo I y la osteocalcina, fenómenos previos a la calcificación de la matriz ósea, todo esto mediado por la inhibición de TGF- β (Van Vlasselaer *et al.*, 1994) molécula esencial en la osteogénesis (Owens *et al.*, 1996). De acuerdo a las citocinas estudiadas podemos considerar que la deformación mecánica indujo la sobreproducción de TNF- α durante las primeras 24 horas e IL-6 posterior a las 24 horas, esto implicaría la posibilidad de que hay una sobre regulación de RANKL en los osteoblastos, lo que a su vez induciría la activación osteoclastica a través de

RANK. Sin embargo, la IL-12 también fue sobre regulada durante las primeras 24 horas. Esto si bien podría contribuir al efecto opuesto, es decir, a disminuir la expresión del RANKL, lo que posiblemente funcionaría como un mecanismo de regulación, también teóricamente favorece la producción de INF- γ . Esta citocina podría contribuir a la resorción ósea induciendo la producción de MMP. Por otro lado se encontró también una producción disminuida de IL-10 durante las primeras 24 horas, ya que la IL-10 induce la producción de TIMP en osteoblastos y es capaz de inhibir MMP (Lacraz *et al.*, 1995), por lo que su producción disminuida resultaría en una capacidad menor de inhibir MMP, es decir, tanto IL-12 como IL-10 podrían también contribuir a la resorción ósea y por lo tanto, el conjunto de estas citocinas producidas, parecería contribuir a un retardo en la calcificación de la matriz ósea permitiendo la remodelación (figura 3).

Figura 3.



Por todo lo anterior se puede concluir que los estímulos mecánicos influyen en la remodelación de hueso mediante una sucesión de acontecimientos complejos que implican la regulación de las citocinas osteotrópicas expresadas y secretadas por los osteoblastos; éstas citocinas actuarían de una forma autocrina y paracrina y activarían la síntesis de otras citocinas y de los factores de crecimiento implicados en la diferenciación y función tanto de los osteoblastos como de los osteoclastos. La manipulación de estas citocinas y factores de crecimiento podrían tener efectos benéficos desde el punto de vista terapéutico.

8. Conclusiones

- a) Los osteoblastos sometidos al proceso de deformación mecánica alteraron su síntesis de IL-6, IL-10, IL-12 y TNF- α comparados con los de su grupo control.
- b) Se determinó que durante las primeras 24 horas de deformación, se incrementó la producción de TNF- α , seguida de una sobreproducción de IL-6 posterior a las 24 horas. Ambas citocinas sobre regulan RANKL, lo que contribuiría a la actividad osteoclástica en la inducción de la resorción ósea.
- c) La IL-12 demostró un incremento durante las primeras 24 horas. Esto podría tener un doble efecto. Por un lado, regularía en parte la inhibición del RANKL controlando el proceso de resorción ósea y por otro, induciendo la producción de INF- γ , lo que podría estimular las MMPs y favorecer la resorción ósea.
- d) La IL-10 demostró una reducción significativa durante las primeras 24 horas, por lo que su producción disminuida resultaría en una capacidad menor de inhibir MMPs, que a su vez contribuiría a un retardo en la calcificación de la matriz ósea permitiendo sucesos fisiológicos de la remodelación ósea.
- e) Los resultados del presente proyecto son una contribución para entender mejor la fisiología del hueso durante la deformación mecánica, para poder comprender los eventos que suceden en la remodelación ósea y para el desarrollo de esquemas terapéuticos.

Referencias bibliográficas

- Alvarado-Kristensson M., Andersson T.
Protein phosphatase 2A regulates apoptosis in neutrophils by dephosphorylating both p38 MAPK and its substrate caspase 3.
Journal of Biology and Chemistry 2005; **280**:6238-6244
- Banchereau, J., and Steinman, R.M.
Dendritic cells and the control of immunity.
Nature 1998;**392**: 245-250.
- Banes, A. J., Gilbert, J., Taylor, D. and Monbureau, O.
A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro*.
Journal of Cell Science 1985;**75**:35-42.
- Basso N., Heersche J
Characteristics of in vitro osteoblastic cell loading models.
Bone 2002 **30**:347-351
- Baud V., Liu Z., Bennett B., et al.
Signaling by proinflammatory cytokines: oligomerization of TRAFⁿ and TRAF6 is sufficient for JNK and IKK activation and target gene induction via an amino-terminal effector domain.
Genes Development 1999;**13**:1297-308.
- Beresford J.
Osteogenic stem cells and the stromal system of bone and marrow.
Clinical Orthopaedics and Related Research 1989; **240**:270-280
- Bertolini D., Nedwin G., Bringham T., et al.
Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors.
*Nature*1986; 516-518
- Bingham C.
The pathogenesis of rheumatoid arthritis: pivotal cytokines involved in bone degradation and inflammation.
Journal of Rheumatology 2002 (Suppl); **65**:3-9
- Black R., Rauch C., Koxloxy C., et al.
A metalloproteinase desintegrin that releases tumour-necrosis factor alpha from cells.
Nature 1997 ; **385**:729-733
- Burgess W., and Maciag T.
The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins.
Annual Review of Biochemistry 1989; **58**:575-606
- Chambers T., Evans M., Gardner T., et al.
Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading.
Bone and Mineral 1993;**20**:167-178
- Chambers, T.J., Martin, T.J., and Gillespie, M.T.

- Interleukin-18 (interferon- γ -inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation.
Journal of Experimental Medicine 1997;**185**:1005-1009
- Chow J., Wilson A., Chambers T., et al.
Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week old rats.
Journal of Bone and Mineral Research 1998;**13**:1760-1767
- Devlin R., Reddy S., Savino R et al.
IL-6 mediates the effects of IL-1 or TNF, but not PTHp or 1,25(OH) $_2$ D $_3$, on osteoclast-like cell formation in normal human bone marrow cultures.
Journal of Bone and Mineral Research 1998;**13**:393-399
- De Waal Malefyt, R., Abrams, J., Bennet, B., et al.
Interleukin-10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes.
Journal of Experimental Medicine 1991;**174**:1209-1211.
- Duncan R.L., and Turner C.H.
Mechanotransduction and the functional response of bone to mechanical strain.
Calcified Tissue International. 1995 ;**57** :344-358
- El-Haj A., Minter S., Rawlinson S., et al.
Cellular responses to mechanical loading in Vitro.
Journal of Bone and Mineral Research 1990; **5**:923-932
- Friedenstein A.
Precursor cells of mechanocytes.
International Review of Cytology 1976;**47**:327-355
- Frost H M.
Bone remodelling dynamics
Charles C Thomas, Springfield, Illinois 1963
- García-López, S.
The effects of mechanical stress on cytokine production by human osteoblasts-like cells in vitro.
Master of Science in Orthodontics Thesis, University of London. 1995
- García-López, S., Lee, B.P., Meikle, M.C. et al.
Cytokine production by human osteoblasts mechanically deformed on flexible dishes.
Bone and Tooth Society.1995; **44**:55
- García-López S., Villanueva R.E., Bustos J., et al.
An in vitro model to study bone turnover with mechanical stimuli.
International Dental Journal. 1999;**49**: 285
- García-López S. and Villanueva R.
Comparison of two types of human osteoblasts under cyclic strain in vitro
European Journal of Orthodontics. 1999;**21**:587-588
- García-López S., Villanueva R., Bojalil R., et al
Determinación de la producción de Interleucina-1 β al estímulo mecánico en osteoblastos humanos cultivados in-vitro.
Revista de la Asociación Dental Mexicana 2003 **3**: 85-89

- García-López S., Meikle, M.C., Villanueva R., et al.
 Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by Mouse calvarial osteoblasts *in-vitro*.
Archives of Oral Biology. 2005;4:449-452
- Göthlin G., Ericsson J.
 The osteoclast: a review of ultra structure, origin and structure-function relationship.
Clinical Orthopaedics 1976;120:201-233.
- Gowen, M., Meikle, M.C., and Reynolds, J.J.
 Stimulation of bone resorption *in vitro* by a nonprostanoid factor released by human monocytes in culture.
Biochemistry et Biophysica Acta. 1983;762:471-474.
- Gowen, M., Wood, D.D., Ihrie, E.J., et al.
 An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption *in vitro*.
Nature. 1983;306:378-380.
- Gowen, M., Wood, D.D., and Ihrie, E.J.
 Stimulation by human interleukin-1 of cartilage breakdown and production of collagenase and proteoglycanase by human chondrocytes but not by human osteoblast *in vitro*.
Biochemistry et Biophysica Acta. 1984;797:186-193.
- Gowen, M., and Mundy, G.R.
 Actions of recombinant interleukin 1, Interleukin 2 and interferon gamma on bone resorption *in vitro*.
Immunology. 1986;136:2478-2482.
- Harell, A. Dekel, and S. Biderman, I.
 Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells.
Calcified Tissue Research. (Suppl), 1977 22:202-207.
- Hasegawa, S., Sato, S., Saito, S., et al.
 Mechanical Stretching increase the number of cultured bone cells synthesising DNA alters their pattern of protein synthesis.
Calcified Tissue International.1985 37:431-436.
- Hattersley G., Dorey E., Horton M et al.
 Human macrophage colony-stimulating factor inhibits bone resorption by osteoclasts disaggregated from rat bone.
Journal of Cell Physiology 1998 137:199-203
- Heath, J.K., Sellers, A., Meikle, M.C., et al.
 Alterations in collagenase and collagenase inhibitor (TIMP) production by bone explants from osteopetrotic (Grey-lethal) mice, heterogenous littermates and normal mice, cultured with and without vitamin A.
Journal of Dental Research.1982 61:544 Abstract.
- Heath J. K., Atkinson S.J., Meikle M.C et al
 Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents.
Biochimistry and Biophysic Acta 1984;802:151-154
- Heath, J.K., Saklatvala, J., Meikle, M.C., et al.
 Pig interleukin-1 (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption *in vitro*.
Calcified Tissue International. 1985 37:95-97.

- Hert, J., Liskova, M. and Landa, J.
Reaction of bone to mechanical stimuli.
Folia Morphologica. 1971**19**:290-300.
- Heyman D. and Russelle A.
Gp130 cytokine family and bone cells
Cytokine 2000 **12**:1455-1468
- Hock J., Hummert J., Boyce R., et al.
Resorption is not essential for the stimulation of bone growth by hPTH-(1-32) in rats in vivo.
Journal of Bone and Mineral Research 1989 **4**:449-458
- Horwood, N.J., Elliott, J., Martin, T.J., et al.
IL-12 alone and in Synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation *in vitro*.
Journal of Immunology 2001**166**:4915-4921.
- Huiskes R., Ruimerman R., van Kenhe et al.,
Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone.
Nature 2000 **405**:704-706
- Ishimi, Y., Miyaura, C., Jin, C.H., et al.
IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.
Journal of Immunology. 1990 **145**:3297-3303.
- Kember N .
Cell division in endochondral ossification. A study of cell proliferation in rat bones by the method of tritiated thymidine autoradiography.
Journal of Bone and Joint Surgery 1960 824-839
- Kitaura, H., Nagata, N., Fujimura, Y., et al.
Effect of IL-12 on TNF α mediated osteoclast formation in bone marrow cells: apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction.
Journal of Immunology 2002 **169**:4732-4738
- Kobayashi K., Takashi N., Jimi E., et al.
Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction.
Journal of Experimental Medicine 2000 **191**:275-286.
- Komori T., Yagi H., Nomura S., et al.
Targeted disruption of Cbfa-1 results in a complete lack of bone formation owing to maturational arrest of osteoblasts.
Cell 1997 **89**:755-764
- Köning A., Muhlbauer R., and Fleisch H.
Tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 stimulate bone resorption in vivo as measured by urinary (3H) tetracycline excretion from prelabeled mice.
Journal of Bone and Mineral Research. 1998 **3**:621-627
- Kotake S., Sato K., Kim K., Takahashi N et al.
Interleukin 6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation.
Journal of Bone and Mineral Research 1996 **11**:88-95
- Kumegawa, M., Ishizuka, S., Sumitana, K., et al.

- Existence of 1,25 dihydroxivitaminD₃ receptor and parathyroid hormone binding sites on osteoclast precursors.
Calcified Tissue International 1991 **46**:S2-A22
- Kurokouchi K., Kambe F., Yasukawa K., et al
U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells.
Journal of Biology and Chemistry 2001 **276**:563-568
- Kusumi A., Sakaki H., Kusumi T., et al
Regulation of synthesis of osteoprotegerin and soluble receptor activator of nuclear factor kB ligand in normal human osteoblasts via the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by the application of cyclic tensile strain.
Journal of Bone and Mineral Metabolism 2005 **23**:373-381
- Kwan S., Padrines M., Théoleyre S., et al
IL-6, RANK, TNF-alpha/IL-1: Interactions in bone resorption pathophysiology
Cytokine and Growth Factor Reviews 2004 **15**:49-60
- Lacey D., Timms E., Tan H., et al.
Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation
Cell 1998 **93**:165-176
- Lacraz S., Nicod R., Chricheportiches H., et al.
IL-10 inhibits metalloproteinase and stimulates TIMP-1 production in human mononuclear phagocytes.
Journal of Clinical Investigation 1995 **96**:2304
- Lanyon, L.E., and Hartman, W.
Strain related electrical potentials recorded *in vitro* and *in vivo*.
Calcified Tissue Research. 1976 **22**:315-327.
- Lanyon L., and Baggott D.
Mechanical function as an influence on the structure and form of bone.
Journal of Bone and Joint Surgery 1976 **58B**:436-443.
- Meikle, M.C., Sharyn, B., Hembry, R.M., et al.
Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines.
Journal of Cell Science. 1992 **103**:1093-1099.
- Meikle M.C.
Craniofacial Development, Growth and Evolution
Bateson Publishing, Bressingham, Norfolk, England 2002.
- McSheehy, P.M.J., and Chambers, T.J.
Osteoblast-like cells in the presence of PTH release a soluble factor that stimulates osteoclastic bone resorption.
Endocrinology. 1986 **119**:1654-1659.
- Moore, K. W., O'Garra, A., de Waal Malefyt, R., et al.
Interleukin-10
Annals of Review in Immunology 1993 **11**: 165-169.
- Müller, D., Quantin, B., Gesnel, M.C., et al.
Collagenase gene family in humans consist of at least four members.
Biochemical Journal. 1988 **253**:187-192.
- Murphy, G., Hembry, R.M., McGarrity, A.M., et al.

- Gelatinase (type IV collagenase) immunolocalization in cells and tissues: use of an antiserum that identifies high and low forms.
Journal of Cell Science. 1989 **92**:487-495.
- Murphy, G., Houbrechts, A., Cocket, M.I., et al.
The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity.
Biochemistry. 1991 **30**:8097-8102.
- Nagata, N., Kitaura, H., Yoshida, N., et al.
Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN- γ possibly induced from non-T cell population
Bone 2003 **4**:721-732
- Nanes M.S.
Tumor necrosis factor- α : molecular and cellular mechanisms in skeletal pathology.
Gene 2003; **321**:1-15
- O'Garra, A.
Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets.
Immunity 1998 **8**:275-281
- Ogawa E., Maruyama M., Kagoshima H., et al.
PEBP2/PEA2 represents a family of transcription factor homologous to the products of the Drosophila runt gene and human AML1 gene.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1993 **90**:6859-6863
- Otto F., Thornell A., Crompton T. et al.
Cbfa1, a candidate gene for cleidocranial dysplasia syndrome is essential for osteoblast differentiation and bone formation
Cell 1997 **89**:765-771
- Owan I., Burr D., Turner C., Qiu J., et al.
Mechanotransduction in bone: osteoblast are more responsive to fluid forces than mechanical strain.
Journal of Cell Biology 1997 **345**:234-238
- Owen M .
Marrow stromal stem cells.
Journal of Cell Science 1988 **10**:63-76
- Owen J., Gallagher A., Chambers T.
IL-10 modulates formations of osteoclasts in murine hemopoietic cultures.
Journal of Immunology. 1996 **157**:936-940.
- Pavloff, N., Staskus, P.W., Kishnani, N.S., et al.
A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family.
Journal of Biological Chemistry. 1992 **267**: 17321-17326.
- Pead M., Skerry T., Lanyon L.
Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading.
Journal of Bone and Mineral Research 1988 **3**:647-656

- Rodan, G. A., Bournet, L.A., Harvey, A., et al.
Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodelling.
Science.1975 **189**:467-471.
- Rubin J., Murphy T., Nanes M.S. et al.
Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stroma cells.
American Journal of Physiology and Cell Physiology 2000;278:C1126-1132
- Ruoslathi E., and Yamaguchi T.
Proteoglycans as modulators of growth factor activity.
Cell 1991 **64**:867-869.
- Sandy, J.R., Meghji, S., Farndale, R.W., et al.
Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphate in response to mechanical deformation of murine osteoblasts.
Biochemica et Biophysica Acta.1989 **1010**:265-269.
- Sellers, A., Reynolds, J.J., and Meikle, M.C.
Neutral metalloproteinases of rabbit bone. Separation in latent forms of distinct enzymes that when activated degrade collagen, gelatine and proteoglycans.
Biochemistry Journal.1978 **171**:493-496
- Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C.J., et al.
Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenase are elastases.
Journal of Biological Chemistry.1990 **266**:7870-7875.
- Skerry, T.M., Bitensky, L., Chayen, J., et al.
Early strain related changes in enzyme activity in osteocytes following loading *in vivo*.
Journal of Bone and Mineral Research. 1989 **4**:783-788
- Sugiura R., Kita A., Shimizu et al.
Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein.
Nature 2004 **429**:961-965.
- Thompson B., Mundy G., and Chambers T.
Tumor necrosis factors alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclastic bone resorption.
Journal of Immunology. 1987 **38**: 775-779
- Thompon –Snipes, L., Dhar, V, Bond, M.V., et al.
Interleukin-10: a novel B cell stimulatory factor for mast cells and their progenitors.
Journal of Experimental Medicine 1991 **173**: 507-510.
- Undawa , N., Horwood, N.J., Elliott J., et al.
Interleukin-18 (interferon- γ -inducing factor) is produced by osteoblasts and acts via granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and not via interferon- γ to inhibit osteoclast formation.
Journal of Experimental Medicine 1997 **185**:1005-1009
- Van der Plas A., Aarden E., Fayen J. et al.
Characterization and properties of osteocytes in culture.
Journal of Bone and Mineral Research 1994 **9**:1697-1704
- Van Vlasselaer, P., Borremans, U., van Gorp, J., et al.
Interleukin-10 inhibits the osteogenic activity of mouse bone marrow.

- Blood* 1993 **82**:2361-2369
- Vico L., Hinsenkamp M., Jones M. et al.,
Osteobiology, strain, and microgravity. Part II: studies at the tissue level.
Calcified Tissue International 2001 **68**:1-10
- Von Meyer H.
Die architektur der spongiosa
Archives of Anatomy and Physiology 1867 **47**:615-28
- Walker D.
Bone resorption restored in osteopetrotic mice by transplants of normal bone marrow and spleen cells.
Science 1972 **190**:784-785
- Wang E., Rosen V., Cordes P. et al.
Purification and characterization of the other distinct bone-inducing factors.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 1998 **85**:9484-9488.
- Wang N., Butler J., Ingber D.
Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton
Science 1993 **260**:1124-1127
- Wölff, J.
Das gesetz der transformation der Knochen.
Berlin:Hirschwald 1892
- Xu L., Kukita T., Kukita A., et al.
Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system.
Journal of Cellular physiology 1995 **165**: 624-629.
- Yssel, H., De Wall Malefyt, R., Roncarolo, M.G., et al.
IL-10 is produced by subsets of human CD 4+ T cell clones and peripheral blood T cells.
Journal of Immunology 1992 **7**:2378-2384.
- Yasuda H., Shima N., Nakagawa N. , et al.
Identify of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by Vich OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro.
Endocrinology 1998 **139**:1329-1337
- Yasuda H., Shima N., Nakafawa N et al.
Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and its identical to TRANCE/RANKL.
Proc Natl Acad Sci USA 1998 **95**:3597-3600
- Young R
Cell proliferation and specialization during endochondral osteogénesis in young rats.
Journal of Cell Biology 1962 **14**:357-370
- Zou W., Halkim I., Tschoep K., et al.,
Tumor necrosis factor-alpha mediates RANK ligand stimulation of osteoclast differentiation by an autocrine mechanism.
Journal of Cell Biochemistry. 2001 **83**:70-83

Anexo 1

Ensayo para determinación de la Interleucina 10 murina.

Una micro placa con anticuerpos monoclonales específicos para IL-10 previamente ya cubierta en los pozos (Quantikine, R & D Systems), se les adicionó 200 µl. de medio del grupo control y del grupo experimental en cada pozo. Los promedios fueron obtenidos por disoluciones seriadas de IL-10 en disoluciones conocidas para producir concentraciones de 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 y 0 pg/ml de cada una en duplicado.

