

DEPARTAMENTO DE ATENCIÓN A LA SALUD

LICENCIATURA EN ESTOMATOLOGÍA

TÍTULO

EVALUACIÓN DE LA MICROVIBRACIÓN EN CÉLULAS ÓSEAS EN
LA SÍNTESIS DE CITOCINAS PRO-INFLAMATORIAS

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

MIGUEL ANGEL ONOFRE CEREZO

MATRÍCULA: 2142034591

PERIODO: AGOSTO 2018 – JULIO 2019

ASESOR:

DR. SALVADOR GARCÍA LÓPEZ



ASESOR

Dr. Salvador García López



COMISIÓN DEL SERVICIO SOCIAL EN ESTOMATOLOGÍA

Resumen

La micro-vibración aplicada en las células osteoblásticas y osteoclasticas maduras acelera el proceso de remodelación ósea por medio de la estimulación de citocinas. **Objetivo:** determinar los efectos de micro vibración de las células osteoblásticas y osteoclasticas de las síntesis de IL-1, TNF- α , RANKL. **Materiales y métodos:** Los osteoblastos fueron obtenidos de los cráneos de ratones recién nacidos (2 semanas) y los osteoclastos fueron derivados de la médula ósea de la tibia de la cepa Balb/c, colocados y sembrados en un placa de 24 pozos y cultivadas en un medio de D-MEM-F12 para osteoblastos y α -MEM para osteoclastos respectivamente. Ambos medios de cultivo fueron suplementados con 10% de suero fetal, antibióticos y 1% de antimicóticos, y fueron incubados en un ambiente del 5% de dióxido de carbono y 95% de aire a temperatura a 37°C. La caja petri de 24 pozos fue sometida a micro-vibraciones de 0.25 N, 30 Hz con el aparato de Acceledent durante 20 minutos. El sobrenadante fue recolectado antes y después de la estimulación, guardado en un ultra congelador de -70 °C, para después realizar el ensayo de la expresión de IL-1, TNF- α , RANKL. **Resultados:** Se muestra una significativa baja regulación de la producción de RANKL en osteoblastos y osteoclastos (P <0.001) y una sobre regulación de TNF- α (P< 0.01) e IL-1 (P< 0.01). **Conclusiones:** La micro-vibración con el aparato de acceledent aura inhibe a los osteoclastos en cultivos in vitro, la cual permite a los factores solubles para la remodelación ósea. **Palabras Clave:** Osteoblastos, osteoclastos, micro-vibración, remodelación ósea, IL-1, RANKL, TNF- α .

Abstract

The micro-vibration applied in mature osteoblastic and osteoclastic cells accelerates the effect of bone remodeling, through the stimulation of the cytokines IL-1, TNF- α , RANKL. **Aim:** To determine the effects of the micro-vibration of osteoblastic and osteoclastic cells on the synthesis of IL-1, TNF- α , and RANKL. **Materials and methods:** Osteoblasts were obtained from new born mouse skulls (2 weeks) and osteoclasts were derived from the bone marrow of the tibiae of the Balb/c strain, which were placed and seeded in a plate of 24-wells and were cultured respectively, D-MEM-F12 media for osteoblasts and α -MEM for osteoclasts. Both culture media were supplemented with 10% fetal serum, antibiotics and 1% antimycotics and were incubated in an environment of 5% of CO₂ and 95% air at a temperature of 37°C. The 24-well Petri dish was subjected to micro-vibration with the Accelident® device for 20 minutes at 0.25 N, 30 Hz. The supernatant was collected before and after of the stimulation, stored in an ultra-freezer at -70 °C. To further assess the expression of IL-1 β , TNF- α , RANKL by ELISAs' assay. **Results:** a significant down-regulation of the production of RANKL in osteoblasts and osteoclasts (P< 0.001) and up-regulation of TNF- α (P <0.001) and IL-1 (P: 0.001). **Conclusions:** The Micro-vibration with the Accelident Aura appliance inhibits the osteoclast in culture, which allows soluble factors for bone remodeling.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	9
II. MARCO TEÓRICO	10
2.1. CELULAS MADRE	10
2.1.1. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS	10
2.1.2. CÉLULAS MADURAS ADULTAS	11
2.2. FISIOLÓGÍA DEL HUESO	12
2.3. CÉLULAS ÓSEAS.....	13
2.3.1. OSTEOLASTO	13
2.3.2. OSTEOLASTO.....	13
2.3.3. OSTEOLASTOGÉNESIS Y OSTEOLASTOGÉNESIS.....	15
2.3.4. OSTEOLCITO	17
2.3.5. MATRIZ ÓSEA.....	19
2.5. REMODELACIÓN ÓSEA	19
2.5.1. REPOSOL.....	19
2.5.2. ACTIVACIÓN	20
2.5.3. REABSORCIÓN	20
2.5.5. REVERSIÓN	20
2.5.6. FORMACIÓN	21
2.5.7. MINERALIZACIÓN.....	21
2.6. CITOCINAS	22
2.6.1. RANK.....	23
2.6.2. SISTEMA OPG/RANK/RANKL.....	24
2.6.3 OPG.....	26
2.6.4. TNF- α	27
2.6.5. IL-1.....	28
2.6.6. IL-4.....	29
2.6.7. IL-6.....	30
2.6.7. IL-10.....	31
2.6.8. IL-12.....	31

2.6.9. GM-CSF (FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIAS DE GRANULOCITOS Y MACRÓFAGOS).....	32
2.6.10. M-CSF (FACTOR ESTIMULADOR DE COLONIA DE MACRÓFAGOS).....	32
2.7. PROSTAGLANDINAS.....	33
2.8. PROTEÍNAS MORFO-GENÉTICAS ÓSEAS (BMPS).....	33
2.9 MICRO-VIBRACIÓN.....	34
2.10. ACCELENT ®.....	35
2.11. ELISA	35
2.1.2. ELISA SANDWICH.....	36
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
3.1. JUSTIFICACIÓN.....	37
3.2. OBJETIVO GENERAL	39
3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
3.3. HIPOTÉISIS.....	39
4. MATERIAL Y MÉTODOS	40
4.1 Obtención de Ratones Balb/C	40
5. Metodología	40
5.1 INSTRUMENTAL Y MATERIAL (ESTERILIZACIÓN).....	40
6. OBTENCIÓN DE CÉLULAS.....	42
6.1. MANTENIMIENTO Y MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS.....	45
6.2. PRUEBA DE FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE AL TARTRATO (TRAP-POSITIVA).	46
6.3. ESTIMULACIÓN POR MICRO-VIBRACIÓN.....	47
6.4. Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).....	47
6.4.1. Buffer Fosfato Salino (PBS).....	48
6.4.2. Buffer de Lavado	48
6.4.3. Buffer de Bloqueo.....	49
6.4.4. Diluyente	49
6.5. CAPTURA DE PLACA	49
6.5.1. Dilución del anticuerpo	49
6.5.2. Lavado.....	50
6.5.3. Bloqueo.....	50

6.5.4. Aspirado y lavado	50
6.5.5. Curva estándar	50
6.5.6 Detección	51
6.5.7. Conjugado de Avidin Peroxidasa.....	51
6.5.8. Sustrato liquido ABTS.....	51
7. Análisis de resultados	52
8. Resultados	53
9. DISCUSIÓN	59
10. Conclusiones	61
11. REFERENCIAS.....	62
12. REPORTE.....	68

LISTADO DE IMÁGENES

FIGURA 1. PRODUCCIÓN DE CÉLULAS MADRE PLURIPOTENTES INDUCIDAS (CHAGASTELLES 2011)	11
FIGURA 2. FASES DE LA REMODELACIÓN ÓSEA. (TRESGUERRES, ET AL., 2006)	22
FIGURA 3. FACTORES LOCALES REGULADORES DEL REMODELADO ÓSEO. (STEEVE, 2004).	25
FIGURA 4. DIAGRAMA DE REPRESENTACIÓN. A) RANK B) RANKL C) OPG	26
FIGURA 5. RED DE CITOCINAS (BALKWILL 1989)	32
FIGURA 6. ESTACIÓN DE TRABAJO DE	41
FIGURA 7. ESTACIÓN DE TRABAJO DE FLUJO	41
FIGURA 8. MEDIO DE CULTIVO ALPHA DMEM:F-12	41
FIGURA 9. RATÓN EN MESA DE DISECCIÓN	42
FIGURA 10. TIBIAS Y HUESOS	43
FIGURA 11. MICROPIPETA	43
FIGURA 12. SEMBRADO DE CULTIVOS CELULARES	43
FIGURA 13. CENTRÍFUGA.....	43
FIGURA 14. MICROSCOPIO ELECTRÓNICO.....	44
FIGURA 15. INCUBADORA.....	45
FIGURA 16. OSTEÓBLASTOS CULTIVADOS <i>IN VITRO</i> DURANTE LOS EXPERIMENTOS	45
FIGURA 17. LAS CÉLULAS DERIVADAS DE LA MÉDULA ÓSEA EN OSTEÓCLASTOS FUERON CORROBORADOS A TRAVÉS DE LA PRUEBA DE RESISTENCIA AL TARTRATO (TRAP ⁺)	46
FIGURA 18. MICRO-VIBRACIÓN DE CULTIVOS CELULARES	47
FIGURA 19. PLACA ELISA	48
FIGURA 20. PLACA MAGNÉTICA	48
FIGURA 21. MINI CENTRÍFUGA	49

LISTADO DE TABLAS

TABLA 1. RESULTADO IL-1B OSTEÓBLASTOS MICRO-VIBRADOS CON EL APARATO ACCELEDDENT® EN CULTIVOS SOMETIDOS CON ESTA CITOCINA POR MEDIO DEL ENSAYO ELISA CON EL PROMEDIO \pm SEM PARA 5 CULTIVOS. PRESENTADOS ANTES DE MICRO-VIBRAR (C) Y DESPUÉS DE MICRO-VIBRAR (E) DE LA MICRO-VIBRACIÓN DURANTE 5 DÍAS (0 A 96 HORAS).....	53
TABLA 2. RESULTADO IL-1B OSTEÓCLASTOS MICRO-VIBRADOS CON EL APARATO ACCELEDDENT® EN CULTIVOS SOMETIDOS CON ESTA CITOCINA POR MEDIO DEL ENSAYO ELISA CON EL PROMEDIO \pm SEM PARA 5 CULTIVOS. PRESENTADOS ANTES DE MICRO-VIBRAR (C) Y DESPUÉS DE MICRO-VIBRAR (E) DE LA MICRO-VIBRACIÓN DURANTE 5 DÍAS (0 A 96 HORAS).....	54
TABLA 3. RESULTADO TNF- α OSTEÓBLASTOS MICRO-VIBRADOS CON EL APARATO ACCELEDDENT® EN CULTIVOS SOMETIDOS CON ESTA CITOCINA POR MEDIO DEL ENSAYO ELISA CON EL PROMEDIO \pm SEM PARA 5 CULTIVOS. PRESENTADOS ANTES DE MICRO-VIBRAR (C) Y DESPUÉS DE MICRO-VIBRAR (E) DE LA MICRO-VIBRACIÓN DURANTE 5 DÍAS (0 A 96 HORAS).....	55
TABLA 4. RESULTADO TNF- α OSTEÓCLASTOS MICRO-VIBRADOS CON EL APARATO ACCELEDDENT® EN CULTIVOS SOMETIDOS CON ESTA CITOCINA POR MEDIO DEL ENSAYO ELISA CON EL PROMEDIO \pm SEM PARA 5 CULTIVOS. PRESENTADOS ANTES DE MICRO-VIBRAR (C) Y DESPUÉS DE MICRO-VIBRAR (E) DE LA MICRO-VIBRACIÓN DURANTE 5 DÍAS (0 A 96 HORAS).....	56
TABLA 5. RESULTADO RANKL OSTEÓBLASTOS MICRO-VIBRADOS CON EL APARATO ACCELEDDENT® EN CULTIVOS SOMETIDOS CON ESTA CITOCINA POR MEDIO DEL ENSAYO ELISA CON EL PROMEDIO \pm SEM PARA 5 CULTIVOS. PRESENTADOS ANTES DE MICRO-VIBRAR (C) Y DESPUÉS DE MICRO-VIBRAR (E) DE LA MICRO-VIBRACIÓN DURANTE 5 DÍAS (0 A 96 HORAS).....	57
TABLA 6. RESULTADO RANKL OSTEÓCLASTOS MICRO-VIBRADOS CON EL APARATO ACCELEDDENT® EN CULTIVOS SOMETIDOS CON ESTA CITOCINA POR MEDIO DEL ENSAYO ELISA CON EL PROMEDIO \pm SEM PARA 5 CULTIVOS. PRESENTADOS ANTES DE MICRO-VIBRAR (C) Y DESPUÉS DE MICRO-VIBRAR (E) DE LA MICRO-VIBRACIÓN DURANTE 5 DÍAS (0 A 96 HORAS).....	58

LISTADO DE GRÁFICAS

GRÁFICA 1. IL-1B OSTEÓBLASTOS.....	53
GRÁFICA 2. IL-1B OSTEÓCLASTOS.....	54
GRÁFICA 3. TNF- α OSTEÓBLASTOS.....	55
GRÁFICA 4. TNF- α OSTEÓCLASTOS.....	56
GRÁFICA 5. RANKL OSTEÓBLASTOS.....	57
GRÁFICA 6. RANKL OSTEÓCLASTOS.....	58

I. INTRODUCCIÓN

La tasa de movimiento de los dientes es un factor importante que determina la duración del tratamiento de ortodoncia. Fisiológicamente, la tasa de movimiento de los dientes refleja las tasas de recambio y remodelación ósea. (Pavlin, et al., 2015).

El movimiento dental ortodóncico requiere una secuencia de remodelación ósea que consiste en la reabsorción ósea en la dirección del movimiento dental y la formación de hueso en el lado opuesto. (García-López, et al., 2018)

El desarrollo de vibraciones de baja magnitud y alta frecuencia ha ganado interés como carga mecánica, porque la evidencia ha demostrado que regula la homeostasis ósea. Acceledent ® se ha desarrollado para utilizar fuerzas cíclicas y vibraciones, que se ha demostrado que aceleran el movimiento de los dientes del 15% al 30% en experimentos con animales, y en pacientes han logrado un movimiento dental de 2 a 3 mm. (García-López et al., 2015)

La duración prolongada del tratamiento podría reducir el cumplimiento de los pacientes y causar numerosos efectos adversos, como lesiones de mancha blanca, enfermedades periodontales y reabsorciones radiculares externas. (Jing, 2017)

II. MARCO TEÓRICO

2.1. CELULAS MADRE

Una célula madre es aquella capaz de dividirse indefinidamente a diferentes tipos de células especializadas, tanto funcional como morfológicamente. (Mata-Miranda et al., 2013)

Los primeros en aislar exitosamente la masa celular interna de un blastocito de ratón y cultivarlas fueron los científicos Martin Evans y Mathew Kaufman en 1981. (Bajada, et al., 2008)

Sin embargo fue a finales del siglo XX cuando el científico Ernst Haeckel y su equipo fusionaron los conceptos de filogenia y ontogenia para describir las células madre, tomando el término de células madre como un concepto para definir las células primordiales que se diferencian diversos tipos de células en organismos multicelulares. (Mata-Miranda, et al., 2013.)

El término de células madre entro oficialmente en el contexto científico cuando estas fueron utilizadas por los histoembriologos; Thedor Boveri y Valentin Haeckel, quienes describieron características hereditarias de las células germinales y su pluripontecialidad así como su autor-renovación. (Keith, et al., 2012)

2.1.1. CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

En los seres humanos, el embrión se define al organismo desde el momento de la implantación en el útero hasta el final del segundo mes de gestación. Sin embargo, las células embrionarias se refieren a un periodo mucho más restringido, resultante del aislamiento y el cultivo de células del blastocito, que se forma aproximadamente cinco días después de la fertilización. (Chagastelles & Nardi, 2011)

2.1.2. CÉLULAS MADURAS ADULTAS

Las células madre adultas en reposo cuentan con una capacidad de auto-renovación y diferenciación más limitada. Se han aislado numerosos tipos de células precursoras en los tejidos adultos, lo que lleva al concepto de que todos los tejidos tienen su propio compartimento de células madre. Estas mismas son responsables de reponer células que mueren dentro de un órgano, ya sea debido a procesos fisiológicos (desgaste) o por causas patológicas. (Chagastelles & Nardi, 2011)

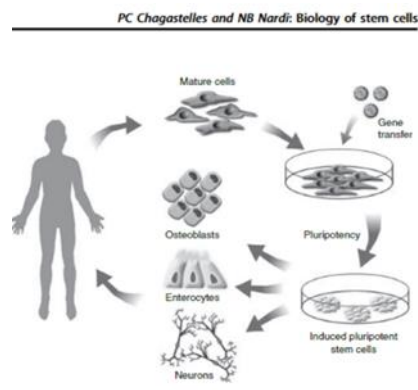


Figura 1. Producción de células madre pluripotentes inducidas (Chagastelles & Nardi, 2011)

Las células madre embrionarias (ES) se derivan de células totipotentes del embrión de mamífero temprano y son capaces de una proliferación ilimitada e indiferenciada in vitro. En las quimeras con embriones intactos, las células (ES) de ratón contribuyen a una amplia gama de tejidos adultos, incluidas las células germinales, lo que proporciona un enfoque poderoso para introducir cambios genéticos específicos en la línea germinal del ratón. (Thomson, et al., 1998)

2.2. FISIOLÓGÍA DEL HUESO

El hueso es un tejido especializado con una compleja estructura compuesta que le permite realizar múltiples funciones mecánicas y metabólicas. Para mantener estas funciones dentro del cuerpo, el hueso se encuentra en un estado constante de remodelación. Durante este proceso, también conocido como recambio óseo, los osteoclastos desmineralizan y reabsorben el hueso viejo y los osteoblastos depositan hueso nuevo para mantener una masa ósea adecuada a las tensiones que se producen en el esqueleto. (Wright, et al., 2009)

El hueso, un tejido conectivo especializado, se remodela continuamente de acuerdo con los eventos fisiológicos. Esta remodelación resulta de las actividades de muchos linajes celulares, incluidos principalmente osteoblastos, osteocitos y osteoclastos (Steeve, et al., 2004).

El hueso es un órgano muy dinámico y metabólicamente activo, que se compone principalmente de colágeno de tipo mineral y calcio. La remodelación ósea (las acciones acopladas de los osteoclastos y los osteoblastos) contribuye a la homeostasis del organismo y la homeostasis mecánica del esqueleto. (Doherty, et al., 2015).

Actúa como un depósito mineral para el calcio. La homeostasis y una reserva de factores de crecimiento. Esto involucra a las citoquinas, y su participación en el equilibrio ácido-base (Taichman, 2005).

Se ha establecido que en regiones en donde el hueso está sujeto a altos esfuerzo se genera una estimulación capaz de acelerar la formación ósea, de acuerdo a la ley de Wolff (Wolff, 1976) al disminuir las cargas sobre el hueso se produce una reacción adaptativa a tal estímulo, que causa una adaptación negativa en la regeneración ósea presentándose la pérdida de densidad. (Flores & Ayala, 2012)

2.3. CÉLULAS ÓSEAS

2.3.1. OSTEOLASTO

Los osteoblastos tienen un papel muy importante en la creación y el mantenimiento de la arquitectura esquelética; estas células son responsables de la deposición de la matriz ósea y de la regulación de los osteoclastos. Los osteoblastos son células especializadas mononucleares, no diferenciadas terminales. (Caetano, et al., 2007).

Son células osteoprogenitoras del hueso, que se originan a partir del tallo mesenquimatoso, son responsables de la síntesis matricial y su posterior mineralización.

Los osteoblastos son mononucleados y su forma es variada mientras regula su nivel de actividad celular y en una etapa de madurez adquiere una forma semi-lineal en la superficie del hueso. Los osteoblastos también son responsables de la regulación de osteoclastos y deposición de matriz ósea.

Además los osteoblastos pueden ser estimulados para aumentar la masa del hueso a través de la mayor secreción osteoide y al inhibir la capacidad de los osteoclastos para realizar su actividad. (Tresguerres, et al., 2006)

Los osteoblastos depositan la matriz orgánica (es decir, osteoide), que es principalmente colágeno de tipo I, y regulan el proceso de mineralización. Algunos osteoblastos se diferencian terminalmente en osteocitos, que se incrustan en cavidades (es decir, lagunas) en la matriz mineralizada (Doherty 2015.)

2.3.2. OSTEOLASTO

Los osteoclastos las únicas células que se sabe son capaces de resorber hueso. Los osteoclastos se derivan de células mononucleares precursoras del linaje monocito-macrófago (células madre hematopoyéticas que dan lugar a monocitos y macrófagos). También conocidas como "Unidades de formación de colonias de granulocitos-macrófagos" (GM-CFU). (Tresguerres, et al., 2006)

Los osteoclastos producen iones de hidrógeno para disolver cristales minerales de hidroxapatita y enzimas hidrolíticas para digerir la matriz orgánica del hueso. (Doherty 2015.)

Los osteoclastos son las únicas células que definitivamente muestran degradar los huesos, son mediadores clave de enfermedades esqueléticas. Los osteoblastos formadores influyen en la formación y función de los osteoclastos. (Charles & Aliprantis, 2014)

Los osteoclastos tienen dos características especiales en su membrana: un borde ondulado, donde se produce la reabsorción, y un área clara rica en microfilamentos, con integrinas que sirven de anclaje a la matriz. Con este fin los osteoclastos se mueven hacia el área a reabsorber y luego se adhieren inmediatamente a la superficie del hueso mineralizado con el borde ondulado y sellando los bordes del área mediante ciertas integrinas.

Los osteoclastos contienen fosfatasa ácida resistente a tartrato (TRAP), que permite la desfosforilación de las proteínas, cuya actividad se utiliza para su identificación tanto in vivo como in vitro.

Por otra parte se han identificado células precursoras de monocitos en varios tejidos, pero se cree que las células precursoras de monocitos y macrófagos de la médula ósea provienen la mayoría de los osteoclastos. (Tresguerres et al., 2006)

2.3.3. OSTEOLASTOGÉNESIS Y OSTEOLASTOGÉNESIS

La conversión de células madre mesenquimales en osteoblastos y la maduración y proliferación posteriores están reguladas por las vías de señalización hedgehog y Wnt

Los osteoblastos capacidad dual para activar la señalización Wnt, ya sea humoral o mecánico, explica la sensibilidad de estas células a los estímulos mecánicos y a los agentes bioquímicos (factores de crecimiento y citoquinas). El alcance de este efecto de regulación dual es exclusivo de los osteoblastos. (Rosenberg, et al., 2012)

Las células osteoblásticas, una vez estimuladas por contactos osteoclastos y / o factores solubles osteoclastos, depositan la sustancia osteoide en el sitio de resorción, iniciando así la formación de hueso. (Steeve, et al., 2004)

La vía de señalización de hedgehog (Hh) funciona aguas arriba de los efectos celulares de Wnt, y su función principal es la inducción de la maduración inicial de las MSC hacia un linaje osteoblástico (Day & Yang, 2008)

El termino osteogenesis se puede describir en dos etapas. La primera es la diferenciación osteoblastica, esta incluye factores de crecimiento y genética: Actualmente se sabe que la diferenciación es controlada por genes relacionados con la familia Hedgehog, de los cuales los más conocidos son: IHH (Indian hedgehog) y SHH (Sonic Hedgehog). Además de las proteínas morfogenéticas óseas (BMP), que constituyen los reguladores más potentes en la diferenciación osteoblástica de células madre mesenquimáticas. (Tresguerres et al., 2006)

La segunda se refiere a los marcadores de diferenciación porque a medida que las células precursoras se diferencian, expresan proteínas específicas de su función, o marcadores, en la membrana celular.

La expresión de Cbfa1 es la primera indicación de diferenciación osteogénica, cuyo nivel máximo se alcanza en los pre-osteoblastos. (Tresguerres et al., 2006)

El colágeno I y la osteopontina (OPN) se expresan temprano en las células osteoprogenitoras. De la misma manera, la fosfatasa alcalina (ALP) es una proteína de superficie que podría participar en la regulación de la proliferación, migración y diferenciación de las células osteoblasticas.

Por otra parte la sialoproteína ósea (BSP) y la osteocalcina (OCN), son marcadores de diferenciación de pre-osteoblastos a osteoblastos y aparecen cuando comienza la mineralización. La expresión de estas proteínas es especialmente útil como marcadores osteogénicos en las etapas finales de la diferenciación osteoblástica.

Respecto a la osteoclastogénesis, se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos.