Muestras controles y experimentales fueron diluidas a la 1:5 y 1:10 y ensayadas en duplicado. Después de incubar durante dos horas a 37°C, las muestras fueron lavadas 3 veces con solución buffer (400 µl Solución salina buffer de fosfato PBS) utilizando una máquina de aspiración (Labsystems).

200 µl de conjugado fueron adicionados e incubados con una nueva tira suministrada en el Kit de ELISA a temperatura ambiente por mas de una hora, posteriormente fue lavada la micro placa como se menciona anteriormente. 200 µl de solución de sustrato fue agregado a cada pozo a un intervalo de 5 segundos e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Se adiciono 50 ml de solución de H₂SO₄ para detener la reacción, se midio la absorbancia a 540 nm usando un equipo de espectrofotometría (Labsystems). Una curva logarítmica promedio fue dibujada utilizando una computadora y el programa software Genesys (Labsystems) y así se determinó la concentración de la IL-10 en las muestras de cultivo.

Ensayo para determinación de Interleucina 12 murina

Una micro placa con anticuerpos monoclonales específicos para IL-12 previamente ya cubierta en los pozos (Quantikine, R & D Systems), se les adicionó 200 µl. de medio del grupo control y del grupo experimental en cada pozo. Los promedios fueron obtenidos por disoluciones seriadas de IL-12 en disoluciones conocidas para producir concentraciones de 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 y 0 pg/ml de cada una en duplicado.

Muestras controles y experimentales fueron diluidas a la 1:5 y 1:10 y ensayadas en duplicado. Después de incubar durante dos horas a 37°C, las muestras fueron lavadas 3 veces con solución buffer (400ml Solución salina buffer de fosfato PBS) utilizando una máquina de aspiración (Labsystems).

200 µl de conjugado fueron adicionados e incubados con una nueva tira suministrada en el Kit de ELISA a temperatura ambiente por mas de una hora, posteriormente fue lavada la micro placa como se menciona anteriormente. 200 µl de solución de sustrato fue agregado a cada pozo a un intervalo de 5 segundos e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Se adiciono 50 µl de solución de H₂SO₄ para detener la reacción, se midio la absorbancia a 540 nm usando un equipo de espectrofotometría (Labsystems). Una curva logarítmica promedio fue dibujada utilizando una computadora y el programa software Genesys (Labsystems) y así se determinó la concentración de la IL-12 en las muestras de cultivo.



Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts in vitro

S. García-López^{a,b,c,*}, M.C. Meikle^d, R.E. Villanueva^a, L. Montañó^e,
F. Massó^b, V. Ramírez-Amador^a, R. Bojalil^{a,b}

^aHealth Science Department/ Building H-104, Universidad Autónoma Metropolitana, Calzada del Hueso 1100, Villa Quietud 04960 Mexico City, Mexico

^bDepartments of Cell Biology and Immunology, National Institute of Cardiology "Ignacio Chavez", Mexico City, Mexico

^cGeneral Hospital "Manuel Gea Gonzalez", Mexico City, Mexico

^dDepartment of Oral Sciences, Faculty of Dentistry, University of Otago, Dunedin, New Zealand

^eDepartment of Immunology and Biochemistry, Faculty of Medicine, U.N.A.M. Mexico City, Mexico

Accepted 15 September 2004

KEYWORDS

Mechanical stress;
Interleukin-10;
Interleukin-12;
Osteoblasts;
Bone remodelling

Summary The skeleton is continuously remodelled throughout life, a process that is orchestrated by cells of the osteoblast lineage. Remodelling involves a complex network of cell–cell signalling involving systemic hormones, locally produced cytokines, growth factors and the mechanical environment of the cells. Here, we report on the effect of mechanically-induced strain on the synthesis by mouse calvarial osteoblasts in monolayer culture of IL-10 and IL-12, two cytokines that inhibit osteoclast formation in bone marrow cultures; IL-10 also suppresses osteoblast differentiation suggesting a role for both cytokines in bone physiology. A site strain was applied to the cells intermittently for 6 s, every 90 s, for 2–96 h. After 2 h culture, supernatants from deformed cells contained significantly less IL-10 than control cultures. In contrast, mechanical deformation had a stimulatory effect on IL-12 synthesis; however, by 48 h both had returned to control levels. These data suggest that IL-10 and IL-12 can be added to the growing list of mechanical stress-responsive genes. The down-regulation of IL-10 and stimulation of IL-12 further suggests that the initial response of the cells to mechanical deformation was an osteogenic one.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

The importance of mechanical stimuli in the structure and maintenance of skeletal tissues has been recognized since the middle of the 19th century,

* Corresponding author. Tel.: +52 5 5659 32 39/52 5 5659 47 25; fax: +52 5 5483 75 65.

E-mail address: salgarlop@hotmail.com (S. García-López).

most famously by von Meyer¹ and Wölff.² The skeleton is continuously remodelled throughout life by the resorption of old bone by osteoclasts and the subsequent formation of new bone by osteoblasts. Bone resorption and bone formation are, therefore, said to be coupled, a process of renewing the skeleton while maintaining its structural integrity.³ Remodelling is orchestrated by cells of the osteoblast lineage and involves a complex interplay between bone cells, systemic hormones, locally produced cytokines, growth factors sequestered within the matrix and the mechanical environment of the cells. Systemic hormones and mechanical stimuli influence the process via their ability to control the synthesis and/or action of cytokines. The first cytokine shown to play a role in bone turnover was interleukin-1 (IL-1),^{4,5} followed not long afterwards by the tumour necrosis factors,⁶ and subsequent studies have implicated numerous others.

IL-10 was originally described as a cytokine synthesis inhibiting factor (CSIF) produced by T cells,⁷ but is now known to be produced by a wide variety of cell types including osteoblasts. IL-10 suppresses osteoblast differentiation in murine bone marrow cultures by inhibiting the expression of alkaline phosphatase, type I collagen and osteocalcin genes,⁸ actions mediated by inhibition of transforming growth factor- β 1 production.⁹ It also selectively blocks osteoclastogenesis by inhibiting the differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclasts,^{10,11} through a tyrosine phosphate signalling pathway, which appears to be IL-10 specific.¹² IL-12 was identified as natural killer cell stimulatory factor (NKSF) synthesized by macrophages and B cells with multiple effects on lymphocytes,¹³ including the stimulation of interferon- γ (IFN- γ) production by T cells and NK cells. IL-12 has also been shown to be an inhibitor of osteoclastogenesis in bone marrow cultures.^{14,15}

Material and methods

Calvarial osteoblasts were prepared and characterized by a modification of the method previously described by Heath et al.¹⁶ Neonatal mouse calvaria from BALB/c mice were dissected free from adherent soft tissue, washed in Ca²⁺- and Mg²⁺-free Tyrode's solution (10 min) and sequentially digested with 1 mg/ml trypsin (for 20 and 40 min). Cells from these digests were discarded, the bones washed in phosphate buffered saline (PBS) and cut into pieces for a third trypsin digest (20 min). The cells released from this digest were washed in PBS, centrifuged at 1000 rpm for 5 min

and the pelleted cells resuspended in 1:1 F12/Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM) supplemented with 20% foetal calf serum (Gibco), 100 units/ml penicillin and 100 μ g/ml streptomycin, then seeded into 75-cm flasks (3.75×10^5 cells/flask), and grown at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂/95% air. After the cells had reached confluence (20–25 days), adherent cells were detached with trypsin-EDTA (0.25%; Sigma), resuspended in F12/DMEM and plated at an initial cell density of 10^6 cells/dish into 3.5 cm Petriperm dishes (In Vitro Systems & Services GmbH, Germany) These have flexible bases and are preferred to conventional Petri dishes, which have a tendency to fracture. The cells were identified as osteoblasts by morphological criteria and the fact that more than 95% stained strongly for alkaline phosphatase. We used 10 experimental and 10 control dishes containing 20 ml of F12/DMEM medium; 0.5 ml of medium was sampled at each point in the time scale and no fresh medium was added to the cultures. The method used to mechanically deform the cells was based on the Baner et al.¹⁷ model. A convex distortion providing a tensile strain to the cells was applied intermittently for 6 s, every 90 s for 2, 8, 16, 24, 48, 72 and 96 h. Following sampling, the culture supernatants were supplemented with 1 μ g/ml protease inhibitor cocktail (Sigma P1860), stored at -70 °C and assayed 2 days later for IL-10 and IL-12 by enzyme linked immunosorbent assays (ELISAs; Pharmagen). Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (S.E.M.). Differences between experimental and control cultures were analysed by the Student's *t*-test (unpaired).

Results

Mouse osteoblasts were found to constitutively synthesize IL-10, although there was a progressive decline in the levels produced over the time-course of the experiments, which by 96 h had reached base levels (Fig. 1A). After 2 h intermittent mechanical stress, culture supernatants from deformed cells contained significantly less IL-10 (133.6 ± 9.5 pg/ml), than control cultures (236.1 ± 15.0 pg/ml). By 72 h, this inhibitory effect had disappeared (Fig. 1B). Mouse osteoblasts also constitutively produced IL-12, which in contrast to the decline in control IL-10 levels was effectively maintained through the 96-h culture period (Fig. 2A). Mechanical deformation, however, had a stimulatory effect on IL-12 synthesis (2823 ± 51.06 pg/ml) compared to controls (1327 ± 125.0 pg/ml) at 2 h, which also was evident at 8, 16 and 24 h (Fig. 2B).

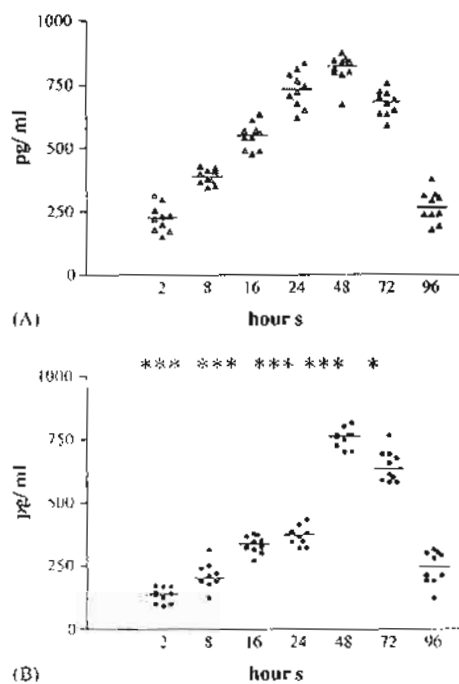


Figure 1 IL-10 production by mouse calvarial osteoblasts. (A) Control cultures; and (B) mechanically deformed cultures. Osteoblasts in monolayer culture were subjected to a tensile strain for 6 s every 90 s for 2–96 h. At the end of the culture period, media were assayed for IL-10 by an ELISA. Results are expressed as mean \pm S.E.M. for 10 cultures. (***) IL-10 levels in deformed cultures significantly less than controls ($p < 0.001$). (*) $p < 0.1$.

Discussion

These data suggest that IL-10 and IL-12 can be added to the growing list of mechanical stress-responsive genes. Since bone remodelling occurs at discrete sites throughout the skeleton without changing its geometrical form (for review see Ref. ¹⁸), osteoblast-derived cytokines are ideally placed to regulate or modify the action of other cell types in bone. The finding that IL-10 synthesis was down-regulated and IL-12 synthesis stimulated, suggests that the initial response of the cells to deformation was an osteogenic one. There are abundant *in vivo* evidences in support of this interpretation dating back to the classical series of experiments by Hert, Lanyon and co-workers.^{19,20} *In vivo* experiments have further shown that there is a rapid osteogenic response of bone to external loading,^{21,22} due to reactivation of quiescent bone-lining cells, which is not dependent on a preceding phase of bone resorption.²³ Parathyroid hormone has also been shown to induce bone formation without a preceding phase of bone resorption.²⁴ Although bone formation and resorption are commonly regarded as being coupled

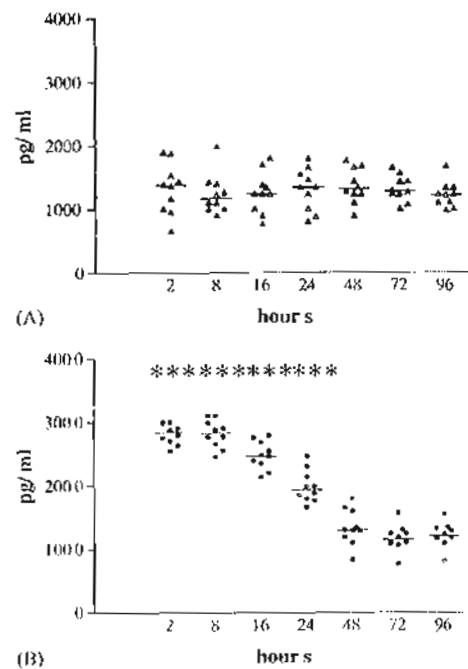


Figure 2 IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts. (A) Control cultures; and (B) mechanically deformed cultures. Osteoblasts in monolayer culture were subjected to a tensile strain for 6 s, every 90 s for 2–96 h. At the end of the culture period, media were assayed for IL-12 by an ELISA. Results are expressed as mean \pm S.E.M. for 10 cultures. (***) IL-12 levels in deformed cultures significantly greater than controls ($p < 0.001$).

during remodelling, accumulating evidence suggests that a preliminary phase of resorption is not an essential precondition for osteogenesis.

Two cell surface proteins receptor activator of nuclear factor κ B (RANK) and its ligand RANKL are key regulators of osteoclast formation and function. Cell–cell signalling by RANKL, which is expressed by osteoblasts/stromal cells in bone is essential for the induction of osteoclast differentiation,²⁵ and cytokines such as IL-1, TNF- α and IL-6 stimulate bone resorption by their ability to up-regulate RANKL expression. Rubin et al.²⁶ have shown that a tensile mechanical strain (2% at 10 cycles/min) applied to bone marrow stromal cells decreases RANKL mRNA levels by 60%. IL-12 has also been shown to inhibit RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cultures, an effect that was mediated by IFN- γ .¹⁵ These data suggest that mechanical stimuli influence bone remodelling via a complex feedback mechanism involving the regulation of osteotropic cytokines such as IL-10 and IL-12 by cells of the osteoblast lineage. These in turn act in an auto-crine/paracrine manner for regulating the synthesis of other cytokines and growth factors involved in the

differentiation and function of osteoblasts and osteoclasts.

Acknowledgements

Mrs. Eva Hilda Gonzalez López, Chairman of the Clinical Chemistry Department at the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez" for the alkaline phosphatase assays. Thanks to Ricardo Márquez and Rashidi Springall from the Immunology Department at the National Institute of Cardiology "Ignacio Chávez" Mexico City. To the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología. Reg. No.83732.

References

1. von Meyer H. Die architektur der spongiosa. *Archiv Anat Physiol* 1867;47:615–28.
2. Wölff JD. Das gesetz der transformation der knochen. Verlag von August hirschwald, unter der linden 68, Berlin, 1892.
3. Frost HM. *Bone remodelling dynamics*. Springfield, Illinois: Charles C Thomas; 1963.
4. Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Stimulation of bone resorption in vitro by a non-prostanoid factor released by human monocytes in culture. *Biochim Biophys Acta* 1983;762:471–4.
5. Heath JK, Saklatvala J, Meikle MC, Atkinson SJ, Reynolds JJ. Pig interleukin 1 (catabolin) is a potent stimulator of bone resorption in vitro. *Calcif Tissue Int* 1985;37:95–7.
6. Bertolini DR, Nedwin GE, Bringham TS, Smith DD, Mundy GR. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factors. *Nature* 1986;319:516–8.
7. Fiorentino DF, Zlotnik A, Timothy PV, et al. Two types of mouse T helper cell. IV: Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170:2081–95.
8. Van Vlasselaer P, Borremans B, Van Den Heuvel R, Van Gorp U, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 inhibits the osteogenic activity of mouse bone marrow. *Blood* 1993;82:2361–70.
9. Van Vlasselaer P, Borremans B, Van Gorp U, Dasch JR, de Waal Malefyt R. Interleukin-10 inhibits transforming growth factor- β (TGF- β) synthesis required for osteogenic commitment of mouse bone marrow cells. *J Cell Biol* 1994;124:569–72.
10. Xu LX, Kukita T, Kukita A, Otsuka T, Niho Y, Ijima T. Interleukin-10 selectively inhibits osteoclastogenesis by inhibiting differentiation of osteoclast progenitors into preosteoclast-like cells in rat bone marrow culture system. *J Cell Physiol* 1995;165:624–9.
11. Owens JM, Gallagher AC, Chambers TJ. IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures. *J Immunol* 1996;157:936–40.
12. Hong M, Williams H, Jin C, Pike W. The inhibitory effect of interleukin-10 on mouse osteoclast formation involves novel tyrosine-phosphorylated proteins. *J Bone Miner Res* 2000;15:911–8.
13. Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, et al. Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biological effects on human lymphocytes. *J Exp Med* 1989;170:827–45.
14. Horwood NJ, Elliot J, Martin TJ, Gillespie MT. IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro. *J Immunol* 2001;166:4915–21.
15. Nagata N, Kitaura H, Yoshida N, Nakayama K. Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cultures by IL-12: involvement of IFN- γ possibly induced from non-T cell populations. *Bone* 2003;33:721–32.
16. Heath JK, Atkinson SJ, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta* 1984;802:151–4.
17. Banes AJ, Gilbert J, Taylor D, Monbureau O. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells in vitro. *J Cell Sci* 1985;75:35–42.
18. Meikle MC. The biology of skeletal tissues. *Craniofacial development growth and evolution*. Bressingham, Norfolk: Bate-son Publishing; 2002 p. 77–124.
19. Hért J, Lišková M, Landa J. Reaction of bone to mechanical stimuli: Part 1. Continuous and intermittent loading of tibia in rabbit. *Folia Morphol Praha* 1971;19:290–300.
20. Lanyon LE, Baggott DG. Mechanical function as an influence on the structure and form of bone. *J Bone Joint Surg* 1976;58B:436–43.
21. Pead MJ, Skerry TM, Lanyon LE. Direct transformation from quiescence to bone formation in the adult periosteum following a single brief period of bone loading. *J Bone Miner Res* 1988;3:647–56.
22. Chambers TJ, Evans M, Gardner TN, Turner-Smith A, Chow JWM. Induction of bone formation in rat tail vertebrae by mechanical loading. *Bone Miner* 1993;20:167–75.
23. Chow JWM, Wilson AJ, Chambers TJ, Fox SW. Mechanical loading stimulates bone formation by reactivation of bone lining cells in 13-week-old rats. *J Bone Miner Res* 1998;13:1760–7.
24. Hock JM, Hummert JR, Boyce R, Fonseca J, Raisz LG. Resorption is not essential for the stimulation of bone growth by hPTH-(1-32) in rats in vivo. *J Bone Miner Res* 1989;4:449–58.
25. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:3597–600.
26. Rubin J, Murphy T, Nanes MS, Fan X. Mechanical strain inhibits expression of osteoclast differentiation factor by murine stromal cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C1126–32.

ASPECTOS MOLECULARES Y CELULARES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA DURANTE EL MOVIMIENTO ORTODÓNCICO.

Salvador García López C.D., M.Sc., M.Orth. FRCSEd.* ** ***

Rosina I. Villanueva C.D., M.Sc.*

Rafael Bojalil Parra M.C., D en C.* **

Luis Felipe Montaña M.C., D. en C.**

Luis Felipe Massó M.C., D en C.**

Vella Ramírez Amador C.D. M.Sc. Ph.D.*

RESUMEN

La estimulación mecánica ha sido reconocida como un factor importante en la remodelación ósea, especialmente durante la erupción de los dientes, en la corrección de las maloclusiones durante el movimiento ortodóncico y de alguna manera en la pérdida ósea durante la enfermedad periodontal. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares no han sido muy bien entendidos. Para evaluar los procesos bioquímicos y conocer la señalización del mecanismo de transducción celular se han desarrollado diferentes métodos en donde se aplican fuerzas mecánicas a células o tejidos, ya sea in vivo o in vitro. Actualmente, se sabe que el comportamiento de todas las células es modulado por sistemas de señalización interna los cuales se dan por una vasta serie de estímulos externos, como son las fuerzas mecánicas, hacia un rango reducido de señales internas o segundos mensajeros. El adenosin monofosfato cíclico (cAMP) fue uno de los primeros segundos mensajeros asociados con las fuerzas mecánicas, así como el inositol fosfato (IP) entre otros. Mediadores bioquímicos como las prostaglandinas (PGs), citocinas (Interleucina-1 β , IL-1) factores de crecimiento (TGF- β) y la participación de las metaloproteinasas (MMPs) son poderosos mediadores de la remodelación ósea durante el tratamiento ortodóncico y ortopédico.

INTRODUCCIÓN

El mecanismo celular y molecular por el cual los dientes se desplazan a través del hueso todavía no ha sido totalmente determinada, si bien la investigación en animales y humanos ha sido muy amplia. La histología ha sido la principal herramienta para conocer la respuesta de los tejidos involucrados ya que estos cambios han sido bien documentados^{1,2} sin embargo, los mecanismos celulares involucrados en la transducción de fuerzas mecánicas a eventos moleculares no han sido completamente estudiados.

Durante el tratamiento ortodóncico el hueso requiere no sólo de la remodelación del ligamento periodontal, sino también de la remodelación constante del proceso alveolar para permitir el movimiento dentario. El hueso es un tejido conectivo totalmente organizado, el cual es continuamente reconstruido por una secuencia coordinada de eventos mediados por células que involucran un periodo inicial de resorción osteoclástica, seguida por una reparación con hueso nuevo deposita-

do por el osteoblasto, a este proceso se le conoce como "remodelación" y que se da en intervalos moderados tanto del hueso trabecular como del hueso cortical. El propósito de este artículo es aplicar algunos eventos moleculares y celulares que acontecen durante la remodelación ósea por el movimiento ortodóncico.

ANTECEDENTES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA POR LA PRESIÓN MECÁNICA.

Desde hace varios años se reconoce que el crecimiento del hueso puede ser modificado por fuerzas externas. En el pasado varias civilizaciones practicaban ciertas deformaciones en las estructuras óseas como los indígenas Mesoamericanos que colocaban tablones sobre la cabeza³ o en China donde se utilizaba la reducción del tamaño del pie⁴. Sin embargo fue hasta 1892 cuando el científico alemán Wolf⁵ dio la primera explicación científica y quien demostró que la forma y estructura del esqueleto está influenciada por las fuerzas mecánicas externas a la cual está sujeta.

La forma del hueso y su influencia externa por medio del peso fisiológico ha sido muy estudiado y para evaluar este efecto se han desarrollado varias teorías dentro de las cuales podemos mencionar las siguientes:

* Universidad Autónoma Metropolitana - sgarcia@cueyaft.uam.mx

** Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

*** Hospital General "Dr. Manuel Gea González" México DF

1) La estimulación mecánica afecta al osteoblasto directamente ya sea por:

- a) tensión ⁽¹⁷⁾
 - b) presión ⁽¹⁸⁾
- 2) La liberación de metabolitos ^(19, 20)

3) Las fuerzas mecánicas que afectan el tejido microvascular (11)

4) Control muscular o neurogénico ⁽¹²⁾.

El proceso de la remodelación ósea también puede ser mediado por factores generales como la hormona paratiroidea (PTH), el metabolismo de la vitamina D y la calcitonina ⁽¹³⁾, las citocinas como factores producidos localmente ^(14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23), las fuerzas mecánicas ⁽²⁴⁾, los factores de crecimiento ⁽²⁵⁾, los efectos eléctricos ^(26, 27) y ciertas prostaglandinas ⁽²⁸⁾.

Sin embargo, los mecanismos moleculares para la transducción de fuerzas mecánicas a eventos bioquímicos todavía no se han podido explicar. Estudios desarrollados en cultivos de osteoblastos han demostrado que es posible sintetizar y degradar colágeno ⁽²⁹⁾, producir metaloproteinasas (MMPs) ⁽³⁰⁾, movilizar calcio ⁽³¹⁾ y sintetizar Interleucina 1 como molécula ⁽³²⁾ en respuesta a la presión mecánica.

ANTECEDENTES MOLECULARES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA DURANTE EL TRATAMIENTO ORTODÓNICO.

Los primeros experimentos que desarrollaron una técnica en donde se aplica el peso externo a huesos in vivo sobre varios periodos de tiempo fueron desarrollados por Hert y colaboradores ^(33, 34). El modelo consistió en fijar alambres a la tibia de conejos que fueron transfijados con alambres kirschner a través de la piel y éstos estaban sujetos a un aparato que permitía la retracción o distracción del hueso al final de éstos. Estos estudios brindaron información fundamental como el tipo de duración y fuerzas mecánicas necesarias para estimular la remodelación. Los experimentos realizados por Lanyon y Hartman ⁽³⁵⁾ basados bajo el mismo principio permitieron desarrollar un procedimiento técnico más preciso ⁽³⁶⁾. Estos investigadores establecieron que la respuesta del hueso al peso funcional es de incrementar la masa esquelética y que se necesita una actividad física mínima para la homeostasis del hueso. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares nuevamente involucrados quedaron sin explicación.

A mediados de los años setentas varios investigado-

res desarrollaron modelos de sistemas in vitro, en los cuales la tensión mecánica pudo ser aplicada a células o tejidos en condiciones experimentales controladas ^(37, 38, 39, 40) y donde se observó que con la tensión mecánica hay una respuesta bioquímica y estructural en respuesta a las células deformadas. El comportamiento de todas las células es modulado por un sistema de señales intrínsecas, las cuales se traducen en una vasta serie de estímulos externos, como las hormonas o las fuerzas mecánicas, hacia un rango reducido de señalamientos internos o segundos mensajeros. Uno de los segundos mensajeros asociados con la transducción de las fuerzas mecánicas fue el adenosin 3'5' monofosfato cíclico (cAMP). También las alteraciones de niveles del cAMP fueron observadas en huesos largos cultivados in vitro y comprimidos mecánicamente ⁽⁴¹⁾, así como en el ligamento periodontal seguido del movimiento dentario en gatos ^(42, 43). En el modelo innovador de la caja petri modificada por Harell y colaboradores ⁽⁴⁴⁾, se pudo demostrar que las células óseas podían ser deformadas y se observaron una serie de eventos; siendo el primero la alteración de la fosfolipasa A2 seguida del desprendimiento del ácido araquidónico resultando en un incremento de la producción de las prostaglandinas (PG2) quien activa la adenil ciclasa; y el segundo en un incremento en calcio [Ca²⁺] y estimulación de la síntesis del ácido ribonucleico (ADN).

Los procesos bioquímicos intracelulares asociados con el movimiento dentario han sido ampliamente estudiados ^(45, 46) y donde el cAMP demostró tener un papel como segundo mensajero en las células del ligamento periodontal, dando como resultado una secuencia de procesos en los cuales culmina la resorción y la aposición ósea.

Los experimentos desarrollados in vitro en base a las prostaglandinas (PGs) indican que son potentes mediadores de la resorción ósea ⁽⁴⁷⁾ y las PGs de la serie E han demostrado tener una gran actividad en el hueso ⁽⁴⁸⁾. El grupo de Yamasaki ^(49, 44, 50) reportó el papel que juegan las PGs como mediadores bioquímicos en la resorción ósea inducida por el movimiento ortodóntico en ratones, durante este movimiento las PGs pueden obtenerse de diferentes fuentes, en particular de los fosfolípidos de cualquier membrana celular comprimida, incluyendo células óseas o vasos sanguíneos ⁽⁵¹⁾ Sandy y colaboradores ^(44, 48) demostraron que la deformación mecánica no solamente activa las células por la síntesis de las PGs y la acumulación del cAMP, sino que el señalamiento del fosfoinositol también es activado en osteoblastos murinos de cráneo seguidos de la deformación intermitente in vitro.

Con la presión mecánica no solamente se estimula la

Figura 1

Modelo Hipotético de la secuencia de eventos involucrados en la remodelación ósea durante el Movimiento ortodónico.

Maloclusión de un paciente con mordida cruzada unilateral y abierta anterior.



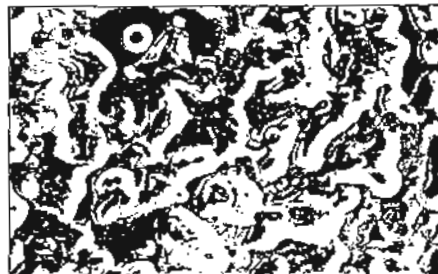
Paso 1

Estimulación mecánica del tejido óseo por medio de alambres de ortodoncia para la corrección de la posición dentaria, activación de fibroblastos, osteoblastos, osteoclastos, monocitos y linfocitos.



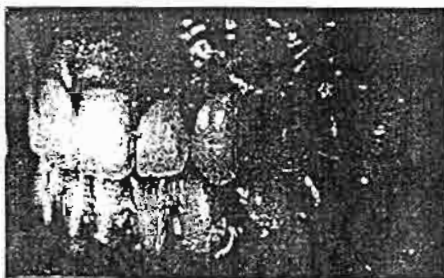
Paso 2

Liberación de prostaglandinas (PGE2), activación de segundos mensajeros (AMPc, Ca2+), liberación de citoquinas (IL-1?, IL-6, IL-11), factor transformante de crecimiento alfa (TGF?), Interferon gama, factor tumoral de necrosis (TNF), factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF) y activación de las metaloproteinasas (MMPs) entre otros.



Paso 3

La producción de citoquinas contribuyen a la proliferación, diferenciación y función de osteoblastos, osteoclastos, fibroblastos y otros tipos de células estimulando resorción y formación de hueso durante la corrección de la maloclusión.



síntesis del colágeno¹⁴⁹ sino también las enzimas responsables para su hidrólisis específica¹⁵⁰. Utilizando un modelo desarrollado para deformar mecánicamente articulaciones del cráneo in vitro, Meikle y colaboradores¹⁵¹ reportaron un incremento en la producción de la matriz de las metaloproteinasas (MMPs) colagenasa, gelatinasa y el estromelina con un incremento concomitante en su inhibidor específico de las metaloproteinasas (TIMP).

Finalmente, las citocinas que son un grupo grande y diverso de glicoproteínas biológicamente activas, pueden mediar interacciones autocrinas y paracrinas en varios tipos de células como linfocitos, monocitos, células epiteliales. Muchas de éstas citocinas son potentes mediadores del metabolismo y el osteoblasto produce diversos tipos de citocinas que están involucrados en una comunicación de célula con célula¹⁵². Está claro que muchas citocinas requieren al menos dos formas para controlar los procesos celulares en orden de inducir remodelación ósea y que son sensibles a factores locales (tensión mecánica) y generalizada (calcio regulado por hormonas), y se incluyen la Interleucina 1 (IL-1) factor tumoral de necrosis alfa (TNF- α), Interleucina-6 (IL-6) y factor estimulante de colonia (CSFs)^{153, 19, 20, 21, 22, 50}.

En la fase temprana del tratamiento de ortodondia se involucra una respuesta de inflamación aguda caracterizada por vasodilatación periodontal y migración de leucocitos fuera de los capilares¹⁵⁴. Las citocinas secretadas por estas células mononucleares pueden interactuar directamente con células óseas o indirectamente con células vecinas, tales como macrófagos y monocitos, linfocitos y fibroblastos a través de la producción de interleucinas, prostaglandinas o una variedad de factores de crecimiento.

Es esencial para la práctica clínica de la ortodondia el poder entender los mecanismos moleculares y celulares que causan que el hueso se remodele por las tensiones mecánicas, si bien; en el futuro el movimiento dentario podría ser inducido por factores de crecimiento producidos por los osteoblastos en vez de utilizar fuerzas mecánicas a través de la aparatología fija y removible que en la actualidad se utiliza.

CONCLUSIONES.

Por lo expuesto anteriormente se puede asumir que:

a) El osteoblasto es la célula que regula tanto la fase de formación y resorción en la remodelación ósea en respuesta al estímulo mecánico y hormonal

b) Las fuerzas mecánicas activan la fosfolipasa A2 seguida del desprendimiento del ácido araquidónico resultando en un incremento de la producción de las prostaglandinas, quienes activan el adenocin monofosfato cíclico (cAMP), además de un incremento en calcio intracelular llevando a la estimulación del ácido ribonucleico (ADN) del osteoblasto y por tanto activando diferentes interleucinas para lograr una respuesta celular.

c) Las citocinas (interleucinas), prostaglandinas, factores de crecimiento, interferones y otros factores secretados por el osteoblasto, macrófagos, monocitos, linfocitos y fibroblastos están involucradas en el proceso de remodelación ósea durante el tratamiento ortopédico y del movimiento ortodónico.

d) En un futuro el movimiento dentario podría ser inducido por factores de crecimiento producidos por los osteoblastos en vez de utilizar fuerzas mecánicas a través de la aparatología fija y removible que por el momento se sigue utilizando.

ABSTRACT

Mechanical stress has long been recognized as a factor of bone remodelling, particularly in the tooth eruption, the correction of malocclusions during orthodontic tooth movement and to some extent in the periodontal disease. Nevertheless, the cellular and molecular mechanisms involved remain poorly understood. Several methods have been developed to applied mechanical stress to cells or tissues in vitro or in vivo in order to assess the biochemical outcome and to know the signal cell transduction mechanism. Today, it is widely known that the behaviour of all cells is modulated by internal signalling systems, which translate a wide array of external stimuli such as mechanical forces into a narrow range of internal signals or seconds messengers. One of the earliest second messengers associated with mechanical force transduction was adenosin cyclic monophosphate (cAMP) and inositol phosphate (IP) among others. Biochemical mediators including the prostaglandins (PGs), cytokines (Interleukin-1 beta, Interleukin-6), growth factors (Transforming Growth Factor Beta) and the involvement of the matrix metalloproteinases (MMPs) are potent mediators of bone remodelling in the orthodontic and orthopaedic treatment.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1.- Reitan, K. (1951)
The initial tissue reaction incident to orthodontic tooth movement as related to the influence of function.
Acta Odontologica Scandinavica. 6:51-240.
- 2.- Reitan K (1967)
Clinical and histological observations on tooth movement during and after orthodontic treatment.
American Journal of Orthodontists. 53:721-745
- 3.- Storey E (1955)
Bone changes associated with tooth movement.
The Australian Journal of Dentistry. 59: 147-161, 209-219, 220-224
- 4.- Imbelloni J (1950)
Cephalic deformation of the Indians in Argentina.
Bureau of American Ethnology Bulletin 143.
Handbook of South American Indians Vol 6. 53-65.
- 5.- Veith I (1980)
The history of medicine dolls and foot binding in China.
Choi Medica 14: 255-267.
- 6.- Wolff, J (1892)
Das gesetz der transformation der Knochen.
Berlin Hirschwald.
- 7.- Frost H M (1964)
The laws of bone structure.
Thomas Springfield, Illinois.
- 8.- Currey J. D. (1968)
What should bones be designed to do?
Calcified Tissue International 36: 57-510
- 9.- Meikle, M.C., Reynolds, J.J., and Dingle, S.T. (1979)
Rabbit cranial sutures in vitro: A new experimental model for studying the response of fibrous joints to mechanical stress.
Calcified Tissue International. 28 137-144
- 10.- Meikle, M.C., Sellers, A., and Reynolds, J.J. (1980)
Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit coronal sutures in vitro
Calcified Tissue International 30:77-82
- 11.- Johnson M.W., Chakkalakal D.A., Harper R.A., Katz J.L., and Rouhana S.W. (1982)
Fluid flow in bone in vitro.
Journal of Biomechanics 15:881-885.
- 12.- Norton L.A., Hanley K.J., Turkewitz J (1984)
Bioelectric perturbations of bone. Research directions and clinical applications.
Angle Orthodontist 54: 73-87
- 13.- Aubauch G.D., Marx S.J. and Spiegel A.M. (1981)
Textbook of *Endocrinology*, p. 932-1031
W.B. Saunders Co., Philadelphia
- 14.- Gowen, M., Wood, D.D., Ihrie, E.J., Meats, J.E., and Russell, R.G. (1983a)
An interleukin 1 like factor stimulates bone resorption in vitro.
Nature. 306-378-380
- 15.- Gowen, M., Meikle, M.C., and Reynolds, J.J. (1983b)
Stimulation of bone resorption in vitro by a nonprostanoid factor released by human monocytes in culture.
Biochemistry et Biophysica Acta. 762:471-474.
- 16.- Meikle, M.C., Heath, J.K., Hembry, R.M., and Reynolds, J.J. (1982)
Rabbit cranial suture fibroblasts under tension express a different collagen phenotype.
Archives of Oral Biology. 27:609-613.
- 17.- García-López S. (1995a)
The effects of mechanical stress on cytokine production by human osteoblasts-like cells in vitro.
Master of Science in Orthodontics Thesis, University of London, 1995
- 18.- García-López S., Lee B., Meikle M.C., and McDonald F (1995b)
Cytokine production by human osteoblasts mechanically deformed on flexible petri dishes.
Bone and Tooth Society, Bristol, United Kingdom 40
- 19.- García-López S., Villanueva R.E. (1998)
Interleukin 1-b release by human osteoblast-like cells under mechanical stress in vitro.
American Association of Orthodontists (Abstract)
- 20.- García-López S., Villanueva R.E. (1999)
A molecular immunoassay of human osteoblast-like cells during mechanical stress in vitro.
American Association of Orthodontists. (Abstract)
- 21.- García-López S., Villanueva R.E., Bustos J., Hrijalil, R., Macotela-Díaz I., Cortés A. (1999)
An in vitro model to study bone turnover with mechanical stimuli.
International Dental Journal. 49: 285
- 22.- García-López and Villanueva R. (1999)
Comparison of two types of human osteoblasts under cyclic strain in vitro
European Journal of Orthodontics. 21 587-588
- 23.- García-López S., Villanueva R., Hrijalil R., Moráncho L., Ramírez V. (2000)
Evaluation of cytokine release in osteoblasts and fibroblasts: an in vitro study.
American Association of Orthodontists Book of abstracts. 268
- 24.- Meikle, M.C., Heath, J., and Reynolds, J.J. (1984)
Response of fibrous joint to tensile mechanical stress
American Journal of Orthodontics 85 141-153
- 25.- Raisz, L.G., Vanderhoek, J.Y., Simmons, H.A., Kream B.I. and Nicolaou, K.C. (1979)
Prostaglandin synthesis by foetal rat bone in vitro: evidence for a role of prostacyclin.
Prostaglandins. 17:905-914
- 26.- McDonald F (1993)
Electrical effects at the bone surface
European Journal of Orthodontics 15 175-183
- 27.- McDonald F., and Houston W.J.B. (1990)

- An in-vivo assessment of muscular activity and the importance of electrical phenomena in bone remodelling. *Journal of Anatomy* 172: 165-175
- 28.-McDonald F., and Houston W.J.B. (1992)
The effect of mechanical deformation on the distribution of potassium ions across the cell membrane of sutural cells. *Calcified Tissue International* 28: 137-143.
- 29.-Dietrich, J. W., Goodson, J.M., and Raisz, L.G. (1975)
Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins*. 10:231-236.
- 30.-Meikle, M.C., Atkinson, S.J., Ward, R.V., and Reynolds, J.J. (1989)
Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin-1: Evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *Journal of Periodontal Research*. 24:207-213.
- 31.-Meikle, M.C., McGarrity, A.M., Thompson, B.M., and Reynolds, J.J. (1991)
Bone-derived growth factors modulate collagenase and TIMP activity and type I collagen degradation by mouse calvarial osteoblasts. *Bone and Mineral*. 12:41-55.
- 32.-Rodan, G.A., Bourne, L.A., Harvey, A., and Menz, T. (1975a)
Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodelling. *Science*. 189:467-471
- 33.-Hert, J., Liskova, M., and Landrgot, B. (1969)
Influence of the long-term, continuous bending on the bone. An experimental study on the tibia of the rabbit. *Folia Morphologica*. 17:389-99.
- 34.-Hert, J., Liskova, M. and Landa, J. (1971)
Reaction of bone to mechanical stimuli. *Folia Morphologica*. 19:290-300.
- 35.-Lanyon, L.E., and Hartman, W. (1976)
Strain related electrical potentials recorder in vitro and in vivo. *Calcified Tissue Research*. 22:315-327
- 36.-Lanyon, L.E., Goodship, A.E., Pye, C.J., and Machin, J.H. (1982)
Mechanically adaptive bone remodeling. *Journal of Biochemistry*. 17:897-905
- 37.-Harell, A., Dekel, and S. Biderman, I. (1977)
Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells. *Calcified Tissue Research (Suppl)*. 22:202-207
- 38.-Davidovitch, Z., and Shanfeld, J.K. (1975)
Cyclic AMP levels in alveolar bone of orthodontically-treated cats. *Archives of Oral Biology*. 20:567-572
- 39.-Davidovitch, Z., Montgomery, P.C., and Eckerdal, O. (1976a)
Cellular localization of cyclic AMP in periodontal tissue during experimental tooth movement in cats. *Calcified Tissue Research*. 18:316-320
- 40.-Davidovitch, Z., Montgomery, P.C., Eckerdal, O., and Gustafson, G.T. (1976b)
Demonstration of cyclic AMP in bone cells by immuno-histochemical methods. *Calcified Tissue Research*. 19:305-315.
- 41.-Davidovitch, Z., Montgomery, P.C., and Shanfeld, J.L. (1977)
Guanosine 3'5' monophosphate in bone: Microscopic visualization by an immuno-histochemical technique. *Calcified Tissue Research*. 24:73-79.
- 42.-Klein, D.C., and Raisz, L.G. (1970)
Prostaglandins: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86: 1436-1441.
- 43.-Yamasaki, K., Miura, F., and Suda, T. (1980)
Prostaglandins as a mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *Journal of Dental Research*. 45:1535-1647.
- 44.-Yamasaki, K., Shibata, Y., and Fukuhara, T. (1982)
The effect of prostaglandins on experimental tooth movement in monkeys (*Macaca fuscata*). *Journal of Dental Research*. 61:1444-1446.
- 45.-Yamasaki, K., Shibata, Y., Imai, Y., Shibasaki, Y., and Fukuhara, T. (1984)
Clinical application of prostaglandin E1 (PGE1) in orthodontic tooth movement. *American Journal of Orthodontics*. 85:508-5
- 46.-Sandy, J.R. and Harris, M. (1984)
Prostaglandins and tooth movement. *European Journal of Orthodontics*. 6:175-187
- 47.-Sandy, J.R., Meghji, S., Farndale, R.W. and Meikle, M.C. (1989)
Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphate in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1010:265-269
- 48.-Sandy, J.R., Farndale, R.W., and Meikle, M. (1991)
Recent advances in understanding mechanically induced bone remodelling and their relevance to orthodontic theory and practice. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*. 103:212-222.
- 49.-Meikle, M.C., Sharyn, B., Hembry, R.M., Connors, J., Croucher, P.I., and Reynolds, J.J. (1992)
Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *Journal of Cell Science*. 103:1093-1099.
- 50.-Girasole, G., Jilka, R.L., and Passeri, G. (1991)
17 beta-estradiol inhibits interleukin-6 production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *Journal of Clinical Investigation*. 89:883-891
- 51.-Davidovitch, Z., Nicolay, O., Ngan, P.W., and Shanfeld, J. (1988)
Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodelling in orthodontics. *Dental Clinics of North America*. 32:411-435