Por lo tanto, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) producido por los osteoblastos se requiere en las fases iniciales de la osteoclastogénesis para la formación de células multinucleadas gigantes. El conocimiento actual sobre la regulación de la osteoclastogénesis se basa en la existencia de 3 moléculas clave las cuales son: OPG, Rank, Rankl

La interacción entre RANK y su receptor RANKL inicia la actividad osteoclastica y la diferenciación, aumentando la resorción ósea. Asimismo, los efectos de RANKL tanto in vivo como in vitro son inhibidos por la osteoprotegerina (OPG), una proteína circulante que pertenece a la superfamilia de receptores de TNF. Cuando OPG y RANKL se unen, la unión entre RANK y RANKL se inhibe, y por lo tanto, la diferenciación osteoclástica también se inhibe. Por esta razón, OPG, RANK Y RANKL son reguladores importantes de la osteoclastogénesis. (Tresguerres, et al., 2006)

2.3.4. OSTEOCITO

Los osteocitos son las células más abundantes en el hueso. Estas células se comunican entre sí y con su entorno a través de extensiones en su membrana plasmática. Por lo tanto, se cree que los osteocitos actúan como mecanosensores, instruyendo a los osteoclastos donde y cuando reabsorber hueso y a los osteoblastos donde y cuando formarlo. (Boulpaep 2005)

En el hueso, las células de los osteocitos forman una compleja red de comunicación tridimensional (3D) que desempeña un papel vital en el mantenimiento de la salud ósea al controlar las señales físicas que surgen durante la actividad de carga y dirigir la actividad de los osteoblastos y los osteoclastos para iniciar la formación y la resorción ósea. (Mc Garrigle, et al., 2016)

Los osteocitos se forman cuando los osteoblastos de tipo cuboidal se incrustan en un osteoide de secreción suave y comienzan a cambiar morfológicamente a una forma dendrítica característica de un osteocito. Esta transición está acompañada por una pérdida de volumen celular (contenido reducido de orgánulos) y un aumento en la formación y elongación de las proyecciones citoplásmicas delgadas que se interconectan con los osteocitos vecinos dentro de ECM ósea y osteoblastos en la superficie del hueso (Palazzini 2013). Además, como un osteoblasto se diferencia a un osteocito, la expresión de la enzima fosfatasa alcalina marcadora de osteoblastos (ALP) se reduce considerablemente (Jee 2001)

Los osteocitos se forman una vez que la matriz se mineraliza, algunos osteoblastos permanecen atrapados convirtiéndose posteriormente en osteocitos. A diferencia de los osteoblastos, osteoclastos y células de revestimiento que se encuentran en la superficie ósea, los osteocitos están en el interior.

Los osteocitos son las células más abundantes en el hueso (Hasta 10 veces más que la cantidad de osteoblastos). (Mc Garrigle 2016)

Son estrellados y se encuentran en el interior de lagunas, los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de canalículos óseos llenos de fluido extracelular. De esta manera los osteocitos se organizan en un *synsytium* de células interconectadas formando una estructura única, teniendo como ventaja una gran superficie de contacto tanto en el interior como hacia la superficie del hueso, asegurando de esta manera el suministro de oxígeno y nutrientes. (Tresguerres, et al., 2006)

Cuando ocurre un traumatismo en el hueso, el cese de aporte sanguíneo causa hipoxia y necrosis de los osteocitos cercanos a más de 0.1mm de un vaso capilar intacto.

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide pero se cree que su función principal es controlar la remodelación ósea, detectando las variaciones mecánicas de las cargas. Un fenómeno conocido como mecanotransducción.

Los osteocitos son la etapa final de la línea osteoblastica y son incapaces de autorenovarse. Tienen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero también tienen un marcador específico (CD44) un receptor de membrana fuertemente expresado en osteocitos y negativos en osteoblastos y células de revestimiento óseo.

CD44, una glicoproteína transmembrana, se expresa de manera ubicua en muchos tipos de células. Como receptor de la superficie celular para el hialuronato y la osteopontina, el CD44 está involucrado en muchos procesos biológicos y fisiológicos que incluyen la migración celular, la hematopoyesis, la localización de linfocitos, el desarrollo embrionario y la apoptosis. (Tresguerres, et al., 2006)

2.3.5. MATRIZ ÓSEA

El hueso está compuesto por sales inorgánicas y matriz orgánica. La matriz orgánica contiene proteínas colágenas (90%), predominantemente colágeno tipo I y proteínas no colágenas que incluyen osteocalcina, osteonectina, osteopontina, fibronectina y sialoproteína ósea II, proteínas morfogenéticas óseas (BMP) y factores de crecimiento (Florencio-Silva, et al., 2015)

El componente funcional del hueso incluye Factores de crecimiento y citoquinas. La dureza y la rigidez del hueso se debe a la presencia de sal mineral en la matriz osteoide, que es un cristalino. (Tresguerres, et al., 2006)

La matriz ósea constituye un marco complejo y organizado que proporciona soporte mecánico y ejerce un papel esencial en la homeostasis ósea. La matriz ósea puede liberar varias moléculas que interfieren en la actividad de las células óseas y, en consecuencia, participa en la remodelación ósea (Florencio-Silva 2015).

La matriz mineralizada extracelular debe considerarse ahora como algo más que un simple depósito de calcio y fósforo, ya que constituye una reserva de proteínas que participan en la regulación de la diferenciación celular y en la integridad y función del tejido óseo. (Tresguerres, et al., 2006)

2.5. REMODELACIÓN ÓSEA

La remodelación ósea se puede dividir en las siguientes seis fases: a saber, inactividad, activación, reabsorción, inversión, formación y mineralización. La activación precede a la reabsorción que precede a la reversión, con la mineralización como último paso. Estos ocurren en sitios de remodelación que se distribuyen al azar, pero también están dirigidos a áreas que requieren reparación (Tresguerres et al., 2002)

2.5.1. REPOSO

1. Fase de reposo. Es el estado / fase del hueso en reposo. Los factores que inician el proceso de remodelación siguen siendo desconocidos.

2.5.2. ACTIVACIÓN

La etapa inicial de "activación" implica el reclutamiento y la activación de los precursores de osteoclastos mononucleares y macrófagos de la circulación (Bruzzaniti y Baron 2007; Roodman et al. 1992), lo que resulta en la interacción de células precursoras de osteoclastos y osteoblastos. Esto conduce a la diferenciación, migración y fusión de los grandes osteoclastos multinucleados. Estas células se adhieren a la superficie del hueso mineralizado. E iniciar la reabsorción por la secreción de iones de hidrógeno y enzimas lisosomales, particularmente la catepsina K. **(Tresguerres, et al., 2006)**

2.5.3. REABSORCIÓN

Los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y descomponen la matriz osteoide. Este proceso es completado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos dentro de la matriz, transformando fundamentalmente el factor de crecimiento b (TGF-b), el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) y el factor de crecimiento tipo insulina I y II. (IGF - I y II). La reabsorción osteoclástica produce cavidades festoneadas irregulares en la superficie del hueso trabecular, llamadas lagunas de Howship, o canales de Haversia cilíndricos en el hueso cortical. La resorción ósea mediada por osteoclastos toma solo aproximadamente 2 a 4 semanas durante cada ciclo de remodelación

2.5.5. REVERSIÓN

Durante la fase de reversión, la resorción ósea pasa a la formación de hueso. Al finalizar la resorción ósea, las cavidades de resorción contienen una variedad de células mononucleares, incluidos los monocitos, los osteocitos liberados de la matriz ósea y los pre-osteoblastos, reclutados para comenzar la formación de hueso nuevo. Las señales de acoplamiento que vinculan el final de la resorción ósea al comienzo de la formación ósea son aún desconocidas, pero los candidatos propuestos para la señal de acoplamiento incluyen factores derivados

de la matriz ósea, como TGF- / 3, IGF-1, IGF-2, proteínas morfogenéticas óseas, PDGF, o factor de crecimiento de fibroblastos (Locklin et al. 2003).

2.5.6. FORMACIÓN

Una vez que los osteoclastos han reabsorbido una cavidad ósea, se desprenden de la superficie ósea y son reemplazados por células del linaje osteoblasto que a su vez inician la formación de hueso. El fenómeno de agrupación de preosteoblastos es producido y atraído por los factores de crecimiento liberados de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación (Lind et al. 1995).

Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la cual se adhiere el nuevo tejido y expresan las proteínas morfogénicas óseas (BMP) responsables de la diferenciación

Unos días más tarde, los osteoblastos ya diferenciados sintetizan la matriz osteoide que llena las áreas perforadas.

Los osteoblastos restantes continúan sintetizando el hueso hasta que finalmente se detienen y se transforman en células de revestimiento quiescentes que cubren completamente la superficie del hueso recién formado y se conectan con los osteocitos en la matriz ósea a través de una red de canaliculos.

2.5.7. MINERALIZACIÓN

El proceso comienza 30 días después de la deposición del osteoide, finalizando a los 90 días en la trabecular y a los 130 días en el hueso cortical. La fase inactiva o "en reposo" comienza de nuevo. Cuando se completa el ciclo, la cantidad de hueso formado debe ser igual a la cantidad de hueso reabsorbido.



Figura 2. Fases de la remodelación ósea. (Tresguerres, et al., 2006)

2.6. CITOCINAS

Las citoquinas que participan en la resorción ósea osteoclástica son producidas por células mononucleares de la médula ósea y por células óseas, y algunas pueden incluso incorporarse a la matriz ósea no mineralizada y liberarse durante el proceso de resorción ósea osteoclástica. (Bonewald & Mundy 1990)

Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas producidas por diversos tipos de células en el sitio de la lesión y por células inmunitarias sistémicas.

Las citoquinas se unen a receptores celulares específicos que resultan en la activación de vías de señalización intracelular que regulan la transcripción de genes. Por este mecanismo, las citoquinas influyen en la actividad de las células inmunitarias, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia. (Lin, et al., 2000)

Las citoquinas son polipéptidos o glicoproteínas extracelulares, hidrosolubles. Son producidas por diversos tipos de células en el lugar de la lesión y por células del sistema inmunológico a través de la activación de proteínas quinasas activadas por mitógenos. A diferencia de las hormonas clásicas, las citoquinas no se almacenan como moléculas preformadas y actúan mecanismos especialmente paracrinos (en las células vecinas) y autocrinos (la propia - células productoras).

Diferentes tipos de células secretan la misma citocina, y una sola citocina puede actuar en diversos tipos de células, fenómeno denominado pleiotropía. Las citocinas son redundantes en sus actividades, es decir, acciones similares pueden ser desencadenadas por diferentes citocinas.

Estas sustancias se unen a receptores específicos, activando mensajeros intracelulares que regulan la transcripción génica. De esta forma, las citocinas influyen en la actividad, la diferenciación, la proliferación y la supervivencia de la célula inmunológica, así como regulan la producción y la actividad de otras citocinas, que pueden aumentar (pro-inflamatorias) o atenuar (anti-inflamatorias) la respuesta inflamatoria.

Algunas citocinas pueden tener acciones pro-(Th1) o anti-inflamatorias (Th2), de acuerdo con el microambiente en el cual están localizadas. Entre las consideradas pro-inflamatorias, tenemos las interleucinas (IL) 1, 2, 6, 7 y FNT (factor de necrosis tumoral). **(Caio, et al., 2011)**

2.6.1. RANK

La función del sistema RANK/RANKL/OPG es la interacción entre los miembros de la unidad básica multicelular; induce la diferenciación y activación de osteoclastos u osteoblastos, equilibrando el ciclo de remodelado entre la formación o resorción. **(Esparza, et al., 2016)**

Se ha descubierto que OPG, RANKL y RANK tienen una función clave en la función de los osteoclastos y, por lo tanto, en el recambio óseo. Están específicamente involucrados en la proliferación, diferenciación, activación y apoptosis osteoclásticas y también se han relacionado con la lactancia, la proliferación de células tumorales y la maduración de células dendríticas. **(McGrath, 2011)**

El receptor de la superficie celular llamado RANK (para el activador del receptor de NFkB) produce un precursor de osteoclastos

Las células se convierten en osteoclastos totalmente diferenciados cuando RANK se activa por su ligando asociado RANK (RANKL). RANKL es una de las moléculas de señalización clave que facilitan la comunicación cruzada entre los osteoblastos y los osteoclastos y ayudan a coordinar la remodelación ósea.