Determinación de la producción de interleucina-1 β al estímulo mecánico en osteoblastos humanos cultivados *in vitro*[§]

Salvador García López CD, M, Sc., M. Orth. RCSEd,* * * * *
Rosina E. Villanueva CD, M Sc,*
Rafael Bojalil Parra MC, D en C,**
Luis Felipe Montaña MC, D en C**
Luis Felipe Massó MC, D en C**
Velia Ramírez Amador CD M
Sc Ph D* * * * *

§ 5º lugar en el Premio Nacional de Investigación Odontológica de la Fundación Claxo-Wellcome (2000)

* Universidad Autónoma Metropolitana.
** Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"
*** Hospital General, Dr. Manuel Cea González
**** Instituto Nacional de Nutrición
***** Certificado por el Consejo Mexicano de Ortodoncia

Resumen

La remodelación mecánica del hueso es utilizada por los ortodontistas, quienes ejercen fuerza sobre los dientes para moverlos a través del hueso alveolar, tal remodelación implica involucra la activación de las células del hueso y la estimulación de la resorción y aposición de la matriz ósea. La estimulación mecánica ha sido reconocida como un factor importante en la remodelación ósea, especialmente durante la erupción de los dientes, en la corrección de las maloclusiones, sin embargo, los aspectos moleculares que se involucran en estos procesos no han sido totalmente entendidos. Se han desarrollado diferentes métodos para aplicar el estímulo mecánico al tejido óseo *in vivo* o *in vitro* a células humanas para evaluar el resultado bioquímico. El objetivo de este trabajo fue de analizar los efectos de la estimulación mecánica en osteoblastos humanos (Saos-2) cultivados *in vitro* con respecto a la producción de interleucina 1 Beta (IL-1 β), uno de los pasos involucrados en el proceso de remodelación ósea. En este estudio se desarrolló un método de crecer osteoblastos humanos como línea celular en cajas Petri, donde la base puede ser deformada intermitentemente cada 5 segundos después de 1.5 minutos durante más de 72 horas. La estimulación mecánica de estas células es comparada con células no estimuladas (n = 5). Los osteoblastos humanos sembrados para ser confluentes en un medio de cultivo F12 de Dulbecco modificado con un 10% de suero fetal, 100 μ g/mL de estreptomina, 100U/mL de penicilina y 0.25 μ g/mL de anfotericina, en una atmósfera de 95% de aire y un 5% de CO₂ a 37° C. Utilizando el ensayo de ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay) se determinó los niveles de producción de IL-1 β después de 8, 24, 48 y 72 horas. Los resultados mostraron que no hubo producción de IL-1 β a las 8 horas de estímulo, sin embargo a las 24 (13.5 \pm 2.1) 48 (23.2 \pm 1.3) y 72 horas (33.9 \pm 1.9) se encontró una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control (p < 0.0001). Estos resultados sugieren que los osteoblastos humanos (Saos-2) cultivados *in vitro* reaccionan al estímulo mecánico liberando mayor cantidad de IL-1 β en comparación con el control y de alguna manera algunos efectos celulares pueden ser asociados con la remodelación ósea y el movimiento dentario durante el tratamiento de ortodoncia.

Palabras clave: Osteoblastos, fuerzas mecánicas, remodelación ósea, tratamiento de ortodoncia, interleucina 1 β

Abstract

Mechanical bone remodeling is utilized by orthodontists, when forces are exerted on tooth roots that enable to move through alveolar bone. Such remodeling involves the activation of bone cells and the simultaneous breakdown and reformation of the bone matrix. Mechanical forces are applied in the correction of dentofacial discrepancies and dentoalveolar malocclusions during orthodontic tooth movement, nevertheless the cellular mechanism involved in the translation of biomechanics forces into molecular events are poorly understood.

*The aim of this study was to assay the effects of mechanical stress in human osteoblast-like cells (Saos-2) under organ culture condition with respect to interleukin 1 β (IL-1 β) production. In this report we have developed a model to deforming osteoblasts in monolayer cultures capable of deformation. We examined the behaviour of Saos-2 cells with respect to cytokine production, when stimulated by a cycle of cell deformation of 5 seconds every 1.5 minutes after 8, 24, 48 and 72 hours. The cellular perturbation in these cells was then compared to underformed cells (n = 5). Cells were grown to confluence in Ham's F12/DMEM media which contained 10% foetal calf serum, 100 μ g/mL streptomycin, 100 U/mL penicillin and 0.25 μ g/mL amphotericin and grown in tissue culture flask at 37°C. In a humidified atmosphere 95% air - 5% CO₂. Enzyme-linked immunoassay (ELISA) was used to measure interleukin-1 β production. Results have shown that human clonal osteoblasts do not produce IL-1 β at 8 hours nevertheless at 24 hours (13.5 \pm 2.1), 48 (23.2 \pm 1.3) and 76 hours (33.9 \pm 1.9) there is a significantly increased production of IL-1 β compared to the control (p < 0.0001). These results suggests that human monoclonal osteoblast-like cells were influenced by mechanical strain *in vitro* and may account for some of the cellular effects associated with bone remodelling and orthodontic tooth movement.*

Key words: Osteoblasts, mechanical forces, bone remodelling, orthodontic treatment, interleukin 1 β

Introducción

El proceso de reconocer y responder a un estímulo mecánico es vital para el crecimiento y función de cualquier célula humana.¹ Las fuerzas mecánicas se utilizan en la corrección de discrepancias dentofaciales y en la corrección de las maloclusiones durante el movimiento dentario. Sin embargo, los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la transducción de estímulos mecánicos a las respuestas bioquímicas de las células es poco entendido. Los experimentos pioneros llevados a cabo por Hert y colaboradores^{2,3} desarrollaron una técnica en la aplicación de presión al hueso *in vivo* sobre varios períodos de tiempo; estos estudios brindaron información básica para conocer el tipo y duración de las fuerzas mecánicas necesarias para estimular la remodelación ósea. A mediados de los años 70 varios grupos desarrollaron sistemas de modelos *in vitro* donde la presión mecánica pudo ser aplicada a células o tejidos, bajo condiciones experimentales controladas.⁴⁻⁶ Estos estudios demostraron que la presión mecánica tiene respuestas bioquímicas y estructurales en células deformadas. La tensión mecánica también ha demostrado estimular no sólo la síntesis del colágeno,⁷ sino también las enzimas responsables para su específica hidrólisis.⁸ Utilizando un modelo desarrollado para deformar mecánicamente articulaciones fibrosas *in vitro*, Meikle y colaboradores⁷ reportaron un incremento en la producción de la matriz metaloproteinasas (MMPs), colagenasa, gelatinasa, y estromelisin por medio de suturas craneales mecánicamente deformadas, dando un incremento con-

comitante en su específico inhibidor del tejido de la metaloproteinasas (TIMP).¹⁰⁻¹² Finalmente la resorción y formación de hueso está ligada a un proceso de interacciones locales como la producción de factores de crecimiento y a las citocinas.¹³ La interleucina-1 β es una citocina multifuncional que es liberada de los osteoblastos y por lo tanto tienen la capacidad de estimular la proliferación de otras interleucinas dependientes de las células derivadas de la médula ósea. El conocer los mecanismos moleculares y celulares durante la remodelación ósea es de suma importancia científica y clínica para la medicina y la odontología en la aplicación de nuevas terapéuticas.

Hipótesis

Los osteoblastos humanos como línea celular (Saos-2) bajo condiciones experimentales de cultivo celular *in vitro* producen interleucina 1 beta con la estimulación mecánica.

Material y métodos

Cultivo de osteoblastos humanos

La línea celular de osteoblastos humanos es obtenida de la colección celular tipo americana (ATCC).

Los osteoblastos humanos (Saos-2) son sembrados a una densidad de 2.5 x 10⁶ células/cm² en frascos de cultivo de tejido (75 cm² Costar, Cambridge, MA), creciendo a 37°C en una atmósfera humidificada de 95% de aire y 5% de CO₂.

a una proporción de 1:1 en un medio modificado de Dulbecco (Ham's F12-Dulbecco's modified Eagles's medium -DMEM) adicionando un 10% de suero fetal (FCS Giberfarm), 100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomycin y 0.25 µg/mL de anfotericina. Posteriormente se lavan las células en una solución buffer salina y son sembradas y alimentadas en frascos de cultivo estériles. Con la ayuda de un microscopio de luz de contraste, las células son contadas y alimentadas, al alcanzar confluencia (72 horas) los osteoblastos son removidos con tripsina-EDTA (0.25% Sigma Chemical Co.) respectivamente, y son sembrados en cajas Petri con base flexible (1 x 10⁵). Las cajas de Petri son lavadas dos veces con DMEM previo a la siembra de células y se dejan crecer por 24 horas antes de la experimentación.

Estimulación mecánica de los osteoblastos

Utilizando cajas de Petri Petriperm (Haraeus, Bacher Gmbh) con bases flexibles (60 mm) hechas de polifluoritano (PTFE Bacher Gmbh, Alemania), son deformadas sobre anillos de caucho en una base de acrílico, se aplica vacío de -11 mg de Hg produciendo un aumento de la superficie del área en un 5% (1.5 mm). La frecuencia de distorsión es controlada por un reostato, a temperatura de 37°C durante el experimento. Una atmósfera de CO₂ está presente durante la deformación de la base de la caja Petri. Grupos de 10 cultivos son aleatoriamente colocadas tanto controles como experimentales y son incubadas secuencialmente en el mismo aparato. La única diferencia es que el control no será expuesto a la deformación mecánica. Esta deformación será aplicada intermitentemente por 5 segundos cada 180 segundos durante 8, 24, 48 y 72 horas.

Preparación del medio para su análisis

Obtención de la muestra

Después de haber deformado los osteoblastos humanos, el medio de cultivo se recolecta y se centrifuga a 700 rpm a 37°C para remover cualquier partícula de material. El medio de cultivo es almacenado a 20°C hasta que suficiente medio ha sido obtenido para determinar la prueba inmunológica de interleucina 1-β (IL-1β).

Examen de ELISA (Enzyme-Linked Immunoassay)

Prueba para determinación de Interleucina humana 1-β

Una microplaca con anticuerpos monoclonales específicos para IL-1β previamente ya cubierta en los pozos (Quan-

tikine, R & D Systems), se les adiciona 200 µL de medio control y experimental en cada pozo. Los promedios son obtenidos por diluciones seriadas de IL-1β en diluciones conocidas para producir concentraciones de 250, 125, 62.5, 31.2, 15.6, 7.8, 3.9 y 0 pg/mL de cada una en duplicado. Muestras controles y experimentales son diluidas a la x⁵ y x¹⁰ y realizadas en duplicado. Después de incubar durante dos horas a 37°C, las muestras son lavadas 3 veces con solución buffer (400 µL solución salina buffer de fosfato PBS) utilizando una máquina de aspiración (Labsystems). Son adicionados e incubados 200 µL de conjugado con una nueva tira provista en el ELISA Kit a temperatura ambiente por más de una hora, posteriormente es lavada la microplaca como se mencionó anteriormente. Se agrega 200 µL de solución de sustrato a cada pozo a un intervalo de 5 segundos e incubado por 20 minutos a temperatura ambiente. Se adiciona 50 µL de solución de H₂SO₄ para detener la reacción, se mide la adsorbancia a 540 nm usando un equipo de espectrofotometría (Labsystems). Una curva logarítmica promedio es dibujada utilizando una computadora y el programa software génesis, y de esta manera se conoce la concentración de IL-1β en las muestras de cultivo.

Resultados

Producción de interleucina-1β en osteoblastos humanos Saos-2 estimulados y no estimulados mecánicamente

La primera columna representa el periodo en tiempo del control (osteoblastos no estimulados) la segunda columna representa a osteoblastos estimulados que es el grupo experimental (n = 5).

Los resultados representan el promedio ± error estándar (SEM).

La prueba de t fue utilizada para determinar diferencia significativa.

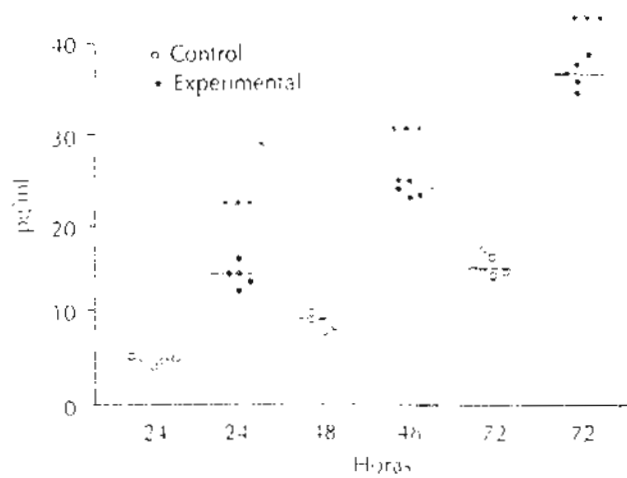


Figura 1. Resultados de la producción de interleucina-1β

*** estadísticamente altamente significativo $p < 0.0001$

Los resultados demuestran que no hubo producción de IL-1 β a las 8 horas de estímulo, sin embargo a las 24 (13.5 ± 2.1) 48 (23.2 ± 1.3) y 72 horas (33.9 ± 1.9) se encontró una diferencia estadísticamente significativa comparada con el control ($p < 0.0001$). (Figura 1).

Discusión

Se han desarrollado varios métodos para distorsionar el citoesqueleto de las células en cultivos celulares.^{6, 14-20} El modelo pionero de caja de Petri desarrollado por Harell y colaboradores⁶ demostraron que las células del hueso al ser deformadas mecánicamente, van acompañados por una serie de procesos bioquímicos. En primera instancia, la activación de la fosfolipasa A₂ con subsecuente desprendimiento del ácido araquidónico resultando en un incremento de la producción de prostaglandinas (PGE₂) que activan a la adenil ciclasa; posteriormente, incrementando el calcio intracelular (Ca²⁺) y así estimulando la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN).

En este estudio se demuestra que la estimulación mecánica de monocapas de cultivos de osteoblastos (Saos-2) *in vitro*, no sintetizan interleucina 1 β durante las primeras 8 horas, sin embargo a las 24, 48 y 72 horas fueron detectadas proteínas inmunorreactivas en el medio de cultivo. La IL-1 β tiene un papel importante en la osteogénesis y resorción ósea, que de alguna manera incrementa el número de osteoclastos más que la actividad de los ya existentes. Esto fue realizado en estudios a largo plazo utilizando cultivos de médula ósea, en donde se demostró la formación de osteoclastos.^{21, 22}

La resorción ósea se caracteriza por una secuencia de eventos que incluyen la formación y migración de osteoclastos al sitio de resorción, que en forma coordinada con los osteoblastos favorecen la degradación ósea. Sin embargo, existe una marcada evidencia de que las metaloproteinasas (MMPs) y los productos derivados del metabolismo del ácido araquidónico (PGE₂) degradan la matriz ósea a través de los osteoclastos y por lo tanto, la IL-1 β incrementa este proceso. Este tipo de citocina emplea su efecto pleiotrópico que actúa recíprocamente con los receptores específicos de la pared celular donde se transcriben y aumentan su actividad para identificar otras proteínas y así poder degradar colágeno tipo I realizando otras funciones específicas de los osteoblastos.^{23, 24}

Desde el punto de vista clínico el aplicar fuerzas ortopédicas a los maxilares o durante la fase temprana del movimiento ortodóncico existe una respuesta inflamatoria aguda, caracterizada por la vasodilatación del leucocitos periodontal y migración de leucocitos fuera de los capila-

res.²⁶⁻²⁸ Las Interleucinas secretadas por estas células mononucleares pueden interactuar directamente con células óseas o indirectamente con células vecinas, tales como monocitos macrófagos, linfocitos y fibroblastos a través de la producción de interleucinas, prostaglandinas o factores de crecimiento que contribuyen de alguna manera a la remodelación ósea.

Conclusiones

- Bajo condiciones experimentales controladas el cultivo de osteoblastos humanos (Saos-2) *in vitro* no sintetizan interleucina 1 β durante las primeras 8 horas, sin embargo a las 24, 48 y 72 horas fueron detectadas en el medio de cultivo en forma significativa comparada con el control.
- La producción de IL-1 β puede representar un papel importante durante la remodelación ósea a través de los receptores localizados en los osteoblastos, contribuyendo a la interacción de prostaglandinas, factores de crecimiento y diferentes tipos de interleucinas.
- Este estudio sugiere que la producción de citocinas derivadas de osteoblastos humanos (Saos-2) de alguna manera tienen efectos asociados con la remodelación ósea durante el tratamiento ortopédico y ortodóncico.

Bibliografía

- Wang N, Butler JP, Inber DL. Mechanotransduction across the cell surface and through the Cytoskeleton. *Science* 1993; 260: 1124-1127.
- Hert J, Liskova M, Landrgot B. Influence of the long-term, continuous bending on the bone. An experimental study on the tibia of the rabbit. *Folia Morphologica* 1969; 17: 389-99.
- Hert J, Liskova M, Landa J. Reaction of bone to mechanical stimuli. *Folia Morphologica* 1971; 19: 290-300.
- Lanyon LE, Hartman W. Strain related electrical potentials recorded *in vitro* and *in vivo*. *Calcified Tissue Research* 1976; 22: 315-327.
- Rodan GA, Bourne LA, Harvey A, Mensi T. Cyclic AMP and cyclic GMP: mediators of the mechanical effects on bone remodelling. *Science* 1975; 189: 467-471.
- Harell A, Dekel S, Biderman I. Biochemical effect of mechanical stress on cultured bone cells. *Calcified Tissue Research (Suppl)* 1977; 22: 202-207.
- Meikle MC, Reynolds JJ, Dungle ST. Rabbit cranial sutures *in vitro*. A new experimental model for studying the response of fibrous joints to mechanical stress. *Calcified Tissue International* 1979; 28: 137-144.
- Meikle MC, Sellers A, Reynolds JJ. Effect of tensile mechanical stress on the synthesis of metalloproteinases by rabbit coronal sutures *in vitro*. *Calcified Tissue International* 1980; 30: 77-82.
- Meikle MC, Heath JK, Henry RM, Reynolds JJ. Rabbit cranial suture fibroblasts under tension express a different collagen phenotype. *Archives of Oral Biology* 1982; 27: 605-613.

10. Meikle MC, Heath J, Reynolds JJ. Response of fibrous joint to tensile mechanical stress. *American Journal of Orthodontics*. 1984; 85: 141-153.
11. Meikle MC, Atkinson SJ, Ward RV, Reynolds JJ. Gingival fibroblasts degrade type I collagen films when stimulated with tumor necrosis factor and interleukin-1: Evidence that breakdown is mediated by metalloproteinases. *Journal of Periodontology Research* 1989; 24: 207-213.
12. Meikle MC, McGarrity AM, Thompson BM, Reynolds JJ. Bone-derived growth factors modulate collagenase and TIMP activity and type I collagen degradation by mouse calvarial osteoblasts. *Bone and Mineral*. 1991; 12: 41-55.
13. Meikle CM, Sharyn B, Hembry RM, Compston J, Croucher PI, Reynolds JJ. Human osteoblasts in culture synthesize collagenase and other matrix metalloproteinases in response to osteotropic hormones and cytokines. *Journal of Cell Science* 1992; 103:1093-1099.
14. Hasegawa S, Sato S, Saito S, Brunette DM. Mechanical stretching increase the number of cultured bone cells synthesizing DNA alters their pattern of protein synthesis. *Calcified Tissue International* 1985; 37:431-436.
15. Banes AJ, Gilber T, Taylor D, Monbureau O. A new vacuum-operated stress-providing instrument that applies static or variable duration cyclic tension or compression to cells *in vitro*. *Journal of Cell Science* 1985; 75: 35-42.
16. Sandy JR, Meghji S, Farndale RW, Meikle MC. Dual elevation of cyclic AMP and inositol phosphate in response to mechanical deformation of murine osteoblasts. *Biochemica et Biophysica Acta* 1989; 1010: 265-269.
17. García-López S. The effects of mechanical stress on cytokine production by human osteoblasts like cells *in vitro*. *Master of Science in Orthodontics Thesis*. University of London 1995a.
18. García-López S, Lee BP, Meikle MC, McDonald F. Cytokine production by human osteoblasts mechanically deformed on flexible dishes. *Bone and Tooth Society* 1995b; 44:55.
19. García-López S, Villanueva R. Comparison of two types of human osteoblasts under cyclic strain *in vitro*. *European Journal of Orthodontics* 1999; 21: 587-588.
20. García-López S, Villanueva R, Bojalil R, Montaña L, Ramírez V. Evaluation of cytokine release in osteoblasts and fibroblasts: an *in vitro* study. *American Association of Orthodontists Book of abstracts* 2000: 268.
21. Pfeilschifter J, Chenu C, Bird A, Mundy GR, Roodman GD. Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells *in vitro*. *Journal of Bone and Mineral Research* 1989; 4: 113-117.
22. Grefin RO, Mundy GR, Seyedin SM, Bonewald LM. Activation of the bone derived latent TGF B complex by isolated osteoclasts. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 1989; 158: 817-823.
23. MacDonald BR, Gowen M. Cytokine and Bone. *British Journal of Rheumatology* 1992; 31: 149-155.
24. Gowen M, Wood DD, Ihrie EJ, Meats JE, Russell RG. An interleukin-1 like factor stimulates bone resorption *in vitro*. *Nature* 1983a; 306: 378-380.
25. Gowen M, Meikle MC, Reynolds JJ. Stimulation of bone resorption *in vitro* by a nonprostanoid factor released by human monocytes in culture. *Biochemistry and Biophysics Acta* 1983b; 762: 471-474.
26. Yamasaki K, Miura F, Suda T. Prostaglandins as mediator of bone resorption induced by experimental tooth movement in rats. *Journal of Dental Research*. 1980; 45: 1535-1642.
27. Sandy JR, Harris M. Prostaglandins and tooth movement. *European Journal of Orthodontics*. 1984; 6: 175-182.
28. Davidovitch Z, Nicolay O, Ngan PW, Shanfeld J. Neurotransmitters, cytokines and the control of alveolar bone remodelling in orthodontics. *Dental Clinics of North America* 1988; 32: 411-435.

Lecturas complementarias:

- Davidovitch Z, Shanfeld JK. Cyclic AMP levels in alveolar bone of orthodontically-treated cats. *Archives of Oral Biology* 1975; 20: 567-572.
- Davidovitch Z, Montgomery PC, Eckerdal O, Gustafson GT. Demonstration of cyclic AMP in bone cells by immunohistochemical methods. *Calcified Tissue Research* 1976; 19: 305-315.
- Davidovitch Z, Montgomery PC, Shanfeld JK. Glucocorticoid 2'5' monophosphate in bone: Microscopic visualization by an immuno-histochemical technique. *Calcified Tissue Research* 1977; 24: 73-79.
- Dietrich JW, Goodson JM, Raisz LG. Stimulation of bone resorption by various prostaglandins in organ culture. *Prostaglandins* 1975; 10: 231-236.
- Klein DC, Raisz LG. Prostaglandin: stimulation of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 1970; 86: 143-1441s.

Reimpresos
 Dr. Salvador García López
 Av. Río Churubusco 594 301
 entre Mina y Guerrero
 Col. Del Carmen Coyoacán,
 México, D.F.
 C.P. 041000

Este artículo puede ser visto en:
www.medigraphic.com/adm



Eficacia y seguridad de la aplicación de subgalato y subsalicilato de bismuto como agentes hemostáticos después de la extracción quirúrgica de terceros molares

Tessie Alejandra Mora Loya,*
Dr. Juan José Trujillo Fandiño,**
Dr. José Socorro Mora Sierra***

- * Estudiante de Pregrado de la Universidad Tecnológica de México.
- ** Médico adscrito al Servicio de Cirugía Maxilofacial Hospital Juárez de México
- *** Especialidades Mora SC Director General

Resumen

El subgalato y subsalicilato de bismuto son sustancias que se han utilizado como agentes hemostáticos en adenoamigdalectomías, activando el factor XII de la coagulación. **Pregunta:** ¿Son eficaces y seguros, después de la extracción de terceros molares? **Objetivo:** Valorar su eficacia y seguridad como agentes hemostáticos. **Hipótesis:** Son agentes eficaces y seguros para detener el sangrado por extracciones de terceros molares. **Justificación:** No se cuenta con un agente eficaz, seguro, fácil de conseguir y económico para ayudar al control de la hemorragia. **Tipo de estudio:** Ensayo clínico controlado aleatorizado placebo controlado. **Método:** Pacientes con indicación de extracción quirúrgica de 4 terceros molares, se aplicó de manera aleatoria subgalato o subsalicilato de bismuto en forma tópica en uno de los alvéolos y colocarlo una sustancia control en el alvéolo contralateral. **Resultados:** Se obtuvieron por variancia (ANOVA). Se incluyeron en el estudio 71 pacientes. Se realizaron 284 extracciones quirúrgicas. Setenta y uno con cada una de las sustancias, cada una con su control. El grupo manejado con subgalato de bismuto, obtuvo 1.97 min y el control 2 (3.52 min) observando una diferencia estadística altamente significativa ($F = 146.62$, $p < 0.05$). **Conclusión:** El subgalato y subsalicilato de bismuto son eficaces y seguros para el control del sangrado, sin encontrar efectos adversos.

Palabras clave: Subgalato de bismuto, subsalicilato de bismuto, terceros molares, cirugía oral

Abstract

The subgallate and subsalicylate of bismuth are substances that had been employed as hemostatic agents, in adenotonsillectomies activating the Hageman Factor in coagulation. Question: Are they safe and efficient hemostatic agents after third molar extractions? Purpose: Evaluate the efficiency and safety as hemostatic agents. Hypothesis: They are safe and efficient agents for the bleeding control after third molar extractions. Justification: There isn't an efficient, safe, easy to obtain and unexpensive agent to help bleeding control. Study design: Randomized placebo-controlled trial. Method: In patients with indication for surgical extractions of the third molars, subgallate or subsalicylate of bismuth was applied topically randomly in each alveolus and a control substance in the contralateral alveolus. Results: The data were analyzed with the ANOVA parametric test. Seventy one patient were enrolled. Two hundred and eighty four surgical extraction were performed. Seventy one with each of the substances, each one with its control. The group with subgallate and subsalicylate of bismuth obtain the minor time (1.97 min) and the control group obtained the largest (3.52 min) with a statistically significant difference ($F = 146.62$; $p < 0.05$). Conclusion. The subgallate and subsalicylate of bismuth are efficient and safe in the bleeding control without adverse effects.

Key words: Bismuth subgallate, bismuth subsalicylate, third molars, oral surgery

February 24, 2003

Dr. Salvador Garcia-Lopez
Metropolitan Autonomous University
Av. Rio Churubusco 594-101
Mexico City, Del Carmen Coyoacan 04100
MEXICO

Dear Dr. Garcia-Lopez:

This will confirm acceptance to present your Oral Research Abstract Presentation entitled: "*The Cellular Action of Interleukin 12 by Murine Osteoblasts In Vitro*", at the American Association of Orthodontists' (AAO) 103rd Annual Session in Hawaii. The abstracts will be presented on Monday, May 5 at the Hawaii Convention Center. The time and location of your presentation will be sent at a later date.

Each presenter is allotted ten minutes for presentation and five minutes for questions and answers. A moderator will be present to introduce each presenter and to monitor each presenter's time. Three screens, three slide projectors, a computer projector for PowerPoint, a laser pointer, and a podium microphone will be available for use during the presentation.

As a reminder, participants are requested not to distribute advertising material of any kind and no commercial promotion is allowed.

If you have any questions regarding the Oral Research Presentations, please call John Terranova at the AAO Central Office at 314-993-1700 or 800-424-2841.

On behalf of the members of the Council on Scientific Affairs, we thank you for your interest in the 103rd AAO Annual Session scientific program and look forward to your participation.

Sincerely,

Ravindra Nanda

Ravindra Nanda
Chair, Council on Scientific Affairs

RN/JT/clm

104th ANNUAL SESSION



Orlando
FLORIDA

An Orthodontic Family Experience You Will Never Forget!

On-Site Program

★ IMPORTANT ★

Presidential Highlights pages 1-21

Table of Contents page 22-23

Opening Ceremonies & Cirque du Soleil page 31

Legends in Orthodontics Luncheon page 33

Universal Celebration of Smiles Event page 36

Oral Abstract Research Presentations

104TH ANNUAL SESSION

★ SESSION I



Monday, May 3

10:00am-2:30pm

OCCC - 207

10:00am

Bond Failure: An In-Vivo Comparison of Two Self-Etching Primers to a Control

Casey W. Johnson, M. Weinstein, A. Borislow, L. Braitman
Abington, PA, USA

10:15am

Functional Activity Responses of Masticatory Muscles Following Mandibular Protrusion and Vertical Increase

Gerassimos G. Angelopoulos, B. Sessle, D. Woodside, M. Makos, M. Spyropoulos
Athens, Greece

10:30am

Rabbit Model for Studying Fiber-Type Changes in the Genioglossus Muscle with Continuous Electrical Stimulation for 10 Days

Kevin Bakar, R. Tingilian, E.K. Pae
Los Angeles, CA, USA

10:45am

Histological Evaluation of Freeze-Dried Bone Allograft and Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft in Sinus Lifts and Ridge Augmentations

Gerald V. Cammack II, J. Mellonig, B. Britton, M. Mills, R. Arnold
San Antonio, TX, USA

11:00am

Mandibular Growth and Response to Orthopedic Treatment in High Resolution 3-D Imaging

Lucia H S Cevidanes, A. Franco, W. Proffit, G. Geng, D. Slice
Chapel Hill, NC, USA

11:15am

Long-Term Follow-up of Severely Resorbed Incisors Following Resolution of Associated Canine Impaction

Stella Chaushu, A. Becker
Jerusalem, Israel

11:30am

Interceptive Extractions in the Developing Dentition: A Randomized Controlled Trial

Kau Chung-How, P. Durning, W. Harzer, F. Miotti, S. Richmond
Cardiff, Wales, United Kingdom

11:45am

The Effects of Maxillomandibular Advancement Surgery on the Overlying Profile

R. Scott Conley, S. Boyd
Nashville, TN, USA

12:00pm

Dental Needs of Medicaid Patients Self-Referred for Orthodontic Treatment

Amy L. Counts, D. Butler
Oklahoma City, OK, USA

12:15pm

Mixed Dentition Rapid Maxillary Expansion, Permanent Incisor Behavior, -- Long-Term Outcomes

Mauro Cozzani, S/ Mirengi, A. Guiducci, M. Manfredini, G. Sicilian
La Spezia, Italy

12:30pm

Early Class III Orthodontic Treatment: Assessment of Clinicup Impact on the Skeleton, Dentition and the TMJ

Katerina Douma, E. Katsavrias, M. Makos
Marousi-Athens, Greece

12:45pm

Anterior Lower Facial Heights in Different Facial Types as a Predictor of Obstructive Sleep Apnea

Bahareh Fathi, K. Ryan, C. Quas, N. Garrett, E. Pae
Los Angeles, CA, USA

1:00pm

TNF α and IL-6 Production by Murine Osteoblasts During Mechanical StimulationSalvador Garcia-Lopez, M. Meikle, P. Villanueva, V. Ramirez, R. Bojalil
Mexico City, Mexico

1:15pm

The Transcription Factors Decoy: A Possible Nobel Approach for Controlling Osteoclastic Resorption

Ilaria Giovannini, M. Cozzani, G. Sicilliani
Perugia, PG, Italy

1:30pm

Tissue Engineering of Mandibular Condyle From Mesenchymal Stem Cells and Biocompatible Polymer

Adel Alhadlaq, L. Hong, S. Tomkoria, A. Caplan, D. Lennon
Chicago, IL, USA

1:45pm

Kinesiologic Study of the Influence of Activator Treatment on Mandibular Movements

Dimitra Kardara, E. Bitsanis, E. Katsavrias, D. Halazonetis
Athens, Greece

2:00pm

Non-Syndromic Hypodontia in Three Generations Affected by Molar Oligodontia

Dermot Kavanaugh, D. Aeschlimann, M. Hunter, C. Karn, S. Richmond
Cardiff, So. Glamorgan, United Kingdom

2:15pm

Reliability of a 3-D Optical Scanning Device for Generating Dental Study Models

Andrew Keating, C. Kau, A. Zhurov, S. Richmond, R. Bibb
Cardiff, So. Glamorgan, United Kingdom

**American Association of Orthodontists
Book of Papers – Volume 12**

**Research Award Abstracts
Oral Research Abstracts**



Orlando
May 30 - April 4, 2004

**104th Annual Session
April 30th - May 4th, 2004**

American Association of Orthodontists



TNF α and IL-6 production by murine osteoblasts during mechanical stimulation

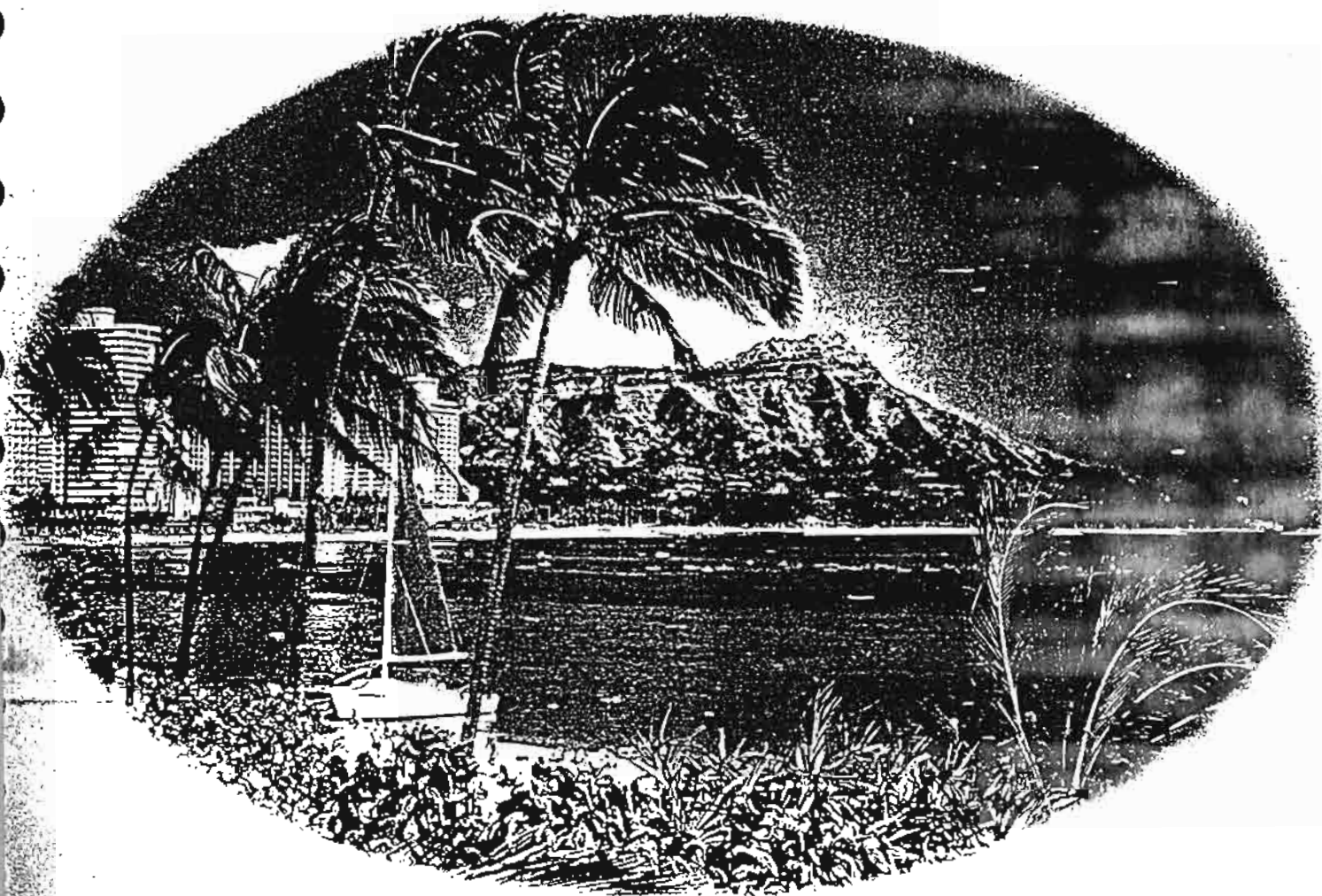
GARCIA-LOPEZ S.; MEIKLE M.C., VILLANUEVA R.; MONTAÑO L.; MASSO F.; RAMIREZ V., BOJALIL R. Universidad Autónoma Metropolitana, National Cardiology Institute, General Hospital Gea Gonzalez, México City., King's, Guy's and St. Thomas Hospital. London.

Orthodontic tooth movement requires bone remodeling during the treatment of malocclusions. It has been suggested that cytokines such Interleukin 1- β (IL-1 β), tumour necrosis factor (TNF) and Interleukin-6 (IL-6) are involved in bone remodeling, bone resorption and new bone deposition. IL-6 is a pleiotropic cytokine that possesses activities that may enhance or suppress inflammatory bone destruction. However IL-1 receptor antagonist and a TNF-binding protein have shown both the inhibition of bone resorption in animal models. The aim of this study was to examine the stimulation of murine osteoblasts under organ culture condition to respect of TNF- α and IL-6 production. Calvaria from 1-2 day new-born balb / c females mice were obtained, frontal and parietal bones were removed and exposed to timed digestion with trypsin. The cells released were cultured in F-12 / Dulbecco's modified eagle media, containing 10% foetal calf serum and antibiotics. Incubation was carried out at 37°C. In a 5% CO $_2$ with 95% air. Media was collected for determination of IL-6 and TNF- α by the enzyme-linked immunoassay (ELISA) at 0, 24, 48, 72 and 96 hours. Results have shown that cultured murine osteoblasts stimulated and none mechanically stimulated released TNF- α and IL-6 from 0 to 96 hours. Supernatant of murine osteoblasts mechanically stimulated have demonstrated to increased TNF- α significantly at 24 hours (2135. \pm 7046 pg/ml) compared to control (823 \pm 0.969 pg/ml; p < 0.001) while the production of IL-6 was increased significantly at 48 hours in cells mechanically distorted (7206 \pm 957 pg/ml) compared to non stimulated cells (3401 \pm 082 pg/ml) (p < 0.001). This *in vitro* model has demonstrated that the mechanical stress on murine osteoblasts increased the production of TNF- α before of IL-6 released. The role of these cytokines may suggest their influence in bone remodelling during orthodontic tooth movement, further *in vivo* studies are required to confirm this event.

The transcription factors decoy: a possible novel approach for controlling osteoclastic resorption.

GIOVANNINI I., COZZANI M., SICILIANI G. University of Ferrara, Ferrara, Italy.

The objective of this *in vitro* study was to examine the effect of decoy DNA/DNA molecules targeting the nuclear factor kappaB (NF-kappaB) on apoptosis of human osteoclasts (OCs), in order to interfere with the pathway regulating osteoclast differentiation and programmed cell death. Human primary OCs were prepared culturing for 14 days peripheral blood mononuclear cells in the presence of receptor activator of NF-kappaB ligand (RANKL), macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) and parathyroid hormone (PTH). OCs were transfected with 0.5, 1 and 2 μ g/mL of the double-stranded decoy molecules mimicking the NF-kappaB binding sites present in the LTR of the HIV-1, complexed with 2.5, 5 and 10 μ g of PC:DOTAP cationic liposomes, respectively, for 24, 48 and 72 hr. Apoptosis was evaluated by TUNEL staining and confirmed by induction of Caspase-3 and inhibition of IL-6 expression. The results obtained demonstrate that in primary cells expressing typical osteoclast markers such as TRAP and MMP9, NF-kappaB decoys significantly stimulates programmed cell death in OCs at a very early stage with more than a 13-fold increase in the percentage of apoptotic osteoclasts. By using the above-mentioned approach in clinical orthodontics, it could be possible to alter osteoclast life spans. In this respect, the decoy approach could be an effective novel biological means to control osteoclastic resorption during orthodontic tooth movement.