RANK-L y macrófagos CSF (M-CSF) son dos citoquinas que son críticas para la formación de osteoclastos. Tanto RANKL como M-CSF se producen principalmente por células estromales de la médula ósea y osteoblastos en forma de membrana y formas solubles, y la osteoclastogénesis requiere la presencia de células estromales y osteoblastos en la médula ósea. (Teitelbaum & Ross 2003)

La interacción de Rankl con OPG y sus respectivas concentraciones tiene una relación directa con los niveles de reabsorción ósea y, en el caso del cáncer, el crecimiento de metástasis óseas. Además, la resorción ósea osteoclástica Rankl estimulada conduce a la liberación de factores de crecimiento tales como el crecimiento del tejido del factor- β y el factor de crecimiento derivado de plaquetas, que a su vez estimulan el crecimiento adicional de células tumorales a través de un mecanismo de retroalimentación. (McGrath, 2011)

2.6.2. SISTEMA OPG/RANK/RANKL

Son clásicos ya los estudios en ratones que ayudaron a comprender la función del sistema OPG-RANKL. Los ratones knockout para OPG desarrollaban una osteoporosis grave, mientras que la sobreexpresión de OPG en ratones transgénicos producía osteopetrosis. La ausencia de RANKL en ratones producía osteopetrosis, alteración de la dentición por ausencia de osteoclastos maduros, ausencia de ganglios linfáticos y deficiencia de linfocitos B y T, mientras que la administración de RANKL en su forma soluble se acompañaba de un aumento de la actividad osteoclástica, osteoporosis e hipercalcemia.

RANKL es el factor crítico para la diferenciación osteoclástica, y en presencia del factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) se une a RANK y promueve la diferenciación, activación y supervivencia de los

osteoclastos, así como su adherencia a la superficie ósea. En este proceso de diferenciación también intervienen otras moléculas de la familia de los TNF como TNF, posiblemente favoreciendo la acción de RANKL o estimulando similares vías intracelulares. (García 2008)

OPG y RANKL, sintetizados por células estromales / osteoblastos, se han identificado como las dos citoquinas principales de la diferenciación y activación osteoclásticas.

El papel predominante de esta citoquina en la fisiología ósea es la estimulación de la diferenciación / activación osteoclástica y la inhibición de la apoptosis de osteoclastos. RANKL en asociación con el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) es necesario y suficiente para la diferenciación completa de los precursores osteoclásticos en osteoclastos maduros. (Steeve 2004)

	Estimulan formación	Estimulan reabsorción	Inhiben reabsorción
Factores de crecimiento	BMP-2 (Proteína morfogenética ósea-2) BMP-4 (Proteína morfogenética ósea-4) BMP-6 (Proteína morfogenética ósea-6) BMP-7 (Proteína morfogenética ósea-7) IGF-I (factor análogo a la insulina I) IGF-II (Factor análogo a la insulina II) TGF-β (Factor transformante del crecimiento β) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial)	TNF (Factor de necrosis tumoral) EGF (Factor de crecimiento epidérmico) PDGF (Factor de crecimiento derivado de las plaquetas) FGF (Factor de crecimiento fibroblástico) M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) GM-CSF (Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos)	
Citoquinas		IL-1 (Interleuquina -1) IL-6 (Interleuquina -6) IL-8 (Interleuquina -8) IL-11 (Interleuquina -11) PGE ₂ (Prostaglandina E-2) PGE ₁ (Prostaglandina E-1) PGE ₃ (Prostaglandina G-2) PGL ₂ (Prostaglandina I-2) PGH ₂ (Prostaglandina H-2)	IFN-γ (Interferón γ) IL-4 (Interleuquina-4)

Figura 3. Factores locales reguladores del remodelado óseo. (Steeve, 2004).

2.6.3 OPG

La OPG se identificó por primera vez mediante homología de secuencia con la familia TNFR durante un proyecto de secuenciación de ADNc del intestino de rata. Llamaron así a la proteína debido a sus efectos protectores en el hueso (latín: hueso del hueso, protegido para proteger). La OPG es una glicoproteína soluble secretada por varias células derivadas mesenquimales, como los osteoblastos y las células estromales de la médula ósea. (Wright, et al., 2009)

La osteoprotegerina (OPG), también conocida como factor inhibidor de osteoclastos (OCIF) o factor de unión a osteoclastos (OBF), es un factor clave que inhibe la diferenciación y activación de los osteoclastos y, por lo tanto, es esencial para la resorción ósea.

La osteoprotegerina es otra proteína liberada por los osteoblastos que actúa como un señuelo para evitar que Rank y Rankl entren en contacto.

La OPG es una proteína secretada que carece de un dominio transmembranal producido por muchos tipos de células, incluidas las células estromales de la médula ósea y los osteoclastos, que bloquean la diferenciación del precursos de osteoclastos mediante la unión de Rankl (evitando así la activación de Rank). (McGrath 2011)

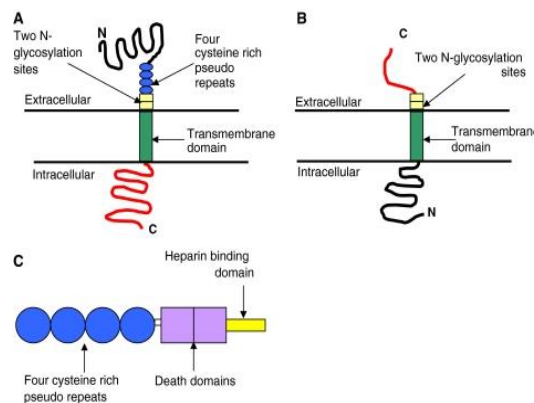


Figura 4. Diagrama de representación. A) Rank B) Rankl C) OPG

(Wright 2009)

2.6.4. TNF- α

El factor de necrosis tumoral *in vitro* estimula la reabsorción y se le ha relacionado con la pérdida ósea de la artritis y de la enfermedad periodontal.

TNF- α , también conocida como caquectina, es otra citoquina inflamatoria que desempeña un papel clave bien establecido en algunos modelos de dolor. El TNF actúa en varias vías de señalización diferentes a través de dos receptores de la superficie celular, TNFR1 y TNFR2 para regular las vías apoptóticas, la activación de la inflamación por NF- κ B y la activación de las proteínas quinasas activadas por estrés (SAPK). (Filellaa, et al., 2002)

TNF-alfa es una de las citoquinas osteoclastogénicas más potentes producidas en la inflamación.

TNF-alfa media la estimulación de RANKL de la diferenciación de osteoclastos a través de un mecanismo autocrino. Definido como un potente factor de reabsorción ósea, el TNF-alfa es responsable de estimular la resorción ósea osteoclástica tanto *in vitro* como *in vivo*. La participación del TNF-alfa se ha demostrado en la pérdida ósea de la periodontitis, el aflojamiento del implante ortopédico y otras formas de osteólisis inflamatoria crónica.

Los osteoclastos inducidos por TNF-alfa tienen la capacidad de formar fosas de reabsorción en rodajas de dentina solo en presencia de IL-1. TNF-alfa junto con IL-1 puede jugar un papel importante en la reabsorción ósea durante enfermedades inflamatorias. (Steeve, et al., 2004)

Después de la cirugía, trauma o durante las infecciones, TNF α es uno de los mediadores más tempranos y potentes de la respuesta inflamatoria. (Caio, et al., 2011)

2.6.5. IL-1

La IL-1 es principalmente producida por macrófagos y monocitos, así como por células no inmunológicas, tales como fibroblastos y células endoteliales activadas durante lesión celular, infección, invasión e inflamación. Hay dos tipos conocidos: IL-1 α y la IL-1 β . La IL-1 β se libera principalmente por monocitos y macrófagos, así como por células no inmunes, como los fibroblastos y las células endoteliales, durante la lesión celular, la infección, la invasión y la inflamación. (Zhang & An, 2007)

IL-1 β produce inflamación sistémica a través de la activación de la ciclooxigenasa-2, con la formación de PGE2 en el hipotálamo anterior, causando fiebre. También produce sustancia-P (SP), óxido nítrico (activando la enzima oxidasa nítrica sintetasa) y moléculas de adhesión endotelial. Desempeña un papel importante en el desarrollo y mantenimiento del dolor postoperatorio. (Caio, et al., 2011)

La interleucina-1 tiene múltiples efectos en todas las etapas del linaje de osteoclastos. Estimula la proliferación de precursores de osteoclastos. Además, también mejora la diferenciación de los precursores comprometidos para formar células multinucleadas maduras. La interleucina-1 tiene una actividad similar en otros tipos de sistemas de ensayo de reabsorción ósea, que incluyen cultivos de órganos de huesos largos de ratas fetales, cultivos de células mononucleares de médula humana y murina y osteoclastos aislados de aves y roedores. (Mundy, 1993). Estimula directamente la reabsorción osteoclástica, incrementando la proliferación y diferenciación de los pre-osteoclastos así como la actividad osteoclástica e inhibiendo la apoptosis de los osteoclastos. En realidad son tres moléculas diferentes relacionadas: IL-1 α , IL-1 β y Antagonista del receptor de IL-1, siendo esta última inhibidora del efecto de las dos primeras.

Su acción sobre la reabsorción es directa e indirecta, a través de la síntesis de prostaglandinas. (Tresguerres 2006).

2.6.6. IL-4

Estudios previos, realizados con sistemas de cultivo complejos, demostraron los efectos de la IL-4 sobre los osteoblastos y los osteoclastos.

La supresión inducida por IL-4 del desarrollo de osteoclastos depende de STAT6 expresión. Para delinear completamente el mecanismo mediante el cual la IL-4 regula el desarrollo y la función de los osteoclastos.

La adición de IL-4 en el momento de la siembra sobre el sustrato óseo inhibió de manera notable la capacidad de resorción ósea de los osteoclastos maduros derivados de murinos primarios (Moreno, et al., 2003)

La IL-4 es una glicoproteína, con propiedades antiinflamatorias y producidas por linfocitos T-CD4, mastocitos, eosinófilos y basófilos. Tiene acción sobre los linfocitos T y B, células matadoras naturales, mastocitos, y células endoteliales, usando la vía JAK / STAT. Induce la diferenciación de linfocitos B para producir IgG e IgE, que son inmunoglobulinas importantes en las respuestas alérgicas y anti-helmínticas.

La interleucina-4 es una citocina multifuncional que inhibe la reabsorción ósea osteoclástica en cultivos de órganos de calvaria de ratón neonatal. También tiene la capacidad de inhibir la formación de osteoclastos de los precursores mononucleares de la médula ósea. Los ratones transgénicos que sobreexpresan interleucina-4 desarrollan un síndrome osteopénico que se parece al de la osteoporosis (Mundy, 1993)

IL-4 tiene un potencial terapéutico en muchas situaciones clínicas, tales como en la psoriasis, la osteoartritis, el linfoma y el asma. (Caio, et al., 2011)

2.6.7. IL-6

La interleucina-6 estimula la formación de osteoclastos a partir de precursores. La interleucina-6 también tiene probablemente efectos sobre los osteoclastos de la madurez. La interleucina-6 se expresa mediante osteoclastos maduros. En ratas con deficiencia de estrógenos, la pérdida de hueso debida a la osteoclastogénesis se puede prevenir mediante una terapia de reemplazo de estrógenos o mediante anticuerpos neutralizantes de la interleucina-6. (Mundy, 1993)

IL-6 modula la actividad tanto de los osteoblastos como de los osteoclastos. La inactivación de IL-6 conduce a disfunciones en varios sistemas biológicos (p. Ej., Sistemas hematopoyéticos, endocrinos y neuronales) que pueden interferir con la curación ósea. (Prystaz, et al., 2018).

Esta interleucina es uno de los más precoces e importantes mediadores de inducción y control de la síntesis y liberación de proteínas de fase aguda por los hepatocitos durante estímulos dolorosos, como trauma, infección, operación y quemadura.

Se considera el marcador más relevante del grado de lesión de los tejidos durante un procedimiento quirúrgico en el que un aumento excesivo y prolongado se asocia con un aumento de la morbilidad postoperatoria.

La IL-6 es una citocina pro-inflamatoria que promueve maduración y activación de neutrófilos, maduración de macrófagos y diferenciación / mantenimiento de linfocitos T citotóxicos y células matadoras naturales.

Estimula la reabsorción ósea y parece implicada en la patogenia de la enfermedad de Paget (27). Se cree que juega un papel importante en las etapas iniciales de la osteoclastogénesis. Se produce en respuesta a PTH, IL-1. (Caio, et al., 2011).

2.6.7. IL-10

Está producida por los linfocitos T de tipo Th2 y con capacidad de inhibir la síntesis de IFN y de IL-2 por parte de los linfocitos T. Es la principal citocina antiinflamatoria, actuación que ejerce a través de la inhibición de la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF por parte de los macrófagos. (Filellaa, et al., 2002)

La IL-10 es un polipéptido no glucosilado, sintetizado en células inmunológicas y tejidos neuroendocrino y neural.

La producción de IL-10 se ve obstaculizada por muchas citocinas, tales como IFN IL-4, IL-13 y γ , y también por su autorregulación.