103rd Annual Session
Honolulu Islands, USA

Special Events:

Opening Ceremonies

see page 15

Excellence in Orthodontics Luncheon

see page 16

Hawaiian Lifestyles Luncheon

see page 18

AAO's Ho'olaule'ia Gala Reception

see page 19

Navigating
the Future...

A Voyage of Discovery



Monday, October 20, 2003 • Friday, October 24, 2003

Saturday, October 25, 2003 • Sunday, October 26, 2003

Oral Abstract Research Presentations

Monday, May 5

ORAL ABSTRACT RESEARCH PRESENTATIONS

Monday, May 5
Session 1
7:30am-12:45pm
HCC - 318

9:30am

Deciduous Dentition Anchored Rapid Maxillary Expansion in Mixed Dentition Crossbite and Non-crossbite Patients

Mauro Cozzani, M. Rosa, S. Mirengi, A. Guiducci, G. Siciliani
La Spezia, Italy

9:45am

Calculation and Transferal of the Vector in Vertical Ramus Distraction Osteogenesis

Thomas K Pedersen, S.E. Noerholt, T. Kofod
Aarhus, Denmark

10:00am

Growth Factor-Induced Osteogenesis During Expansion of the Midpalatal Suture

Clarice S. Law, D. Han, T. Truong, K. Ting
Los Angeles, California, USA

10:15am

The Intracellular Response on Orthodontic Force Simulation

Uwe Baumer, Ph.D., I. Golan, B. Becker, M. Redlich, A. Roes, A. Palmon, D. Mussig
Regensburg, Germany

10:30am

The Cellular Action of Interleukin 12 by Murine Osteoblasts In Vitro

Salvador Garcia-Lopez, R. Villanueva, L. Montano, V. Ramirez, R. Boyalil
Mexico City, Mexico

10:45am

Intercellular Mechanical Signaling Through Adherens Junctions in Fibroblasts

Kevin S. Ko, B. Tompson, P. Arora, C. McCulloch
Toronto, Ontario, Canada

11:00am

Molecular Response of the Alveolar Bone Cells to Orthodontic Tooth Movement

Dubravko Pavlin, J. Gluhak-Heinrich
San Antonio, Texas, USA

11:15am

The Effects of Stretch on the Expression of Collagen I Gene in Cultured Rat Gingival Connective Tissue Fibroblasts

Bahram G. Saffar, L. Terracio, U. Fotadar, P. Sacks
New York, New York, USA

11:30am

Effects of Osteoporosis on Orthodontic Tooth Movement in the Rat

Apostolos I. Tsolakis, K. Alexandridis, E. Chrysomali, L. Chaldi, I. Dontas, M.N. Spyropoulos
Lanssa, Greece

11:45am

Effect of Prostaglandin E₂, Vitamin D, and Calcium Gluconate on Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Rats

Massoud Seifi, B. Eslami
Tehran, Iran

12:00pm

Effect of Thyroxine on Orthodontic Tooth Movement and Root Resorption in Rats

Massoud Serfi, B. Eslami
Tehran, Iran

12:15pm

Effects of Orthodontic Forces on Physical Properties of Root Cementum

M. Ali Darendeliler, E. Chan, P. Srivichamkul, T. Rex
Surry Hills, NSW, Australia

12:30pm

Bone Transport in Alveolar Cleft

Rafael e. Alcalde, M. Mitsugi, I. Yamada, K. Yamauchi
Seattle, Washington, USA

ORAL ABSTRACT RESEARCH PRESENTATIONS

Monday, May 5
Session 1
7:30am-12:45pm
HCC - 319

7:30am

Smile Lateral "Black Tunnels" Aesthetic Value for Dentists and Laypersons

Mauro Cozzani, L. D'Elia, M. Manfredi, G. Siciliani
La Spezia, Italy

7:45am

Impact of Orthodontic Appliances on Sleep Quality - A Pilot Study

Akbar Rawji, L. Parker, D. Woodside, B. Tompson, C. Shapiro
Toronto, Ontario, Canada

8:00am

The Relationship Between MRJ Findings and TMJ Related Pain in TMD Patients

Dong-Geun Lee, H. Cheon
Anyang, Kyongki-do, South Korea

* denotes financial and/or beneficial interest

* indicates the use of visually enhanced images

American Association of Orthodontists



Book of Papers – Volume 11

Research Award Papers

Research Abstract Papers

*Navigating
the Future...*
A Voyage of Discovery



103rd Annual Session
Honolulu, Hawaii
May 2–6, 2003

The cellular action of Interleukin 12 by murine osteoblasts *in vitro*.

GARCIA-LOPEZ S.; VILLANUEVA R.; MONTAÑO L.; MASSO F.; RAMIREZ V, BOJALIL R.
Metropolitan Autonomous University, National Cardiology Institute, General Hospital Gea
Gonzalez, México City

Osteoblasts and osteoclasts play a role in the bone remodelling in response to mechanical forces during orthodontic tooth movement and orthopaedic treatment. It has been suggested that pro-inflammatory cytokines such Interleukin 1- β (IL-1 β), tumour necrosis factor (TNF) and Interleukin-6 (IL-6) are involved in bone remodeling, bone resorption and new bone deposition. Recently it has been described that IL-12 inhibit osteoclasts formation in cultures of coculture of murine osteoblasts (Horwood *et al*, 2001).

The aim of this study was to examine the stimulation of murine osteoblasts under organ culture condition to respect of Interleukin-12 (IL-12) production. Calvaria from 1-2 day new-born balb / c females mice were obtained, frontal and parietal bones were removed and exposed to timed digestion with trypsin. The cells released were cultured in F-12 / Dulbecco's modified eagle media, containing 10% foetal calf serum and antibiotics. Incubation was carried out at 37°C. In a 5% CO₂ with 95% air. Media was collected for determination of IL-12 by the enzyme-linked immunoassay (ELISA) at 0, 24, 48, 72 and 96 hours. Results have shown that cultured murine osteoblasts non stimulated and stimulated hormonal or mechanically released IL-12 from 24 to 72 hours. It has been observed IL-12 increased at 24 hours of stimulation with a hormone (2 μ g/ml of oestrogen) (1750 pg/ml) or mechanically (1980 pg/ml) compared with control (850 pg/ml) ($p < 0.001$). This model has shown that IL-12 was produced by cultured murine osteoblasts which is involved to the immunity response mediated by TH1 cells, and might exert their influence during the early stages of orthodontic tooth movement.

Intercellular mechanical signaling through adherens junctions in fibroblasts.

KO, K.S., TOMPSON, B., ARORA, P.D., and McCULLOCH, C.A.G. (CIHR Group in Matrix Dynamics; Department of Orthodontics, Faculty of Dentistry, University of Toronto, Canada)

Orthodontic tooth movement involves force-induced tissue remodeling of the periodontal ligament which is composed of a network of cells connected through extensive gap junctions and cadherin-mediated adherens junctions. Currently, it is unknown whether these junctions in connective tissue fibroblasts transmit mechanical signals and coordinate multicellular adaptations to physical forces. We developed a novel model system in which controlled mechanical forces were applied to intercellular junctions by electromagnets acting on cells containing internalized magnetite beads. Force application induced displacement of magnetite-bead loaded cells and robust intracellular Ca²⁺ signals (65 \pm 9.4 nM above baseline), a second messenger system that regulates important cellular processes such as cell survival and proliferation. We also found that these Ca²⁺ signals depended on influx of extracellular Ca²⁺ through mechanosensitive channels as both Ca²⁺ chelation and gadolinium chloride (a mechanosensitive channel inhibitor) abolished the response after force application. Similar Ca²⁺ transients were induced by force application to anti-N-cadherin antibody-coated magnetite beads, indicating N-cadherin alone could trigger the signal. Furthermore, these force-induced cellular signals may mediate strengthening of cell-cell connections since force application induced polymerization of actin, a cytoskeletal protein at the cell-cell contacts and this actin remodeling response was inhibited by buffering intracellular Ca²⁺ fluxes. With the use of specific gap junction inhibitors, our major finding is that mechanical forces applied to intercellular junctions induce robust Ca²⁺ signals that are independent of gap junctions. To the best of our knowledge, this is the first study showing that forces transmitted specifically through cadherins can activate a second messenger system and increase cytoskeletal polymerization. This study advances our understanding of how controlled physiological forces lead to tissue remodeling and how pathological forces lead to tissue adaptation and repair.



2002 Annual Session
Philadelphia, Pennsylvania, USA

Fax: 011-52-5-659-32-39
Email: salgarlop@hotmail.com
Pages: 1

DATE: March 28, 2002

TO: Dr. Salvador Garcia-Lopez
Venezuelan Autonomous University

FROM: Orhan Tunçay
Chair, Council on Scientific Affairs

RE: Oral Research Abstract Presentation
2002 Annual Session, Philadelphia, Pennsylvania

Presentation of your Oral Research Abstract entitled: *"Interleukin-10 Released by Mouse Osteoblasts: A Preliminary Report"*, at the 2002 American Association of Orthodontists, Annual Session has been scheduled for 11:00am in Room 202A of the Pennsylvania Convention Center, Level 200. These presentations are held on Monday, May 6, 2002.

Each presenter is allotted ten minutes for presentation and five minutes for questions and answers. A moderator will be present to introduce each presenter and to monitor each presenter's time. Three screens, three slide projectors, a computer projector for PowerPoint, a laser pointer, and a podium microphone will be available for use during the presentation.

As a reminder, participants are requested not to distribute advertising materials. Only non-commercial promotion is allowed.

If you have any questions regarding the Oral Research Abstract presentation, please contact Dr. Orhan Tunçay at the AAO Central Office at 314-993-1700 or 800-424-2841.

OT:JP pw

American Association of Orthodontists

1000 N. 17th St., Philadelphia, PA 19103 • 314-993-1700 • 800-424-2841

102nd Annual Session

SYNERGY

Can Make It Happen

- Executive Program
- New Excellence in Orthodontics Luncheon
- Opening Ceremonies & Dinner
- Pre-Conference Activities
- Carvel Reception
- Registration & Check-In
- Breakfast & Coffee
- Registration & Check-In
- Breakfast & Coffee

ON-SITE PROGRAM



AMERICAN ASSOCIATION OF ORTHODONTISTS

Interleukin 10 released by murine osteoblasts: a preliminary report.
GARCIA-LOPEZ S., VILLANUEVA-R., MONTAÑO L., MASSO F., RAMIREZ V., BOJALIL R.
Metropolitan Autonomous University and National Cardiology Institute, Mexico City.

Muscles and endothelial cells like bone function are modulated by mechanical forces, it has been suggested that osteoblasts may play an important role in the control of bone remodelling in response to mechanical stress that occurs during orthodontic movement or during the orthopaedic treatment, the cellular mechanism involved in the transduction of biomechanics forces into molecular events have demonstrated that Interleukin-1 (IL-1) and tumour necrosis factor (TNF) induced Interleukin-6 (IL-6) production in murine and human osteoblasts when these cells are stimulated by mechanical stress or by hormones. The aim of this study was to examine the stimulation of murine osteoblasts under organ culture condition to respect of Interlukin-10 (IL-10) production. Calvarias from 1-2 day new-born balb / c female mouse were obtained, frontal and parietal bones were removed and exposed to timed digestion with trypsin. The cells released were cultured in F-12 / Dulbecos's modified eagle media, containing 10% foetal calf serum and antibiotics. Incubation was carried out at 37°C. in a 5% CO₂ / 95% air. Media was collected for determination of IL-10 by the enzyme-linked immunoassay (ELISA) at 0, 24, 48, 72 and 96 hours. Results have shown that murine osteoblasts stimulated mechanically released great amounts of IL-10 when are compared with the control (550 pg/ml $p < 0.01$). The addition of a hormone (2 µg/ml of oestrogen) to the cultured osteoblasts demonstrated the inhibition of IL-10 at 24 hours ($p < 0.0001$). This *in vitro* study suggests an evidence that IL-10 might exert at least part of their influence in the bone remodelling.

Change of Myosin Heavy chain mRNA in muscles after experimental advancement of mandible. HARZER, W.¹; Büttner, C.²; Gedrange, Th.¹; Luck, O.¹
¹Department of Orthodontics, ² institute of Immunology, TU Dresden, Germany

The aim of the investigation was to analyse the proportion of myosin-heavy chain (MHC) m-RNA in type I (slow twitch) and type IIb (fast twitch) fibres during sagittal advancement of the mandible in pigs by competitive polymerase chain reaction (PCR). The experiment were carried out on 10 week old pigs (six test animals were fitted with acrylic bite blocks for permanent advancement of mandible, six controls) over a 28-day period. Using the tissue samples from seven different regions, anterior (M1), medial (M2) and posterior (M3) region of m. masseter, anterior (TP1) and posterior (TP2) region of m. temporalis, the medial pterygoid (PM) and the geniohyoid (GH) muscle, total RNA was extracted. After reverse transcription competitive RNA for type I and Type IIb were produced. In the anterior part of m. masseter increased the content of type I MHC from 271 pg / µg total RNA to 662 pg / µg total RNA and the anterior part of m. temporales increased the content of type I MHC from 222 pg / µg total RNA to 342 pg / µg total RNA. No change of type I was found in the other regions. With the competitive PCR can be shown the quantification of the type I and type II MHC m-RNA shift after experimental advancement of mandible.

It is concluded that mechanical stress resulted in a fast-twitch to slow twitch transition.

American Association of Orthodontists

Book of Paper – Volume 10

Research Award Papers

Research Abstract Papers



102nd Annual Session
Philadelphia, Pennsylvania
May 3-7, 2002

Oral Abstract Research Presentations

Oral Abstract Research Presentations

Monday, May 6
Session 1
10:30am-4:30pm
PCC - 202A

10:30am

Orthodontic Treatment Outcome Using the ABO Grading System for Dental Casts

Hesham Amer, D. Poulton
Riverside, CA, USA

10:45am

Effects of RGD Treated Biomaterial on Osteoblast Attachment and Transduction of Mechanical Forces

Elisabetta Ada Cavalcanti-Adam, I. Shapiro, E. Macarak, R. Composto, C. Adams
Philadelphia, PA, USA

11:00am

Interleukin-10 Released by Murine Osteoblasts: A Preliminary Report

Salvador Garcia-Lopez, R. Villanueva, L. Montano, V. Ramirez, R. Bojalil
Mexico City, Mexico

11:15am

Level of Interleukin 1-B in Gingival Crevicular Fluid During Canine Distalization

Seda Gursoy Haydar, S. Bulut, C. Sesen
Ankara, Turkey

11:30am

Effect of Experimental Tooth Movement on Cell Differentiation in the Periodontium

* Hanadi Nusair, P. Lekic
Winnipeg, Manitoba, Canada

11:45am

The Effect of Vitamin D with Calcium Gluconate and PGE2 on Root Resorption Following Orthodontic Tooth Movement in Rats

Massoud Seifi, B. Eslami, M. Naziri
Tehran, Iran

1:30pm

Stability of Mandibular Advancements in Bimaxillary Orthognathic Surgery with Rigid Internal Fixation

Adriano M. Araujo, M. Gabrielli, A. Santos-Pintos, L. Gandini, P. Sakima
Sao Jose Dos Campos, SP, Brazil

1:45pm

Stability and Relapse of Orofacial Deformities After Orthognathic Surgery

Umberto Ceragiola, V. Chiglione, K. Nishiyama
Inveruno, Milano, Italy

2:00pm

Periodontal Status Following Surgical Orthodontic Alignment of Impacted Maxillary Incisors by a Closed Eruption Technique

Stella Chaushu, A. Becker, I. Brin, Y. Ben-Bassat, Y. Zilberman
Jerusalem, Israel

2:15pm

The Effect of Gingivoperiosteoplasty on the Outcome of Secondary Alveolar Bone Graft

Yuki Sato, B. Grayson, I. Barillas, C. Cutting
New York, NY, USA

2:30pm

Determination of Temporal Expression of Molecules Involved in Mineralization Process

Maria Lorena Garrido, H. Arzate
Mexico City, Mexico

2:45pm

Mandibular Deficiency in Knockout Mice Lacking Bone Sialoprotein Expression

Shiva Shadmand, D. Woodside, P. Rossouw, J. Aubin
Toronto, Ontario, Canada

3:00pm

Midface Distraction Osteogenesis in Adolescent Midface Deficiencies

Ursula Hirschfelder, S. Schultze-Mosgau
Erlangen, Bavaria, Germany

3:15pm

Cephalometric Comparison Between Children with Enlarged Tonsils and Adenoids

Renato Parsekian Martins, A. Santos-Finto, L. Martins, D. Ravelli, L. Gandini
Araquara, Sao Paulo, Brazil

3:30pm

The Comparison of the Lateral Cephalograms Taken in Natural Head Position and 5 Degrees Flexion and Extension of the Head

Hossein Ravanmehr, N. Ravan-deh
Tehran, Iran

3:45pm

The Craniofacial Characteristics in Pierre Robin Sequence

Sunjay Suri, B. Ross, B. Tompson
Chandigarh, India

4:00pm

Transverse Analysis of Craniofacial Morphology in UCLP Families

Young Jooh Yoon, R. Tallents, S. Kyrkamides
Rochester, NY, USA

* denotes financial and/or beneficial interest



Certificate of Appreciation

Presented to

S Garcia-Lopez, R E Villanueva, J Bustos,
R Bajalil, L Macotela-Diaz, A Cortes*

in recognition of an invaluable contribution
to the Scientific Programme of the
FDI Annual World Dental Congress
Mexico City

28 October – 1 November 1999

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'J Monnot'.

Dr Jacques Monnot
President
FDI World Dental Federation

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'E Acuña'.

Dr Ernesto Acuña
Chairman
FDI Local Organising Committee

FDI

MEXICO

1999

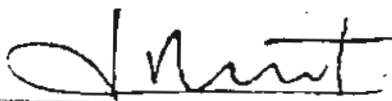
Certificate of Attendance

This is to certify that

SALVADOR GARCIA LOPEZ

has attended
the FDI Annual World Dental Congress
Mexico City

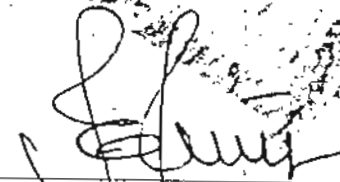
28 October – 1 November 1999



Dr Jacques Monnot

President

FDI World Dental Federation



Dr Ernesto Acuña

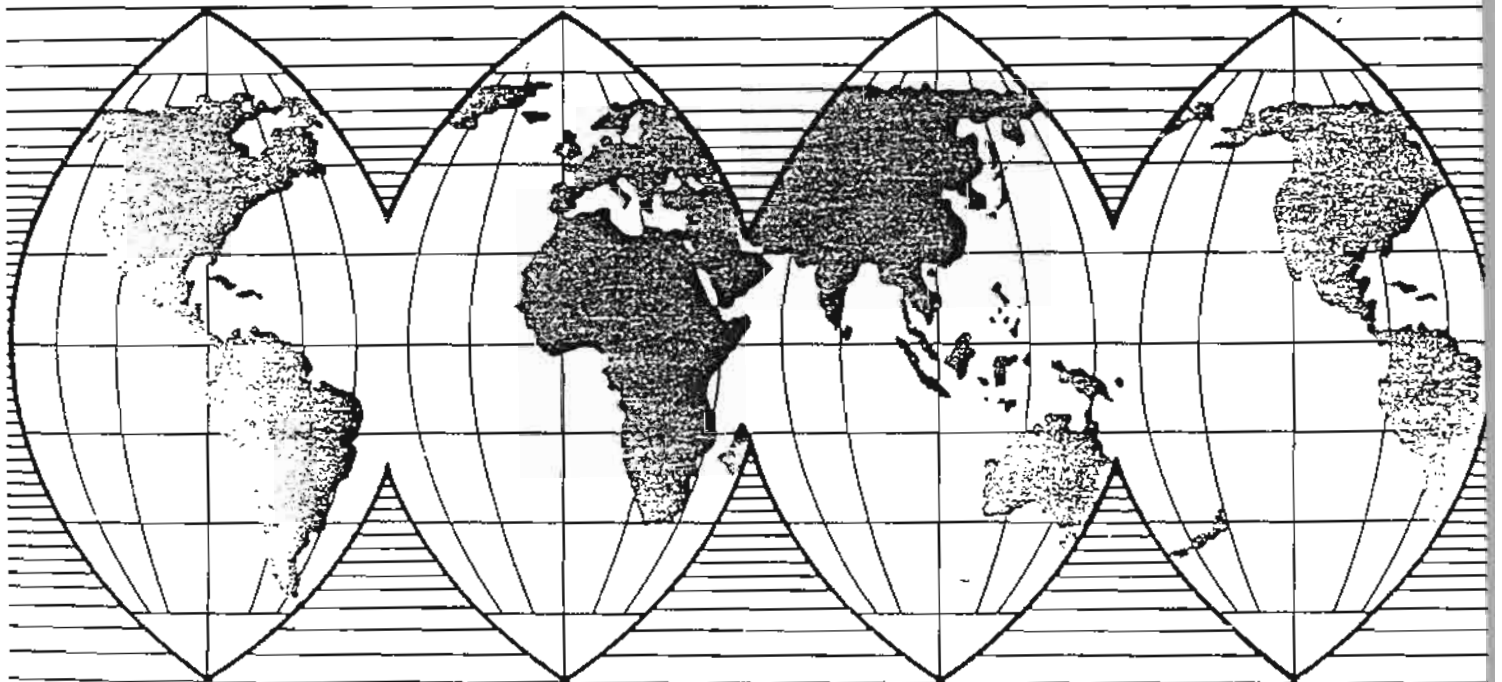
Chairman

FDI Local Organising Committee

INTERNATIONAL DENTAL JOURNAL

Volume 49 • Number 5 • October 1999

fdi 
1900-2000



**Oral fungal and viral infections in HIV patients -
Mexico City Congress Abstracts**

FDI World Dental Press Ltd

Frontal cephalometric features in patients with hemifacial microsomia

O Ortega-Oteo, M Agullar-Saavedra, M Yudovich-Burak, S Garcia-Lopez, J Quirós-Barríos
Calle, Tlalpan 4300/Tlalpan 14000, Mexico

The aim of this study was to correlate the upper maxillary complex deformity, nasal cavity and orbits with the degree of deformity in hemifacial microsomia. Forty-five frontal and panoramic radiographs from patients who were referred to the Orthodontic Department at the Manuel Gea Gonzalez General Hospital, distributed by sex and age and subdivided into three groups according Pruzansky's classification were used. Cephalometric analysis (Rickets) was traced using planes and angles measurements to correlate the upper facial skeleton with the lower face. Results revealed a direct relation between the mandibular Pruzansky's deformity degree regarding the vertical and transversal maxillary asymmetry, nasal cavity and orbit ridge in the group studied according to Pearson's correlation coefficient statistics analysis ($P < 0.001$). It is suggested that the assessment of the upper and lower maxillary skeleton should be considered in the diagnosis and treatment plan of such disease.

Degree of bending of newly formed bone posterior to mandibular distraction using a chin cup

M Yudovich-Burak, M Agullar-Saavedra, J Escobar-Molina, F Molina-Montalva

Playa Gaviotas 16 Col. Reforma Iztaacihuatl 06840, Mexico City

Early distraction osteogenesis treatment permits the elongation of the deformed mandible but in some instances alters the occlusion and creates open bites. The use of high pull chin cup therapy posterior to mandibular distraction permits us to diminish, prevent and correct the secondary deformed growth potential in these patients. We analysed eight patients with hemifacial microsomia through panoramic, lateral and anteroposterior cephalometries, before and after the use of the high pull chin cup therapy. Results were as follows. 300g of force applied to the deviated side determines the rotation pattern and degree of flexion of the newly formed bone, while compensatory changes in the mandibular ramus and corpus length also occur in the non affected side. A remarkable correction of the mandibular growth curve was achieved. Early treatment of mandibular asymmetries with distraction osteogenesis and high pull chin cup therapy gives the patient a satisfactory functional and aesthetic appearance.

An evaluation of the influence of the mandibular third molar on arch length and postretention crowding

Abraham Lifshitz

The role of the mandibular third molars in postretention crowding has provoked much speculation. The purpose of this study was to determine the influence of the mandibular third molar on the arch length and the alignment of mandibular incisors during mean postretention period of two years. Posttreatment and postretention mandibular casts of 28 subjects were divided in to four groups according to the presence or absence of mandibular third molars, and treated with or without extraction of two premolars in the mandibular arch. The parameters selected for statistical analysis were: presence of mandibular third molars, arch length, and lower incisor crowding. There was no statistically significant difference in the decrease of arch length between the groups with or without third molars. It was concluded that the mandibular third molars appear not to have an influence on the decrease of arch length and lower incisor crowding during the postretention period.

Facial growth in children from Yucatan, Mexico

Fernando Jorge Hernandez Tello

Calle 51 #555-J Por 80 Y 82 Merida, Yucatan 97000 Mexico

The aim of this research was to establish facial growth tendencies in children from a region of Mexico. A non-probabilistic sample of 226 cephalograms of type-subjects of ages ranging from 7-14 years, born in Yucatan state and Angle's class I molar relation, without caries, rotations and previous orthodontic treatment was taken. They were divided according to age group and sex. Independent variables were age and sex; dependent variables were Y axis, Bjork's polygon, and PFH/AFH ratio. General measures results were Y axis 67.66°, sella = 126.62°, articular = 141.77° gonion = 125.66°, sum = 394.06°, PFH = 73.21 millimetres, AFH = 113.13 millimetres, and PFH/AFH ratio = 64.73%. ANOVA and student's t analysis were run. The results obtained showed the growth tendencies in the children from this Mexican region and allowed us to elaborate a model of the growth tendency of these children.

Mandibular response analysis in orthodontics

Sergio A Cardiel-Rios, Marcelo Gastelum Gomez-Palacio

Av. Lazaro Cardenas #1780 Col. Chapultepec Sur CP 58260, Morelia, Mich. Mexico

The practice of orthodontics has increased markedly and is now practised by an increasing number of specialists. Sometimes though, the work done by the orthodontist with university training and that done by the general dentist cannot be differentiated. Therefore, dentists themselves do the orthodontic work. There are basically two types of orthodontic treatment, either with or without expansion of the dental arch. While the former reports a long term stability rate exceeding 90%, the latter is responsible for what has been known as the 'orthodontic look'. This presentation describes Dr. George S Harris' simple analysis of mandibular growth and response that he has developed and which has been used over the past thirty years. Since the orthodontist can modify the direction of the patient's growth potential favourably or unfavourably the mandibular response analysis monitors these changes.

An *In vitro* model to study bone turnover with mechanical stimuli

S Garcia-Lopez, R E Villanueva, J Bustos, R Bojalil, I Macotela-Diaz, A Cortes

Cerro del Hambre, 52-0-12, Coayacan 04320, Mexico

Mechanical forces are applied in the correction of dentofacial discrepancies and dentoalveolar malocclusions during orthodontic tooth movement, nevertheless the cellular mechanism involved in the translation of clinical forces into biological responses are poorly understood. The purpose of this study was to assess a molecular mechanism in the signal transduction pathways of the regulation of bone turnover during mechanical stress. Results may suggest that human clonal osteoblast-like cells produced 1L-18 more rapidly in response to mechanical force at 24 (13.7 ± 1.2 pg/ml) and 48 hours (21.2 ± 1.9 pg/ml) compared with human fibroblast at 24 (4.12 ± 0.9 pg/ml) and 48 hours (30.4 ± 1.2 pg/ml; $P < 0.001$) respectively. The selective gene expression of 1L-18 in both groups have been demonstrated to be influenced by mechanical stimulation *in vitro*.

Facial changes in children using maxillary orthopaedics

C D Jose Solon Cisneros Jimenez

Lazaro Cardenas 2 - 1205 bis col. Centro CP 06000, Mexico

In the literature there are some studies in relation at the facial changes in maxillary expansion in orthopaedics, but few if any of them report clinical changes in the faces of the children. This study had the objective of recording the facial changes in 60 children using sagittal apparatus in maxillary orthopaedic expansion. The study involved taking five facial planes over a three month period using a scalla vernier and facial mask made for the precision measurement of the planes.

Microbiology of the root canal

Tatiana Caraccioli, Gerson Caraccioli

Miguel Serrano # 6 Col. Del Valle 03100 Mexico

Microbes are, have been and will continue to be involved in pulpal and periradicular pathology. A dynamic and didactic presentation showing the pathways of pulpal and periradicular infections, the microbial interaction and the tissue response will be presented. It is intended to be a short trip through the dentinal tubules, reaching the pulpal tissue, viewing the inflammatory response and the environmental changes in the CC, content, the neural response, the vascular changes and the effects of the microbial interaction and colonisation. Knowledge of all these processes will lead to an improved management of pulpal and periradicular pathology.

European Journal of Orthodontics

Volume 21 · Number 5
October 1999

Oxford University Press

root resorption was observed, damaging 16 teeth (six central and 10 lateral incisors).

CONCLUSIONS: The prevalence of impacted canines observed in the examined population appears to be similar to the data available in the literature. Quite high however seems to be the prevalence of tooth resorption caused by impaction and the following ectopic eruption of the canines. It would appear that careful evaluation of the position of the unerupted canines should be performed at an early age and that subjects presenting anomalies in the path of eruption should be carefully followed radiographically to prevent or intercept possible future damage.

60 BREATHING TESTS IN CHILDREN WITH AND WITHOUT MOUTH-BREATHING SIGNS

G Fratto, E Barbato, D Proietti, M P Poggesi, D Cannoni. Department of Orthodontics, University of Rome, La Sapienza, Italy

AIM: To compare clinical and rhinomanometric parameters in two groups of children with and without mouth-breathing signs.

SUBJECTS AND METHODS: The case group consisted of 30 subjects (16 females and 14 males (mean age 9.4 ± 1.8 years), showing at least four of the following signs: anamnesic history, pale face, underdeveloped middle-face, small and poorly developed nostrils, abnormal lip colour, texture and posture. The control group consisted of 20 subjects, 12 females and 8 males (mean age 8.7 ± 1 years). Clinical breathing tests and anterior active rhinomanometry were performed by three clinicians, none of whom participated in the selection of groups. Diagnostic consistency evaluated by Kappa-test was good. In order to evaluate significant differences between the groups a Chi square test was performed.

RESULTS: No significant differences were found with respect to any breathing test. Quinn test, an increased respiratory frequency was observed in 23.3 per cent of subjects (versus 20 per cent for control group) holding lips closed and in 26.6 per cent of case group (versus 15 per cent control group) blocking one nostril to test the opposite side, 6.6 per cent of case group showed unilateral nasal obstruction. Rosenthal test, an increased respiratory frequency was found in 43.3 per cent of case group (versus 20 per cent control group). Gudim test, 50 per cent of case group (versus 25 per cent control group) showed a poor reflex control of the diaphragm muscles. Anterior active rhinomanometry did not show an increase of total nasal resistance in both groups, 26.6 per cent of case group (versus 15 per cent control group) showed an increase of unilateral nasal resistance.

CONCLUSIONS: Anamnesic data and facial features often support mouth-breathing diagnosis but clinical functional tests and/or rhinomanometry can result negative for nasal obstruction. Mouth-breathing may be due to acquired habits following previous rhinopharyngeal obstruction; this suggests that an abnormal pattern of respiration can persist even after elimination of factors causing nasal obstruction.

61 CRANIOMANDIBULAR DISORDERS: TREATMENT PLANNING USING THE ELECTROMYOGRAPH AND THE KINESIOGRAPH

U Garagiola¹, V Ghighone¹, M Fukai², School of Dentistry ¹University of Milan, Italy, and ²University of Tokyo, Japan

AIM: To show how of the electromyograph and the kinesiograph help to diagnose and treat masticatory muscle pain and temporomandibular joint disorders (TMD).

SUBJECTS: Twenty nine patients with craniomandibular disorders symptomatic at the time of the examination were compared with a group of previously studied healthy subjects.

METHODS: TMD is a collective term embracing a number of clinical problems that involve the masticatory musculature and the temporomandibular joints. There are many known contributing factors to the complex multifactorial nature of TMD: traumatic, anatomic, pathophysiological, neuropathic, psychogenic and psychosocial. Therefore dysfunctional patients require an interdisciplinary collaboration between orthodontics, prosthodontics, periodontics, oral and maxillofacial surgery, implantology. All TMD patients and controls were evaluated using electromyography and kinesiography. The bioelectric processor, or EM2 electromyograph is a diagnostic instrument used to measure muscle activity at rest and during function. The K6 kinesiograph is used to measure and record movements of the jaw in all three dimensions.

RESULTS: TMD patients have distinctly different patterns of muscle activity than asymptomatic subjects. In addition to restrictions and deviations, limitations in jaw movement are important diagnostic criteria. Successful treatment reduces the irregularity and severity of muscle dysfunction and improves mandibular movements. Comparison of pre- and post-treatment results demonstrate treatment efficacy and effectiveness.

CONCLUSIONS: The complex aetiology of TMD requires an interdisciplinary approach for successful diagnosis, treatment and maintenance. Electromyography and kinesiography are extremely valuable for initial patient evaluations, as well as for monitoring treatment results.

62 COMPARISON OF TWO TYPES OF HUMAN OSTEOBLASTS UNDER CYCLIC STRAIN *IN VITRO*

S Garcia-Lopez, R E Villanueva, Molecular and Cell Biology Unit, Universidad Autonoma Metropolitana, Mexico City

AIM: To examine the effects of mechanical stress in human osteoblasts and a human osteosarcoma cell line under organ culture conditions with respect to interleukin production.

METHOD: Human osteoblasts were obtained from bone of cortical plate during third molar extraction and an osteosarcoma cell line (SaOs-2 cells) from the American typed cell collection (ATCC). After digestion of the former, cells were seeded at a density of 2.5×10^4 cells/cm² in tissue culture

flasks and grown at 37°C in a humidified atmosphere, 95 per cent air, 5 per cent CO₂ in 1:1 Ham's F12-Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10 per cent foetal calf serum and antibiotics. After reaching confluence during the second passage, the cells of both groups were removed with trypsin-EDTA and placed in groups of 10 cultures randomly allocated on petriperm dishes under cyclic strain of 5 seconds every 1.5 minutes during 8, 24, 48 and 76 hours. Media were collected in a longitudinal manner for determination of Interleukin-1 β (IL-1 β) by enzyme-linked immunoassay.

RESULTS: During mechanical stress of both types of cells there was no production of IL-1 β at 8 hours. However after 24 hours the group of osteosarcoma cells could be detected in media (13.7 \pm 1.2 pg/ml) and were significantly different at 48 hours (21.2 \pm 1.9 pg/ml) compared with media of human osteoblasts (3.2 \pm 0.8 pg/ml; $P < 0.05$).

CONCLUSION: The findings of the present evaluation can be interpreted to show that human osteosarcoma cell line release large amounts of IL-1 β in comparison with normal human osteoblasts under cyclic strain.

63 EVALUATION OF BONE DENSITY USING PANORAMIC RADIOGRAPHS

T Gedrange¹, V Hietschold², W Harzer¹, K Kohler².
Departments of ¹Orthodontics and ²Radiology,
Technical University, Dresden, Germany

AIM: Investigation of bone density in different areas of the mandible using panoramic radiographs (OPG) as a preparatory step in the field of implantology and orthodontics.

MATERIAL: OPG and computed tomographic (CT) images of young male patients were evaluated. These normalized values were compared with the CT Hounsfield values.

METHODS: The patients were radiographed in a Siemens device. Photometrically measured OPG film densities were normalized to X-ray dose (mAs product). The dose distribution in air was determined by imaging of an aluminum wedge. Only regions with a near constant dose in air were included in the evaluation. Thickness and distance measurements were performed on the CT images.

RESULTS: The thickness of the mandible and compacta showed only small inter-individual differences. A good correlation between film density, tooth roots and compacta, against the distance between root and compacta, could be shown. Measurements in the region of the upper jaw bone did not result in useful data due to superimposition with the palate and lips.

CONCLUSION: Since bone density between tooth roots and compacta is strongly influenced by the distance between root and compacta, and the film density in this region is in good correlation with this distance, it can be concluded that the measured film densities are suitable for determining the bone status of the lower jaw bone.

64 TEMPOROMANDIBULAR JOINT EFFECTS OF ACTIVATOR TREATMENT.

A PROSPECTIVE MAGNETIC RESONANCE IMAGING STUDY

B Geers, S Ruf, H Panzerz, Department of Orthodontics, University of Gressen, Germany

AIM: To assess the effect of activator treatment on the position of the condyle and the articular disc.

SUBJECTS: Thirty Class II division 1 patients treated with an activator.

METHOD: Magnetic resonance images (MRIs) of both temporomandibular joints (TMJs) were taken before and after 1 year of activator treatment. The MRIs were analysed metrically to assess possible changes in the relative position of the condyle, disc and fossa.

RESULTS: None of the subjects exhibited any signs or symptoms of temporomandibular disorder either before or after treatment. On average the articular disc ($P < 0.05$) and the condyle (ns) showed a slightly anterior position relative to the fossa after 1 year of activator treatment. This was probably due to the fact that the Class II jaw base relationship although improved, could not be normalized in all subjects during this short observation period.

CONCLUSION: Activator treatment does not seem to have an adverse effect on the TMJs.

65 ULTRASOUND BONE MEASUREMENT IN ORTHODONTIC PATIENTS WITH CONGENITALLY MISSING TEETH

V Ghigione, C Maspero, U Garagiola, Department of Orthodontics, University of Milan, Italy

AIM: To estimate bone mineral density (BMD) in areas with congenitally missing teeth by the densitometer to predict if the bone is suitable for successful orthodontic/implant therapy.

SUBJECTS AND METHODS: Twenty males and 14 females with congenitally missing teeth (aged between 14 and 27 years) were investigated using the Achilles densitometer. All the patients required orthodontic treatment. Measurements on the os calcis included speed of sound (SOS), broadband ultrasound attenuation (BUA) and a calculated stiffness index. Ultrasound measurements were correlated with BMD of the jaws on the panoramic films and on the TAC to obtain a complete evaluation of bone typology and reproducible and predictable correlations.

RESULTS: A significant correlation between TAC, panoramic film and ultrasound bone measurement was found. BUA showed a correlation with age and was more pronounced in women. There was no significant difference in males and females in SOS values. SOS and BUA values decreased with age in males, while in females SOS decreased with age but not BUA. The stiffness index decreased with age in both sexes. Sex differences for BMD were not significant. In patients whose BUA, SOS and stiffness values were significantly lower than in normal controls, a supplemental

therapy before a suitable CONCLUSION: Imaging C enhancement of lurtb bone me choice. U orthodo the patie

66

OF NITR V Ghigli Orthodo

AIM: To a period to evalu stages of tooth lo seventy become situation the vand rehabili MATER to uprig 2) patier METHC combina titane) by mean **RESULT** provides an effect period upright CONCL transfers addition upright

67

D Gorm Orthodo Polard

AIM: C 1 or 2 y follow B SU BIEC and: 7

group. The Bonferroni correction for multiple testing was applied.

RESULTS: Compared with chronological age the dental age gave an over-estimation ranging from 0.19 years (in the youngest age group of the boys) to 1.00 years (in the 8-9-year-old group of the boys). Almost all over-estimations were statistically significant. In the 14-15-year-old boys, an underestimation was found due to the borders of the original conversion tables. New table of age scores were constructed from this sample. The accuracy of the ages predicted with the new tables was higher than when predicted with the original tables.

CONCLUSION: A new scoring system for dental age determination that provides more accurate predictions in a Belgian population has been developed.

Demirjian A, Goldstein H, Tanner M 1973 A new system of dental age assessment. *Human Biology* 4: 219-227

176 NICKEL RELEASE CONNECTED TO ACIDIC CORROSION OF

(SUPER)ELASTIC ORTHODONTIC ARCHWIRES

A Végli, L Wojnárovits, Department of Orofacial Orthopedics and Orthodontics, Heim Pál Children's Hospital and SZIKKI Laboratory, Budapest, Hungary

AIMS: Immune response, or contact dermatitis, caused by nickel has often been reported during the use of conventional orthodontic appliances (stainless steel wires, custom-made headgear or lip retractors, retainers and brackets). The new (nickel-titanium alloy) generation of archwires operate by means of the activation of a martensitic reaction. All these wires constitute a constant force in a wide range of deflection, requiring the wire to remain in the mouth for a long period.

METHOD: Archwire products were tested with the ion probe analysis. Five of them showing the same distribution pattern were exposed to an acid corrosion test. The surface changes were analysed by scanning electron microscopy.

RESULTS: The dissolved nickel was calculated by the surface unit. The different samples showed a release ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) as follows: Ni-Ti 0.259, Copper Ni-Ti 0.535, Neo-Sentalloy 1973 Sentalloy S 284, Rematitan Light 34 736. The morphology of surface changes related to the amount of dissolution indicated a type of flattening of the roughness which was especially observed in Sentalloy and Rematitan Light wires.