Inhibe las citocinas pro-inflamatorias, principalmente FNT, IL-1 e IL-6, producidas por macrófagos y monocitos activados, estimulando la producción endógena de citocinas anti-inflamatorias. Además, aumenta la proliferación de mastocitos y previene la producción de IFN, por medio de las células asesinas naturales. (Oliveira, et al., 2011)

2.6.8. IL-12

La IL-12 es una citocina producida por las células presentadoras de antígeno y sirve como regulador principal de las funciones de las células T y NK

la actividad del IFN- γ es un potenciador en las células fagocíticas para producir la IL-12 en proceso de retroalimentación positiva, ya que la IL-12 estimula la producción de IFN- γ . 24

La IL-12 activa las células T y NK favoreciendo la generación de linfocitos T citóxicos y la citocina es la que promueve la diferenciación de células Th1.2 (Rodríguez-Montaña, et al., 2015)

Es producida por linfocitos B y, en menor cantidad, por linfocitos T. Actuando sobre linfocitos T de tipo Th1 induce la síntesis de IFN y IL-2, mientras que también es capaz de reducir la producción de IL-4, IL-5 e IL-10 por parte de las células Th2. (Filella, et al., 2002)

2.7. PROSTAGLANDINAS

Las prostaglandinas son una larga familia de lípidos oxidados e insaturados, que tienen un ciclo con oxígeno y dos cadenas alifáticas. Las prostaglandinas se derivan de la oxidación del ácido araquidónico, la cual es catalizada por las enzimas ciclooxigenasas. (Martínez-Canabal & Rivas-Arancibia 2005)

In vitro favorecen la reabsorción ósea, fundamentalmente la PGE₂, pero también la PGE₁, PGG₂, PGI₂ y PGH₂ (28). Estudios *in vivo*, midiendo los niveles de prostaglandinas en el líquido crevicular, han demostrado su participación en la destrucción ósea que tiene lugar en la enfermedad periodontal. (Tresguerres et al., 2006)

2.8. PROTEÍNAS MORFO-GENÉTICAS ÓSEAS (BMPS)

Son péptidos de la familia del TGF cuya acción sobre receptores específicos estimula la diferenciación osteoblástica e induce la formación ósea durante el desarrollo esquelético. En el tejido adulto su función es mantener un aporte continuo de osteoblastos, y también se ha demostrado que pueden estimular la resorción ósea²⁴. Como característica única, induce la diferenciación de células del tejido conectivo a células osteoprogenitoras. (García, et al., 2008)

Constituyen un grupo de 15 proteínas capaces de conseguir la transformación de tejido conjuntivo en tejido óseo, por lo que se consideran osteoinductivas. Asimismo, son capaces de estimular la diferenciación de células pluripotenciales hacia diferentes líneas celulares (tejido adiposo, cartílago y hueso). Son muy abundantes en el tejido óseo y durante la embriogénesis participan en la formación de hueso y cartílago.

En el tejido adulto su función es mantener un aporte continuo de osteoblastos, y también se ha demostrado que pueden estimular la resorción ósea. Como característica única, induce la diferenciación de células del tejido conectivo a células osteoprogenitoras.

Actualmente se les considera como los factores más potentes de la diferenciación osteoblástica, creen que además de estimular la osteogénesis inhiben la osteoclastogénesis. (Tresguerres et al., 2006)

2.9 MICRO-VIBRACIÓN

Algunos estudios en animales han demostrado que la aplicación de fuerzas cíclicas junto con una fuerza ortodóntica puede aumentar la tasa de movimiento de los dientes. Se ha demostrado que la vibración de micro pulso (0.25 N; 30 Hz) durante 20 minutos con el dispositivo AcceleDent® aura (OrthoAccel Technologies Inc. Bellaire, Texas, EE. UU.) Se ha observado una regulación positiva de OPG y una regulación descendente de síntesis de RANKL. Para mantener la supervivencia de los osteoclastos, es necesaria una sobre regulación suficiente de RANKL y CSF-1, pero al mismo tiempo, el OPG está excesivamente regulado, lo que condujo a la apoptosis del osteoclasto. (García-López et al., 2018)

Se ha demostrado que las señales oscilatorias mecánicas de bajo nivel (vibraciones) aumentan la velocidad de remodelación en los huesos largos cargados mecánicamente, que se usa actualmente en la prevención de la osteoporosis basada en un aumento del metabolismo óseo y una disminución de la pérdida ósea en mujeres posmenopáusicas. (Pavlin, et al., 2015)

Previamente se han realizado investigaciones del efecto de la microvibración aplicada en pacientes como lo fue el ensayo clínico aleatorizado prospectivo no encontró evidencia de que la fuerza vibratoria suplementaria pueda aumentar significativamente la velocidad del movimiento dental inicial o reducir la cantidad de tiempo requerido para lograr la alineación final cuando se usa junto con un dispositivo fijo de borde pre ajustado. (Woodhouse, et al., 2015)

Aplicación de la vibración de resonancia podría acelerar el movimiento dental ortodóntico a través de la expresión mejorada de RANKL en el ligamento periodontal sin daño adicional a los tejidos periodontales, como la reabsorción de la raíz. (Nishimura, et al., 2008).

2.10. ACCELEDENT ®

AcceleDent, fabricado por OrthoAccel® Technologies Inc., una compañía de dispositivos médicos con sede en Houston, es un dispositivo utilizado por los pacientes en el hogar para acelerar el movimiento dental ortodóntico y, por lo tanto, reducir el tiempo de tratamiento. (Werner, 2011)

El dispositivo AcceleDent Aura® no tuvo ningún efecto en comparación con ningún dispositivo para aumentar el perímetro del arco anterior, o reducir la irregularidad o la sensación de incomodidad durante la alineación inicial con los dispositivos fijos, aunque más sujetos utilizaron analgésicos a las 24 horas en el grupo sin dispositivo. (Miles & Fisher, 2016).

2.11. ELISA

ELISA es la abreviatura de ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas. Es un método útil y poderoso para estimar ng / ml a pg / ml de materiales ordenados en la solución, como suero, orina, esperma y sobrenadante de cultivo. ELISA se ha utilizado ampliamente en las investigaciones de ciencias de la vida.

El principio básico de un ELISA es usar una enzima para detectar la unión del anticuerpo (Ab) antígeno (Ag). La enzima convierte un sustrato incoloro (cromógeno) en un producto coloreado, lo que indica la presencia de la unión de Ag: Ab. Se puede usar un ELISA para detectar la presencia de Ags o Abs en una muestra, dependiendo de cómo se diseñe la prueba. (Hongbao, et al., 2006)

2.1.2. ELISA SANDWICH

La técnica de sándwich se utiliza para identificar una muestra específica de antígeno. La superficie del pozo se prepara con una cantidad conocida de anticuerpo unido para capturar el antígeno deseado. Después de que los sitios de unión no específicos se bloquean utilizando albúmina de suero bovino, la muestra que contiene el antígeno se aplica a la placa. Luego se agrega un anticuerpo primario específico que "empareda" el antígeno. Se aplican anticuerpos secundarios ligados a enzimas que se unen al anticuerpo primario. Los conjugados anticuerpo-enzima no unidos se eliminan por lavado. El sustrato se agrega y se convierte enzimáticamente en un color que puede cuantificarse posteriormente. Analizaron los sueros de pacientes utilizando el método de sándwich para detectar niveles mejorados de factor de crecimiento de queratinocitos (KGF) en los sueros de pacientes con queloides y esclerodermia en comparación con controles sanos para cuantificar KGF humano. Una ventaja de usar un anticuerpo específico purificado para capturar el antígeno es que elimina la necesidad de purificar el antígeno de una mezcla de otros antígenos, simplificando así el ensayo y aumentando su especificidad y sensibilidad. (Gan & Patel, 2013).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Tiene repercusión la aplicación de micro-vibración sobre células osteoblásticas y osteoclasticas cultivadas in vitro en la síntesis de IL-1, RANKL, TNF- α ?

3.1. JUSTIFICACIÓN

Se ha encontrado que la IL-1, el TNF y la IL-6 se expresan en forma constante en la encía inflamada y se ha demostrado un aumento de los niveles en el líquido crevicular de pacientes con periodontitis (Lerner, 2006). De manera similar, estas citoquinas también están altamente expresadas en el sinovio inflamado y en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y se relaciona en los mecanismos patogénicos que conducen a la resorción ósea en esta enfermedad (Choy & Panayi., 2001). De manera similar a la osteoporosis, se ha encontrado que la neutralización de IL-1 y TNF- por el receptor de IL-1 soluble y el receptor de TNF- α soluble disminuye la formación de osteoclastos y la pérdida ósea en la enfermedad periodontal (Graves et al., 1998)

Muchos estudios han demostrado que la estimulación mecánica a través de la microvibración es beneficiosa para mantener y/o mejorar la masa ósea y mejorar la función neuromuscular, así como otros beneficios fisiológicos. (Shi et al., 2010) Ya que la vibración mecánica es un nuevo tipo de ejercicio que ha sido cada vez más probado para la capacidad de prevenir fracturas óseas y osteoporosis en personas frágiles. (Ruan et al., 2008)

Además se ha encontrado que la estimulación del hueso en un estudio en animales con vibraciones de alta frecuencia y baja magnitud estimula con éxito un aumento en el hueso cortical. (Miles, 2017). Por otro lado en el área estomatológica, la vibración en ortodoncia se ha aplicado con el objetivo principal de aumentar la velocidad del movimiento dental ortodóntico acelerando los procesos de modelado y remodelación de tejidos óseos y periodontales. Esto tiene el beneficio de disminuir la duración en que un paciente tiene aparatos fijos en sus dientes. En la

literatura, el aumento de la duración del tratamiento se ha asociado con un mayor riesgo de caries, problemas periodontales y un mayor riesgo de reabsorción de la raíz.

La vibración tiene la ventaja de que los efectos secundarios son mínimos en comparación con otros métodos para acelerar el movimiento de los dientes, como los medicamentos locales o sistémicos, y ha demostrado ser una alternativa segura de bajo impacto que mejora la remodelación ósea en el campo médico. (Shah, 2017). Sin embargo por el momento no se ha podido determinar a nivel celular y molecular, como la micro-vibración de alta frecuencia baja densidad puede acelerar el movimiento dentario a través del tratamiento de ortodoncia en combinación con la aplicación de micro-vibración durante 20 minutos diarios.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de la estimulación por microvibración de células osteoblásticas y células osteoclasticas, a través de las citocinas IL-1, TNF- α , RANK-L.

3.2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Establecer cultivos primarios de osteoblastos derivados de cráneo de ratón y osteoclastos derivados de la médula ósea cultivados in vitro.
- b) Determinar los efectos de la micro-vibración sobre la producción de IL-1 de sobrenadante de cultivos de osteoblastos y osteoclastos cultivados in vitro a través del aparato Acceledent®.
- c) Determinar los efectos de la micro-vibración sobre la producción de TNF- α de sobrenadante de cultivos de osteoblastos y osteoclastos cultivados in vitro a través del aparato Acceledent®.
- d) Determinar los efectos de la micro-vibración sobre la producción de RANK-L de sobrenadante de cultivos de osteoblastos y osteoclastos cultivados in vitro a través del aparato Acceledent®.
- e) A través de la prueba de ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas determinar después de la micro-vibración la expresión de IL-1, TNF- α , RANK-L.

3.3. HIPOTÉISIS

La micro-vibración de baja magnitud, a una frecuencia de 30 Hz con Acceledent® sobre cultivos in vitro de células osteoblásticas y osteoclasticas induce la producción la producción de IL-1, TNF- α , RANK-L.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Obtención de Ratones Balb/C

Se solicitaron ratones a la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Xochimilco, con las siguientes especificaciones:

Cepa Balb/C, Sexo indistinto, edad 2 semanas, Peso indistinto, Otros dislocados

Ahí mismo, siguiendo las normas estipuladas por la UPEAL se sacrificó a los ratones por dislocación cervical.

5. METODOLOGÍA

5.1 INSTRUMENTAL Y MATERIAL (ESTERILIZACIÓN)

La esterilización para los equipos de disección y vasos de precipitado de distintos tamaños fue a través de una autoclave de vapor a presión con calor húmedo, el cual se programó a 15 lbs de presión durante 15 min a temperatura de 11 grados centígrados para lograr la óptima esterilización.

En la etapa de obtención y sembrado de las células se utilizó un mango de bisturí del no. 3, dos pinzas de disección y dos pinzas algodonerías. Los procedimientos se llevaron a cabo en una estación de trabajo de flujo de aire laminar NUAIRE.



Figura 6. Estación de trabajo de flujo de aire laminar NUAIRE



Figura 7. Estación de trabajo de flujo de aire laminar con luz uv para desinfección

Antes de realizar la disección y obtención de las células se desinfecto la superficie de trabajo con una gasa húmeda de alcohol etílico, posteriormente toda la estación con luz UV por 5 min, después de realizar esta fase previa de desinfección se introdujo el material de disección, vasos de precipitado, jeringas, gasas, cajas petri, medios de cultivo previamente preparados El medio de cultivo se suplementa con 10% de suero fetal bovino (Gibco, USA), 1% de antibióticos y antimicóticos. y ratones inmersos en un vaso con alcohol. Todo esto con el fin de eliminar fuentes de contaminación a las células sembradas.



Figura 8. Medio de cultivo Alpha DMEM:F-12

6. OBTENCIÓN DE CÉLULAS

Con los ratones desinfectados en el vaso de precipitado con alcohol etílico, se procede a secarlos con gasas estériles para eliminar el exceso de alcohol y después ser colocados uno por uno en la mesa de disección fabricada en una base de unicel y cubierta con papel aluminio, y esta a su vez previamente desinfectada con gasas húmedas de alcohol.

Posteriormente colocamos ambos medios de cultivo en diferentes cajas Petri, identificando cada una para el tipo de células que sembramos. Con las agujas que utilizamos fijamos cada ratón a la mesa de disección clavándolas de las extremidades superiores, una vez hecho se realiza la primera incisión a nivel posterior del cráneo en forma de semicírculo con un mango de bisturí no.3 y una hoja no.15 unos mm antes de la aurícula del oído, después con ayuda de las pinzas se desprende la piel hacia arriba en un movimiento único y continuo, para exponer y extraer los huesos del cráneo y colocarlos en el medio de cultivo F12-DMEM.



Figura 9. Ratón en mesa de disección

Para la obtención y sembrado de las células osteoclasticas se hizo la incisión a nivel de la tibia realizando el mismo principio de desprender la piel y exponerla para después extraerla, estas fueron colocadas en una caja Petri con medio de cultivo ALPHA-MEM.

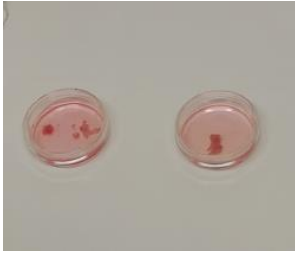


Figura 10. Tibias y huesos craneales en medio de cultivo



Figura 11. Micropipeta

Con los huesos de medula en la caja Petri y con respectivo medio de cultivo se procede a triturarlos con ayuda del bisturí y las pinzas.

Realizado esto, lo siguiente es la recolección del medio de cultivo, este se aspira de las cajas Petri con una jeringa de 5 ml estéril para cada uno de los medios, y verterlos en tubos Falcon™ de 14 ml para después ser centrifugados, en el caso de las células de cráneo con medio f12 se le agregara adicionalmente tripsina en la misma cantidad de ml que se le vierte medio para equilibrar los niveles de pH.

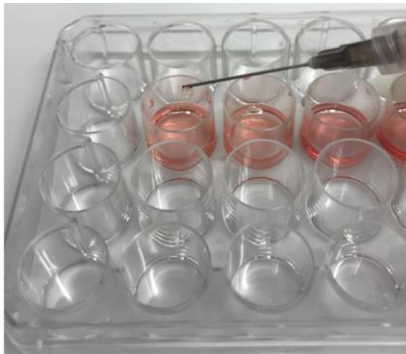


Figura 12. Sembrado de cultivos celulares



Figura 13. Centrifuga BECKMAN

Una vez realizado el paso de centrifugar los medios por 5 min a 1500 rpm (BECKMAN, GS-15R Centrifuge) se encontraran en el fondo del tubo falcon el botón celular de célula. Ya identificado el botón celular se decanta el sobrenadante dejando únicamente el botón celular. Solo para volver a añadir 1 ml de medio de cultivo nuevo con jeringas estériles y ser mezclado por un vortex.

El siguiente procedimiento consiste en aspirar de los tubos falcon el medio de cultivo con jeringas estériles para realizar el sembrado de las células en cajas Petri de 24 pozos de 1.5 cm.

Utilizando 7 pozos lo más cercanos al centro de la caja Petri.

Este sembrado se realizó por goteo en cada uno de los pozos, agregando un 1 ml en cada uno de ellos.

Por último se sellaron ambas cajas con cinta masking, identificando cada una con un plumón indeleble el tipo de células sembrados.

Se observaron y tomo fotografías de las células mediante un microscopio electrónico.



Figura 14. Microscopio electrónico

Para concluir guardando las cajas Petri en la incubadora (New-Air, USA) a una atmosfera de 5% de CO₂ Y 95% de aire a temperatura de 37 grados Celsius.



Figura 15. Incubadora

6.1. MANTENIMIENTO Y MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS

Las células se observaron cada 24 horas a través del microscopio electrónico tomando fotografías de las mismas, además realizando un lavado cada 48 horas, aspirando y depositando nuevamente el medio de cultivo con una jeringa estéril para cada una de las cajas, repitiendo esto 3 veces por pozo y arrojando el excedente un vaso de precipitado. Paso siguiente es la colocación de medio de cultivo nuevo de 1 ml para cada pozo. Todo esto en la estación de trabajo de flujo de aire laminar NUAIRE.

Se observa en el microscopio la mejora de la visibilidad celular en cada pozo y se toman fotografías.

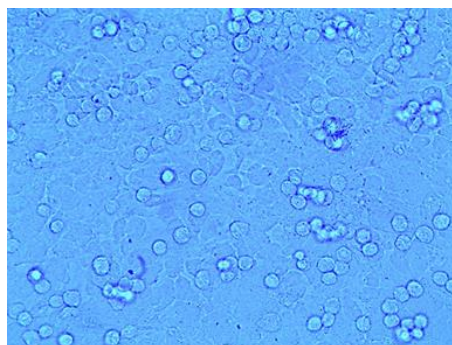


Figura 16. Osteoblastos cultivados *in vitro* durante los experimentos

6.2. PRUEBA DE FOSFATASA ÁCIDA RESISTENTE AL TARTRATO (TRAP-POSITIVA).

Las células obtenidas de la médula ósea fueron sembradas a una densidad de 1×10^4 en cada pozo ($N = 5$). Fueron observadas en un microscopio invertido durante el curso del experimento (dos semanas).

Transcurrido el plazo, se removió todo el medio de los pozos y se lavó cada uno de éstos con $100 \mu\text{L}$ de PBS. Posteriormente se adicionaron $50 \mu\text{L}$ de fijador a cada pozo durante 5 min a temperatura ambiente. Luego se lavaron tres veces con $250 \mu\text{L}$ de dH_2O .

Se disolvió un vial de 1 mL de substrato cromógeno con 5 mL de buffer conteniendo tartrato y se adicionaron $50 \mu\text{L}$ de substrato cromógeno a cada pozo.

Una vez realizado esto se incubaron las células de 20 a 60 min a 37°C ., para luego observar las células en el microscopio invertido hasta teñirse de color rojo las células osteoclásticas para su corroboración.

Se detuvo la reacción con $200 \mu\text{L}$ de dH_2O y se tomaron fotografías digitales de los osteoclastos identificados a través de la prueba TRAP positiva (Kamiya Biomedical Company, USA).

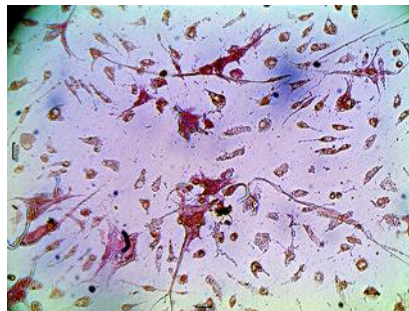


Figura 17. Las células derivadas de la médula ósea en osteoclastos fueron corroborados a través de la prueba de resistencia al tartrato (TRAP +)

6.3. ESTIMULACIÓN POR MICRO-VIBRACIÓN

Las células son sujetas a micro-vibraciones (0.25N; 30hz) en las cajas de cultivo de 1.5 cm utilizando el aparato AcceleDent® (Ortho Accel, USA) sosteniendo la caja Petri con cinta masking durante 20 min.

Previamente se colecta 1ml de sobrenadante de cada pozo antes de vibrar (grupo control) identificando cada uno de ellos con plumón indeleble en micro tubos. También después de vibrar se colectara 1 ml del sobrenadante (Grupo experimental). Para después

Se colocaron todos los micro tubos de ambos grupos en un recipiente para ser almacenadas en el ultra congelador a <70 grados Celsius (Thermo Scientific, USA).

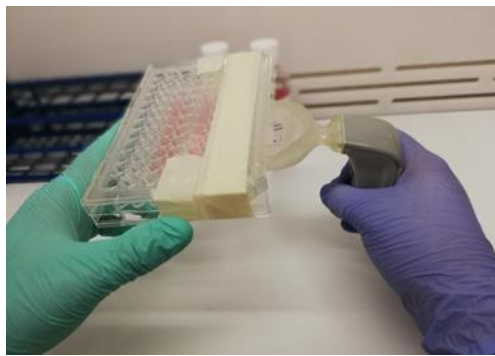


Figura 18. Micro-vibración de cultivos celulares

6.4. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ELISA)

El ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas, se caracteriza por ser una técnica que requiere de una placa de 96 pozos en la que se añadirá un anticuerpo primario que reconoce al antígeno y que también es reconocido por un anticuerpo secundario.

La tinción o cambio de color que ocurre en los pozos permite medir indirectamente por medio de la espectrofotometría el antígeno en las muestras.

Previo a esto se preparan las soluciones para la realización de la prueba ELISA, que son: Buffer Fosfato Salino (PBS), Buffer de Lavado, Buffer de Bloqueo y Diluyente. Con las soluciones preparadas se puede iniciar la preparación de la placa.

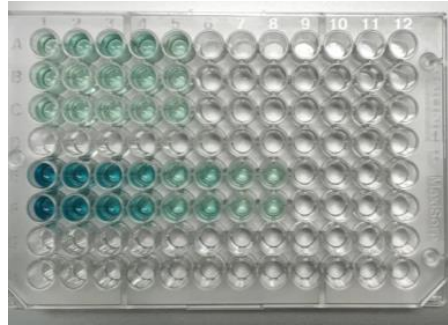


Figura 19. Placa ELISA teñida

6.4.1. BUFFER FOSFATO SALINO (PBS)

Se añaden 800 ml de agua destilada en un recipiente de 1 litro. Después se agregan 9.5 gramos polvo PBS-Dulbecco, una vez añadido todo al vaso matraz se agregan los imanes al recipiente en una placa magnética (Pyro-Magnestir) para disolver y omologar el polvo PBS-Dulbecco con el agua destilada. Por ultimo se agregan 200 ml de agua destilada.



Figura 20. Placa magnética

6.4.2. BUFFER DE LAVADO

Se colocan 800 ml de agua destilada en un recipiente de 1 litro. Posteriormente se añaden 9.5 de polvo PBS-Dulbecco, y se agregan 0.5 ml de Tween-20 en 1 litro de agua destilada.

6.4.3. BUFFER DE BLOQUEO

En un vaso matraz se colocan 100 ml de PBS previamente preparado, se agrega albumina de suero bovino a una concentración de 1%. Finalmente se diluye 0.1 gramos de BSA en 100 ml de PBS.

6.4.4. DILUYENTE

Se agregan 100 ml de PBS previamente preparado en un vaso de matraz, a continuación se añade 0.1 gramos de BSA, realizado esto se añaden 0.05 ml de Tween-20 y diluir.

6.5. CAPTURA DE PLACA

6.5.1. DILUCIÓN DEL ANTICUERPO

Centrifugamos el anticuerpo de las citocinas, después agregar 1ml agua destilada.



Figura 21. Mini centrifuga

Acto siguiente se agregó 1ul de citocina en 10 ml de PBS en un tubo Falcon™, hecho esto se mezcla y coloca en un recipiente estéril para poder absorber 5 µl con una pipeta multicanal hasta llenar los 96 pozos.

Con aluminio se cubre la placa indicando con que citocina se trabajó y la hora exacta que se cubrió para dejarla reposando durante 24 horas a temperatura ambiente.

6.5.2. Lavado

Lavar 4 veces con buffer de lavado la placa (300 µl por pozo) en una charola con movimientos verticales repetidas veces, hasta sacudir y dejar sin burbujas la placa en los 96 pozos

6.5.3. BLOQUEO

Se añade el buffer de bloqueo (300 µl por pozo) con la pipeta multicanal en los 96 pozos. Se vuelve a colocar el papel aluminio por encima de la placa y se deja 1 hora incubando a temperatura ambiente, anotando la hora de inicio.