CONCLUSIONS: The results indicate that elastic archwires, based on nickel-titanium alloys, used in their 'as-received' condition, may corrode in the oral environment releasing remarkable amounts of nickel and can cause biological reactions including local contact hypersensitivity. Nevertheless the constant emission of nickel is probably below the average dietary intake excluding systematic effects. The surprising result is that despite the same chemical composition the amount of nickel dissolved showed a wide difference (even 1 000 times) in range which is probably due to the

physical procedure used during the manufacture of different products.

177 ORTHODONTIC TREATMENT NEEDS IN SCHOOLCHILDREN IN SOUTH EAST MEXICO CITY

R E Villanueva-Arriaga, S Garcia-López, S Macín-Cabrera, M E Rodríguez, Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Mexico City

AIMS: To assess the need for orthodontic treatment in schoolchildren in South East Mexico City.

SUBJECTS AND METHODS: A random sample of 176 schoolchildren between 10 and 12 years of age without a previous history of orthodontic treatment derived from a preventive dental programme. The Index of Orthodontic Treatment Need (IOTN) was used by two previously calibrated examiners in order to estimate the orthodontic treatment need. The index has two components, the Aesthetic (AC) and Dental Health (DHC). The DHC is divided into five grades: Grade 1 none, grade 2 little, grade 3 moderate, grade 4 great, and grade 5 very great. Additionally the subjects were to give their own view on their dental appearance on a scale of 1-10 by mean of photographs of the AC.

RESULTS: Differences between boys and girls were not statistically significant and the ratings for the DHC of IOTN for the schoolchildren were 34.2 per cent in need of treatment, 57.6 per cent borderline need, and 8.2 per cent not in need for treatment. The second component was not recorded because the subjects had difficulty in understanding the AC of IOTN.

CONCLUSION: Based on the findings of this study it is suggested that the DHC of IOTN is a good tool to assess the need for orthodontic treatment.

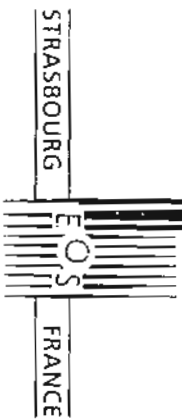
178 RADIUS UNION AS AN INDICATOR FOR COMPLETION OF VERTICAL DENTOALVEOLAR GROWTH

M Vydra, H Pancherz, Department of Orthodontics, University of Giessen, Germany

PROBLEM: The placement of a tooth implant before cessation of vertical dentoalveolar growth leads to intra-occlusion of the artificial tooth.

AIM: To ascertain if the skeletal maturity stage, Radius union (R_u), can be used as indicator for vertical dentoalveolar growth completion.

MATERIAL: Hand-wrist radiographs and lateral head films taken at the same occasion from 56 subjects (31 males and 25 females) > 3 years out of orthodontic treatment. From each individual three to four pairs of radiographs existed with approximately 1 year between the different film pairs. Pair 1: 1 year before P ; Pair 2: at R_u ; Pairs 3 and 4: 1 year and/or 2 years after R_u respectively.



June 23/26 1999

The European Orthodontic Society - EOS

present this Certificate in recognition of the valuable contribution of

Dr. Garcia-Lopez S. - Mexico

to the Scientific Programme of

the 75th Congress held in Strasbourg, France

June 23rd - 26th, 1999

A handwritten signature in cursive script, appearing to read 'C.J. Bolender'.

C.J. Bolender, President

May 17, 1999

Dr. Salvador Garcia Lopez
Dr. Rosina E. Villanueva
Metropolitan Autonomous University
Cerro del Hombre 2-C-12
Mexico City 04320
Mexico

Dear Scientific Posterboard Participant(s):

Thank you for participating as a Scientific Posterboard Presenter at the American Association of Orthodontists 99th Annual Session, May 14-18, 1999 in San Diego, California, USA.

The Planning Committee recognizes that the real success of the Annual Session is active involvement by individuals in programs such as this. Your Scientific Posterboard was an important contribution. We appreciate the time spent in preparing your scientific information and trust other attendees benefited from your presentation.

Again, thank you for your participation in this momentous event and look forward to your continued participation at the 100th AAO Annual Session in Chicago, Illinois, USA.

Sincerely,



Lee R. Boese
General Chair, 99th AAO Annual Session

Charting the COURSE

GOALS FOR CENTURY II

On-Site Program

SATURDAY
DOCTORS'

SUNDAY
DOCTORS'

MONDAY
DOCTORS'



American Association of
Orthodontists

99TH ANNUAL SESSION
SAN DIEGO, CALIFORNIA, USA
~~FRIDAY - TUESDAY~~
MAY 14 - 18, 1999

Scientific Posterboard Exhibit

MONDAY, MAY 17 & TUESDAY, MAY 18

79. A Study on the Position of Hyoid Bone
Makoto Kikuchi, Naoki Higurashi
(Narita, Chiba, Japan)
80. Effects of Horseshoe Expander
Hong-Suk Kim, Young-Jun Lee,
Young-Guk Park, Kyu-Rhim Chung
(Seoul, Korea)
81. The Effect of Orthodontic Force Application on Experimental Tooth Movement Rate and Root Resorption in Rat
Il-Gon Kim, Young-Jooh Yoon,
Kwang-Won Kim
(Kwangju, South Korea)
82. Effects of Thermocycling on Bracket Bonding Strength
Jong-Ghee Kim, Sang-Cheol Kim
(Chonju, Chonbuk, South Korea)
83. Force Decay of Intraoral Elastics Over Time According to Stretched Length
Jong-Ghee Kim, Jong-Sun Park,
Choon-Bong Lee
(Chonju, Chonbuk, South Korea)
84. A Study on Horizontal Reference Planes in Lateral Cephalogram in Korean Children
Kyung-Ho Kim, Ji-Yeon Lee, Jung-Yun Han
(Seoul, Korea)
85. Menarcheal Age Among Various Malocclusion Groups in Korean Women
Kyung-Ho Kim, Hee-Sun Yun, Eun-Sue Son
(Seoul, Korea)
86. Effects of the Horseshoe Appliance and Anterior J-Hook Headgear in Maxillary Excess
Su-Jin Ko, Moon-Young Oh, Young-Guk Park,
Kyu-Rhim Chung
(Seoul, Korea)
87. Defining the Amount of Cortisol in Saliva from 2-6 Year Old Children
Egbert Koerperich, Eve-Andrea Holtgrave,
Maria Mueller
(Berlin, Germany)
88. Excessive Tooth Aplasia in a Female Patient - Case Report
Ralph Kretschmer, E. Eisenmann, H. Loidl,
G. Neumann, E.A. Holtgrave
(Berlin, Germany)
89. Tooth Mobility Change of Ankylosed Tooth After Corticotomy During Orthodontic Treatment
*** Kazuo Kushimoto, Shigehiro Hioki,*
Shinsuke Ono, Kin-ichiro Niwa, Jun Adachi
(Matosu-gun, Gifu, Japan)
90. Bone Remodeling: A Total, Early, Orthopedic-Orthodontic Treatment Avoiding Flattened Profiles, Extractions, and Surgery
**Leon Kussick*
(Naples, FL, USA)
91. An Experimental Model for the Study of Intrusive Forces in Rats
Laura Marta Labate, Carlos R. Guardo,
Romulo L. Cabrini
(Buenos Aires, Argentina)
92. Deep Overbite Treatment in Patients Dolicocephalic Pattern
Laura Marta Labate, Carlos R. Guardo
(Buenos Aires, Argentina)
93. An Alternative Approach for the Evaluation of the Soft Tissue Profile
S. Seadat Lajevardiy, S. Salsali
(Tehran, Iran)
94. Timing for Application of Reverse Headgear to Correct Skeletal Class III Malocclusion
Ming-Hsien Lan
(Taipei, Taiwan, Republic of China)
95. Characteristics of Stretch-Activated Ionic Channels in G292 Osteoblastic-Like Cell
*** Sang-Kuk Lee, Seung-Uk Lee, Eun-Hee Kang, Soo-Byung Park*
(Pusan, Korea)
96. Arch Forms and Dimensions After Orthodontic Treatment by Premolar Extraction
Seung-Mi Lee, Young-Jooh Yoon,
Kwang-Won Kim
(Kwang Ju, South Korea)
97. A Study on Profile Change Concurrent with the Retraction of Anterior Teeth
*** Won-Yoo Lee*
(Wonju, Kangwon-Do, South Korea)
98. Early Treatment of Class II, Division 1 Malocclusion with Functional Appliance
** Li-Hsiang Lin, Chin-Sung Cien,*
Chi-Yang Tsai
(Taipei, Taiwan, Republic of China)
99. PGE2 and CAMP Level After Interparietal Suture Expansion
Wei Lin, R. Xie
(Guangzhou, Guangdong, China)
100. The Influence of Anti-Spee-Arches on the Vertical Dimension of Face
Hatto Loidl, Ralph Kretschmer,
Guenther Neumann, Eva-Andrea Holtgrave
(Berlin, Germany)
101. A Molecular Immunoassay of Human Osteoblast-Like Cells During Mechanical Stress in Vitro
Salvador Garcia Lopez, Rosina E. Villanueva
(Mexico City, Mexico)
102. The Relationship Between Root Mineralization Stages and Statural Puberal Growth
Ricardo Luiz de Lima Barbosa, V. C. Santana,
K. Faltin Jr., Ricardo Barbosa
(Sao Paulo, SP, Brazil)
103. Relationship Between Intermaxillary Suture and Midline Diastema
Suvannace Luppangporntarp
(Bangkok, Thailand)
104. Avaluation of Force Delivery by Elastomeric Chain and Permanent Deformity - In Vitro
Sissy Machado, Suelly Mendes
(Belem, Para, Brazil)
105. The Inverse Lip Bumper Appliance
Fierdavid Marchionni, Roberto Delli,
Cristina Grippardo, Simone L. Tulu'
(Rome, Italy)
106. Social Implications of Preventive Dentistry in Orthodontics
G. Masotto, FA. Miotti, G. Balestro
A. Ravara
(Padova, Italy)
107. Relationship Among Facial Types, Standing Position of Mandibular Molars and Mandibular Morphology Using CT Scanning
Toyohiko Masumoto, Ikumasa Hayashi,
Akira Kawamura, Kouji Yasuda,
Kazutake Kesai
(Matsudo, Chiba, Japan)
108. Corrosion Susceptibility of Coated Stainless Steel Direct Bonding Brackets
Claude G. Matasa
(Hollywood, FL, USA)

Abstract Form

9 9 T H A N N U A L S E S S I O N

RETURN TO:
American
Association of
Orthodontists

401 North
Lindbergh Blvd.

St. Louis, MO, 15
63141-7816

Fax: 314-993-6929

ATTACH ABSTRACT
FORM TO
APPLICATION

DEADLINES FOR SUBMISSION

Table Clinic Abstract

November 16, 1998

Scientific Posterboard Exhibit Abstract

November 16, 1998

Oral Research Abstract Presentation

November 16, 1998

A molecular immunoassay of human osteoblast-like cells during mechanical stress *in vitro*

García-López S., B.D.S., M.Sc. and Villanueva R.E., B.D.S., M.Sc.

Molecular and Cell Biology Unif. Metropolitan Autonomous University, Mexico City.

Although mechanical stress has long been recognised as an important factor in the regulation of bone remodelling, specially during orthodontic tooth movement, the molecular mechanism underlying these effects has remained obscure. A number of methods have been devised to apply forces *in vivo* to bone or *in vitro* to cells in order to assay the biochemical result of mechanical stimuli. In this report we have developed a method of cultured human osteoblast-like cells grown on petri dishes ($n=5$) capable of deformation. A cycle of cell deformation of 5 seconds every 1.5 minutes was carried out over 76 hours. The cellular perturbation in these cells was then compared to undeformed cells. ELISA assays were used to determined levels of Interleukin-6 (IL-6) production after 8, 24, 48 and 76 hours. At 24 hours, mean of IL-6 levels were elevated during mechanical stress (12.3 ± 2.1 pg/ml) and being significantly difference at 48 hours (19.3 ± 2.2 pg/ml) compared with control (12.3 ± 1.7 pg/ml). These results suggests that IL-6 may play an important role during bone remodelling in the early phases of orthodontic tooth movement. Understanding the cellular and molecular mechanism which cause bone to adapt to changes in its mechanical environment is essential for the practice of clinical orthodontics.

AUTHOR: (All correspondence will be sent to this person)

Name DR. S. GARCIA-LOPEZ

In Care of: _____
(Students, give cooperating instructor's name)

Address: CERRO DEL HOMBRE 52-C-12

City MEXICO CITY

State/Province: _____

Country: MEXICO Zip/Postal Code: 04320

Telephone: (52-5) 554-28-25

Fax: (52-5) 659-32-39

TYPE OF PRESENTATION: (check only one)

- Table Clinic
 Scientific Posterboard Exhibit
 Oral Research Abstract Presentation

Would you be willing to change the type of presentation if requested? Yes No

I have proofread this abstract and understand the obligation of submission.

Author's Signature

AAO USE ONLY

Date received

targeting
QUALITY CARE

Annual Session May 16-20, 1998 Dallas, Texas
May 18, 1998

AMERICAN ASSOCIATION OF ORTHODONTISTS

401 North Lindbergh Boulevard

St. Louis, Missouri 63143-2816

(314) 993-1700 (TDD) 424-2141

Fax (314) 993-2145

Dr. S. Garcia-Lopez
Drs. R.E. Villanueva
Metropolitan Autonomous University
Cerro del Hombre 52-C-12, Romero de Terreros, Coyoacan
Mexico City, 04320
MEXICO

Dear Scientific Posterboard Participant(s):

Thank you for participating as a Scientific Posterboard Presenter at the American Association of Orthodontists 98th Annual Session, May 16-20, 1998 in Dallas, Texas, USA.

The Planning Committee recognizes that the real success of the Annual Session is active involvement by individuals in programs such as this. Your Scientific Posterboard was an important contribution. We appreciate the time spent in preparing your scientific information and trust other attendees benefited from your presentation.

Again, thank you for your participation in this momentous event and look forward to your continued participation at the 99th AAO Annual Session in San Diego, California, USA.

Sincerely,

William Gaylord
William C. Gaylord
General Chair

ON-SITE PROGRAM

targeting

QUALITY CARE

98TH ANNUAL SESSION

DALLAS, TEXAS, USA

MAY 15-20, 1998



American Association of
Orthodontists

31. Treatment Planning with the Bending Art System Following the Direct Method
H. Fischer-Brandies, M.R. Ermert, A. Koeneke, W. Orthuber
Christian Albrechts University (Kiel, GERMANY)
32. Orthodontic Bonding to Stainless Steel Bands
Tim Foley, Alida Smisek, C. McNamara, S. Kofman
University of Western Ontario, Faculty of Medicine & Dentistry (London, Ontario, CANADA)
33. Space Closure Using the Segmented Arch Technique: Group A Anchorage
Marcia Regina Elisa Aparecida Schiavon Gandini, Ricardo de Souza, Ricardo Nakama, Joel Martins, Paulo Sakima
F.O.A./UNESP - Araraquara (Araraquara, SP, BRAZIL)
34. Class II, Division I Treatment Using Kloehe Headgear: A Cephalometric Evaluation
Luiz Gonzaga Gandini Jr., Joel Martins, Marcia Gandini, Lidia Martins
F.O.A./UNESP - Araraquara (Araraquara, SP, BRAZIL)
35. Ectodermal Dysplasia: A Multidisciplinary Approach
Umberto Gorogiolio, Valentino Ghiglione, Paolo Folegatti
University of Milan (Inveruno, Milan, ITALY)
36. Interleukin 1B Release by Human Osteoblasts - Like Cell Under Mechanical Stress In Vitro
S. Garcia-Lopez, R.E. Villanueva
Metropolitan Autonomous University (Mexico City, MEXICO)
37. Prognosis Equation and Reported Cases
Carlos Ricardo Guardo, Maria Eugenia Mateu, Aldo Alberto Casassa
Facultad de Odontologia (Buenos Aires, ARGENTINA)
38. The Effect of Etidronate on Alveolar Bone Remodeling in Dog Mandible
Kimberly E. Handick, Lawrence Garetto
Indiana University School of Dentistry (Indianapolis, IN, USA)
39. Relative Orthodontic Bracket Bond Strengths Measured in Three Testing Modalities
Oliver S. Harper, T.R. Katona
Indiana University School of Dentistry (Indianapolis, IN, USA)
40. Effects of Two Types of Orthodontic Appliances in the Treatment of Class II, Division I
Jose Fernando Costanha Henriques, Lihano Maltagliati, Guilherme Janson, Renato de Almeida, Marcos de Freitas
University of Sao Paulo (Bauru, Sao Paulo, BRAZIL)
41. The Association of Specific mEH and/or GSTM Polymorphisms with Phenytoin
Todd A. Hickman, James Hartsfeld Jr., Eric Everett
Indiana University School of Dentistry (Indianapolis, IN, USA)
42. Effects of Callus and Bonding on Strains in Bone Surrounding an Implant
Sarandeep Singh Huja, Hiahong Qian, W. Eugene Roberts, Thomas R. Katona
Indiana University School of Dentistry (Indianapolis, IN, USA)
43. A Retrospective Study on the Influencing Factors on Facial Patterns After Maxillary Protraction
Chung-Ju Hwang, Seung-Hyun Kyung, Jeon-Lyon Moon
Yonsei University College of Dentistry (Seoul, KOREA)
44. Shear Bond Strength and Failure Patterns according to the Thickness of Resin Base in Bracket Bonding
Hyeon-Shik Hwang, Jae-Hyuk Kim, Jeong-Tae Kim, Jong-Ul Kim
Chonnam National University Hospital (Kwangju, KOREA)
45. Change of Condylar Movements¹⁰ Using Intermaxillary Elastics
Takaji Iida
Osaka Dental University (Osaka City, Osaka, JAPAN)

► 98th Annual Session

► Deadlines for Submission

Table Clinic Abstract	November 17, 1997
Scientific Posterboard Exhibit Abstract	November 17, 1997
Oral Research Abstract Presentation	November 17, 1997
Doctors' Roundtable Abstract	October 17, 1997
Orthodontic Staff Roundtable Abstract	October 17, 1997

Return to:
 American Association of Orthodontists
 401 N. Lindbergh Blvd.
 St. Louis, MO, USA 63141-7816
 Fax: 314-993-6992

Attach to Application

Interleukin 1 β release by human osteoblasts-like cells under mechanical stress *in vitro*
 García-López S., B.D.S., M.Sc. and Villanueva R.E., B.D.S., M.Sc.
 Health Care Department, Metropolitan Autonomous University, Mexico City.

In spite of extensive research in animals and man, the exact mechanism by which teeth move during orthodontic treatment has still not been determined, histological changes have been well documented. The intra-cellular biochemical events have been examined, but the mechanisms for transcription of the physical forces into molecular events has not been clarified. We have examined cultured humans osteoblasts like-cell grown on petri dishes (n=5) capable of deformation with respect to inteleukin 1 β (IL-1 β) production. A cycle of cell deformation of 5 seconds every 1.5 minutes was carried out over 96 hours. The cellular perturbation in these cells was then compared to undeformed celis. Cells were grown to confluence in Ham's F12/DMEM media which contained 10% foetal calf serum, 100 μ g/ml streptomycin, 100 U/ml penicillin and 0.25 μ g/ml amphotericin; incubations were carried out at 37°C in 5% CO₂/ 95% air. Media was collected after 8, 24, 48, and 96 hours and stored at -20°C. until analysis. ELISA assays were used to quantify alterations in cellular production of interleukins. The results suggests that IL-1 β was raised when the cells were grown during mechanical perturbation at 48 hours (45.5 \pm 7.6 pg/ml) and being significantly difference at 72 hours (95.5 \pm 12.5 pg/ml; p<0.05). Further work should be conducted to improve the study of bone remodelling during orthodontic tooth movement.

Author: (All correspondence will be sent to this person)

Name DR. S. GARCIA-LOPEZ

In Care of: _____
(Students give cooperating instructor's name.)

Address: CERRO DEL HOMBRE 52-C-12

City: MEXICO CITY

State/Province: COYOACAN

Country: MEXICO Zip/Postal Code: 04320

Telephone: (52-5) 554-28-25

Fax: (52-5) 559-32-79

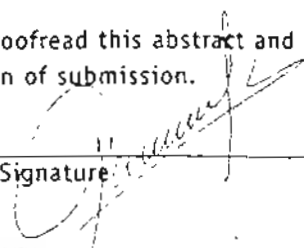
Type of Presentation: (check only one)

- Table Clinic
- Scientific Posterboard Exhibit
- Oral Research Abstract Presentation
- Doctors' Roundtable Discussion Breakfast
- Orthodontic Staff Roundtable Discussion Breakfast

Would you be willing to change the type of presentation if requested? Yes No

I have proofread this abstract and understand the obligation of submission.

Author's Signature: _____



AAO use only
 Date received