6.5.4. ASPIRADO Y LAVADO

Se repite el proceso de lavado.

6.5.5. CURVA ESTÁNDAR

Se absorben 998 µl de diluyente y se mezclan con 2 µl de la citocina correspondiente para cada procedimiento. Posteriormente se agrega 100 µl de las muestras de control y experimentales (antes y después de vibrar) de cráneo y médula respectivamente que se encuentran en los micro tubos antes colocados en el ultra congelador, a cada pozo y se dejan incubando a temperatura ambiente al menos dos horas.

En dos líneas horizontales (eje G y H) se añaden 100 ul de diluyente con citocina a los pozos de esas líneas ($1/2$ x, $1/4$ x, $1/8$ x, $1/16$ x, $1/32$ x) después se dejan incubando a temperatura ambiente durante 20 min.

Del pozo 1_x se recolectan 300ul de la curva y así sucesivamente con los siguientes pozos de esas dos líneas.

6.5.6 DETECCIÓN

Se repite el procedimiento de lavado. Se centrifuga el anticuerpo de detección y añade agua destilada al anticuerpo.

Se vierten 10 ml de diluyente en tubo Falcon™, acto siguiente se agregan 2ul del anticuerpo de detección.

Una vez mezclados se agregan 100 μ l a cada pozo de las muestras y se deja reposar durante treinta minutos a temperatura ambiente.

6.5.7. CONJUGADO DE AVIDIN PEROXIDASA

Diluir avidin peroxidasa (5.5 μ l) en 10.994ml) de diluyente en un tubo Falcon™

Lava y aspira la placa de 96 pozos, cuatro veces.

Se agregan 100 μ l de la mezcla de avidin peroxidasa, añadiendo 100 μ l por pozo. Dejar a temperatura ambiente durante veinte a treinta minutos.

6.5.8. SUSTRATO LÍQUIDO (ABTS)

Se repite el proceso de lavado.

Agregar 100 μ l ABTS en cada pozo después del lavado, realizado esto se deja a temperatura ambiente y monitoreando de 5 a 40 minutos por intervalos de 5 minutos a la expectativa de un cambio de color.

Cada 5 minutos se toma lectura de cada placa (3 lecturas) con el lector de ELISAs (LabSystems Multiskan MS) a 450 nm con corrección de 650 nm.

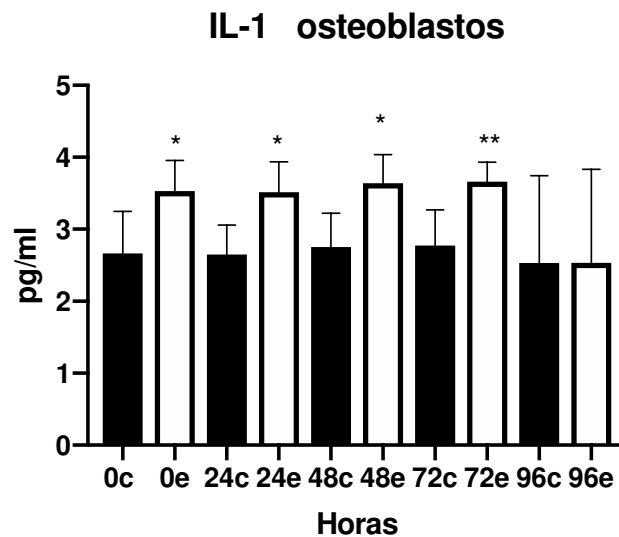
7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Hubo una sobre regulación de IL-1B y TNF-a que sobre regulan RANKL, por lo tanto debe inducir diferenciación osteoclasticas, sin embargo los resultados mostraron que la micro-vibración produjo una baja sobre-regulación de RANKL, por lo que inhibe la diferenciación osteoclástica, esto se debe a que la micro-vibración en estudios previos demostraron que sobre-regula OPG un efecto mediado por IL-4 e IL-13. (García-López et al., 2017).

8. RESULTADOS

IL-1 β Osteoblastos										
	0c	0e	24c	24e	48c	48e	72c	72e	96c	96e
Promedio	2,665	3,532	2,648	3,515	2,754	3,642	2,774	3,661	2,531	2,536
Desviación estándar	\pm 0,583	\pm 0,425	\pm 0,409	\pm 0,421	\pm 0,470	\pm 0,393	\pm 0,493	\pm 0,271	\pm 1,213	\pm 1,296

Tabla 1. Resultado IL-1 β Osteoblastos micro-vibrados con el aparato AcceleDent® en cultivos sometidos con esta citocina por medio del ensayo ELISA con el promedio \pm SEM para 5 cultivos. Presentados antes de micro-vibrar (c) y después de micro-vibrar (e) de la micro-vibración durante 5 días (0 a 96 horas).

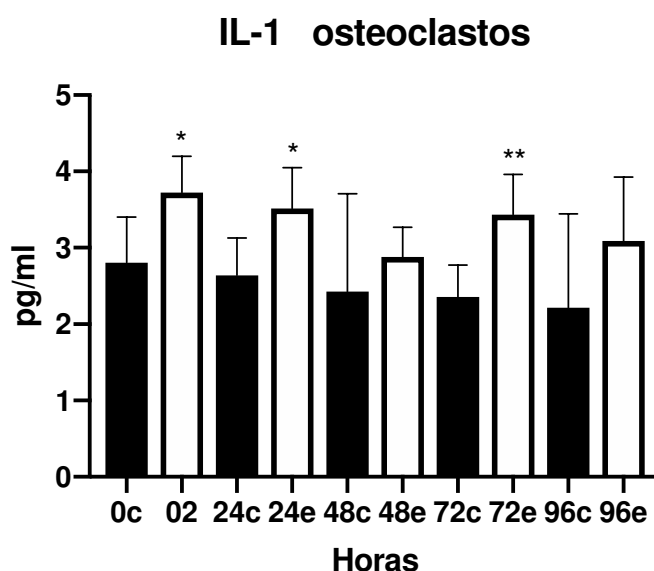


Gráfica 1. IL-1 β Osteoblastos

Los resultados mostrados por el promedio \pm (Error Estándar de la Media) para 5 cultivos. Resultado del efecto de la micro-vibración de baja magnitud y alta frecuencia durante 20 minutos por medio del aparato AcceleDent® en cultivos de osteoblastos interactuando con la IL-1 β de las 0-96 horas, El grupo experimental (barra verde), el grupo de control (barra negra) *P<0.01. ** P<0.001.

IL-1 β Osteoclastos										
Hora y grupo	0c	0e	24c	24e	48c	48e	72c	72e	96c	96e
Promedio	2,807	3,725	2,639	3,514	2,426	2,881	2,358	3,435	2,214	3,088
Desviación estándar	\pm 0,597	\pm 0,475	\pm 0,489	\pm 0,533	\pm 1,281	\pm 0,386	\pm 0,413	\pm 0,526	\pm 1,230	\pm 0,804

Tabla 2. Resultado IL-1 β Osteoclastos micro-vibrados con el aparato AcceleDent® en cultivos sometidos con esta citocina por medio del ensayo ELISA con el promedio \pm SEM para 5 cultivos. Presentados antes de micro-vibrar (c) y después de micro-vibrar (e) de la micro-vibración durante 5 días (0 a 96 horas).



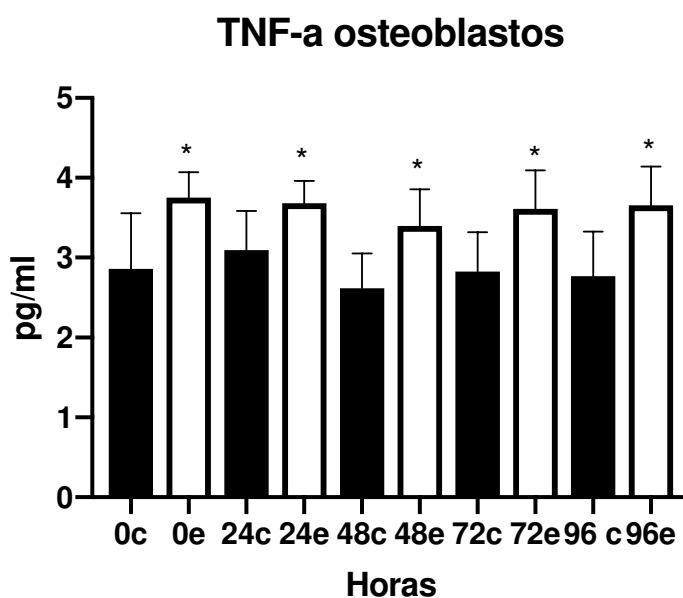
Gráfica 2. IL-1 β Osteoclastos.

Resultado presentado basado en el promedio \pm SEM para 5 cultivos.

Esta grafica representa el resultado del efecto de la micro-vibración de baja magnitud y alta frecuencia por medio del dispositivo AcceleDent® durante 20 minutos en cultivos de osteoclastos con interacción de IL-1 β por 5 días (0-96 horas). Grupo experimental (barra blanca), grupo control (barra naranja) *P<0.01. ** P<0.001.

TNF- α Osteoblastos										
Hora y grupo	0c	0e	24c	24e	48c	48e	72c	72e	96c	96e
Promedio	2,860	3,750	3,096	3,680	2,618	3,396	2,857	3,612	2,767	3,655
Desviación estándar	\pm 0,696	\pm 0,318	\pm 0,488	\pm 0,282	\pm 0,436	\pm 0,459	\pm 0,493	\pm 0,480	\pm 0,559	\pm 0,484

Tabla 3. Resultado TNF- α Osteoblastos micro-vibrados con el aparato AcceleDent® en cultivos sometidos con esta citocina por medio del ensayo ELISA con el promedio \pm SEM para 5 cultivos. Presentados antes de micro-vibrar (c) y después de micro-vibrar (e) de la micro-vibración durante 5 días (0 a 96 horas).

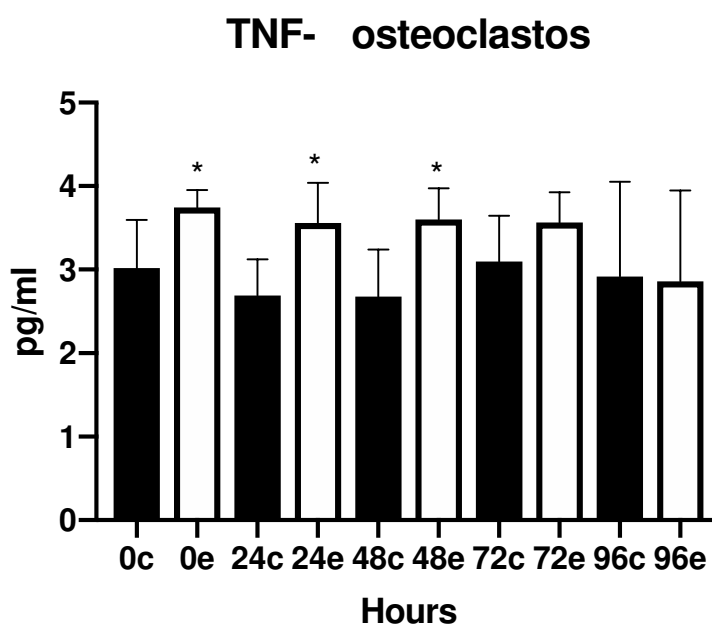


Gráfica 3. TNF- α Osteoblastos.

Los resultados son presentados basados en el promedio \pm SEM para 5 cultivos. Resultado del efecto de la micro-vibración de baja magnitud y alta frecuencia por medio del dispositivo AcceleDent® durante 20 minutos en cultivos de osteoblastos en interacción de TNF- α de 0-96 horas. Grupo experimental (barra blanca), grupo control (barra amarilla) *P<0.01. ** P<0.001.

TNF- α Osteoclastos										
Hora y grupo	0c	0e	24c	24e	48c	48e	72c	72e	96c	96e
Promedio	3,020	3,745	2,691	3,560	2,676	3,566	3,602	2,860	2,921	3,096
Desviación estándar	\pm 0,573	\pm 0,208	\pm 0,433	\pm 0,479	\pm 0,563	\pm 0,370	\pm 0,547	\pm 0,359	\pm 1,131	\pm 1,087

Tabla 4. Resultado TNF- α Osteoclastos micro-vibrados con el aparato AcceleDent® en cultivos sometidos con esta citocina por medio del ensayo ELISA con el promedio \pm SEM para 5 cultivos. Presentados antes de micro-vibrar (c) y después de micro-vibrar (e) de la micro-vibración durante 5 días (0 a 96 horas).

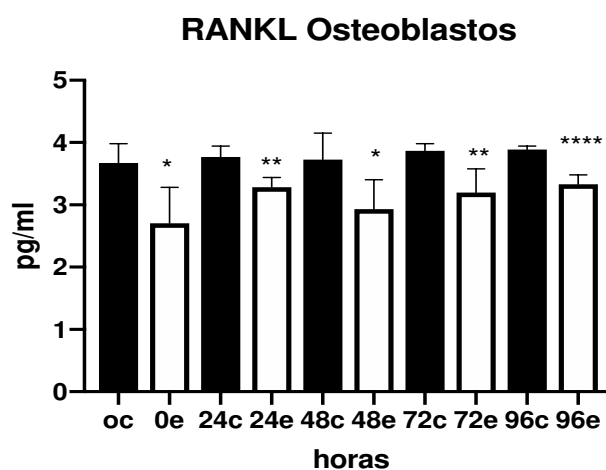


Gráfica 4. TNF- α Osteoclastos

El resultado del efecto de la micro-vibración de baja magnitud y alta frecuencia por medio del dispositivo AcceleDent® durante 20 minutos en cultivos de osteoclastos en interacción de TNF- α de las 0-96 horas. Grupo experimental (barra rosa), grupo control (barra negra) *P<0.01. ** P<0.001. Los resultados son presentados basados en el promedio \pm SEM para 5 cultivos.

RANKL Osteoblastos										
Hora y grupo	0c	0e	24c	24e	48c	48e	72c	72e	96c	96e
Promedio	3,674	2,704	3,769	3,284	3,728	2,929	3,868	3,194	3,889	3,330
Desviación estándar	± 0,307	± 0,577	± 0,175	± 0,154	± 0,423	± 0,472	± 0,113	± 0,379	± 0,056	± 0,153

Tabla 5. Resultado RANKL Osteoblastos micro-vibrados con el aparato AcceleDent® en cultivos sometidos con esta citocina por medio del ensayo ELISA con el promedio \pm SEM para 5 cultivos. Presentados antes de micro-vibrar (c) y después de micro-vibrar (e) de la micro-vibración durante 5 días (0 a 96 horas).

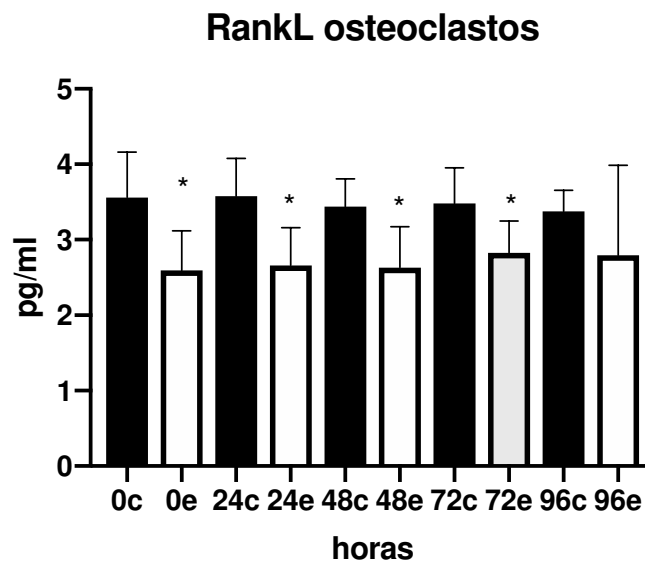


Gráfica 5. RANKL Osteoblastos

Resultado del efecto de la micro-vibración de baja magnitud y alta frecuencia por medio del dispositivo AcceleDent® en cultivos de osteoblastos sobre la alteración de RANK-L de las 0-96 horas, Grupo experimental (barra blanca), grupo control (barra morada) * $P < 0.01$. ** $P < 0.001$. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM para 5 cultivos.

RANKL Osteoclastos										
Hora y grupo	0c	0e	24c	24e	48c	48e	72c	72e	96c	96e
Promedio	3,562	2,592	3,578	2,661	3,440	2,630	3,480	2,827	3,377	2,795
Desviación estándar	± 0,599	± 0,528	± 0,499	± 0,499	± 0,367	± 0,545	± 0,472	± 0,423	± 0,278	± 1,188

Tabla 6. Resultado RANKL Osteoclastos micro-vibrados con el aparato AcceleDent® en cultivos sometidos con esta citocina por medio del ensayo ELISA con el promedio \pm SEM para 5 cultivos. Presentados antes de micro-vibrar (c) y después de micro-vibrar (e) de la micro-vibración durante 5 días (0 a 96 horas).



Gráfica 6. RANKL Osteoclastos

Resultado del efecto de la micro-vibración de baja magnitud y alta frecuencia por medio del dispositivo AcceleDent® en cultivos de osteoclastos sobre la alteración de RANK-L de las 0-96 horas, Grupo experimental (barra blanca), grupo control (barra azul) *P<0.01. ** P<0.001. Los resultados son presentados como el promedio \pm SEM para 5 cultivos.

9. DISCUSIÓN

El presente estudio tuvo como objetivo demostrar la interacción y efectos que ocurren en cultivos de células osteoblasticas derivadas de cráneo y osteoclasticas derivadas de médula ósea bajo la aplicación de una carga cíclica de microvibración de baja magnitud a una frecuencia de 30 Hz durante 20 minutos ininterrumpidos. Con el propósito de entender como la microvibración pudiera acelerar el movimiento dentario, se evaluaron las citocinas como la IL-1 β , Tnf- α y RANK-L, para determinar su actividad biológica.

Los resultados demostraron que hubo una sobre regulación de IL-1 β y el TNF- α en célula osteoblasticas y osteoclasticas, estimuladas por medio de la microvibración, efecto que va dirigido a inducir actividad osteoclastica, a través de la estimulación de RANKL (Esparza, et al., 2016), tomando en consideración la hipótesis planteada, esta se confirmó. La sobre-regulación de TNF-alfa en células osteoblasticas puede estar sustentada en la teoría que menciona que una vez estimuladas las citocinas por contacto osteoclastico y depositando la sustancia osteoide en el sitio de resorción ósea inicia la formación de hueso, es decir osteogénesis, siempre y cuando sea estimulada en forma fisiológica. (García-López, et al., 2017).

Por lo tanto, tomando en cuenta todo lo investigado y analizando los resultados de este reporte de investigación, se considera que es conveniente hacer un estudio *in vitro* en el que se analice conjuntamente las citocinas la IL-1, y TNF- α en conjunto con la IL-6, citocina que también participa en la estimulación de RANKL bajo el efecto de un estímulo de microvibración de baja magnitud y alta frecuencia en cultivos de células de osteoblastos y osteoclastos en un medio de cultivo M-CSF, además de manera coordinada sobre la interacción de RANK, RANKL y OPG.

La hipótesis planteada en este estudio fue que la micro-vibración sobre regula la expresión de RANKL en células óseas, sin embargo el estudio demostró que la micro-vibración tuvo un efecto de baja regulación. Por una parte RANKL es

una de las moléculas de señalización clave que facilitan la comunicación cruzada entre los osteoblastos y los osteoclastos, y ayudan a coordinar la remodelación ósea, (Teitelbaum & Ross 2003). RANKL se expresa idealmente por los osteoblastos para inducir la diferenciación osteoclástica a través de los monocitos circulantes en el torrente sanguíneo de las pequeñas arterias que se encuentran en el hueso, estos al recibir el RANK-L a través de su receptor RANKr, el monocito se diferencian en osteoclastos. Por otro lado el ligando de Rank actúa de manera coordinada con su receptor RANKr y su decodificador Osteoprotegerina (OPG), también conocida como factor inhibidor de osteoclastos (OCIF) o factor de unión a osteoclastos (OBF), que también es expresado idealmente por los osteoblastos, factor clave que inhibe la diferenciación y activación de los osteoclastos y, por lo tanto, es esencial para la resorción ósea y formación de hueso (McGrath, 2011).

Tomando en consideración que hubo una sobre regulación de IL-1 β y TNF- α , citocinas que tienen acción directa sobre la expresión de RANK-L, gen que contribuye a la diferenciación osteoclástica, sin embargo la micro-vibración mostró que hubo una baja regulación de Rank-L, lo cual inhibe la actividad osteoclástica, un efecto mediado por la expresión de IL-4 e IL-13, ambas citocinas que estimulan a OPG a través de la microvibración, lo cual contribuye a un incremento en la densidad ósea. (García-López et al., 2013).

Estudios posteriores deben ser evaluados con diferentes tipos de citocinas para poder entender como la micro-vibración a nivel celular y molecular pueden acelerar el movimiento dental durante el tratamiento de ortodoncia, sin embargo este estudio mostró que la micro-vibración tiene efectos positivos sobre la densidad ósea, la cual contribuye como tratamiento no invasivo en la estimulación de la remodelación ósea.

10. CONCLUSIONES

- a) La micro-vibración mediante el aparato Acceledent® de baja magnitud y alta frecuencia a 30Hz estimuló la sobre regulación de IL-1 y TNF- α , una baja regulación de Rank-L en células óseas cultivadas *in vitro*.
- b) La micro-vibración de alta frecuencia, baja densidad tiene efectos benéficos en el incremento de la densidad ósea que puede ser aplicada en la pérdida de hueso
- c) Estudios posteriores son propuestos con diferentes citocinas para poder determinar como la micro-vibración pudiera acelerar el movimiento dental durante el tratamiento ortodóntico, efecto que a la fecha no ha sido determinado.

11. REFERENCIAS

1. Bajada, S., Mazakova, I., Richardson, J. B., & Ashammakhi, N. (2008). Updates on stem cells and their applications in regenerative medicine. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 2(4), 169-183.
2. Balkwill & Burke F. The cytokine network. *Immunol Today* 1989;
3. 10:299 304
4. Bonewald LF, Mundy GR. Role of transforming growth factor-beta in bone remodeling. *Clin Orthop*. 1990; (250):261-76.
5. Caetano J, Canhao H, Fonseca JE. Osteoblasts and bone formation. *Acta reumatol Port*.2007. Apr-Jun; 32(2):103-10.
6. Caio Marcio Barros de Oliveiral; Rioko Kimiko Sakata, TSAll; Adriana Machado Issylll; Luis Roberto GerolaIV; Reynaldo Salomão. Citocinas e dor. *Rev. Bras. Anestesiol*. vol.61 no.2 Campinas Mar./Apr. 2011
7. Chagastelles, P. C., & Nardi, N. B. (2011). Biology of stem cells: an overview. *Kidney international supplements*, 1(3), 63-67.
8. Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than 'bone eaters'. *Trends Mol Med*. 2014 Aug; 20 (8):449-59. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.001>.
9. Choy EH, Panayi GS (2001). Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* 344:907-916.
10. Doherty AH, Ghalambor CK, Donahue SW. (2015). Evolutionary Physiology of bone: Bone metabolism in changing environments. *American Physiology society*. Vol. 30, No. 1 <https://doi.org/10.1152/physiol.00022.2014>.
11. Day, T. F., & Yang, Y. (2008). Wnt and hedgehog signaling pathways in bone development. *JBJS*, 90(Supplement_1), 19-24.
12. Esparza-Guerrero, Y., Nava-Valdivia, C. A., Saldaña-Cruz, A. M., Vásquez-Jiménez, J. C., Farías-Cuevas, K. P., Enríquez-Luna, A., ... & Corona-Sanchez, E. G. (2016). El sistema RANK/RANKL/OPG y sus implicaciones clínicas en la osteoporosis. *El Residente*, 11(3), 99-104.
13. Filella, X., Molina, R., & Ballesta, A. M. (2002). Formación continuada del médico práctico: estructura y función de las citocinas. *Medicina integral: Medicina preventiva y asistencial en atención primaria de la salud*, 39(2), 63-71.

14. Florencio-Silva, R., Sasso, G. R. D. S., Sasso-Cerri, E., Simões, M. J., & Cerri, P. S. (2015). Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. *BioMed research international*, 2015.
15. Flores Rentería, M. Á., & Ayala Ruiz, Á. (2012). Efectos en la Remodelación Ósea Debido a la Aplicación de Tornillos en Fémur Proximal. *Ingeniería mecánica, tecnología y desarrollo*, 4(2), 43-50.
16. Gan, S. D., & Patel, K. R. (2013). Enzyme immunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay. *J Invest Dermatol*, 133(9), e12.
17. García, R. R., Moreno, P. R., & Muñoz-Torres, M. (2008). Regulación del proceso de remodelado óseo. *Revista española de enfermedades metabólicas óseas*, 17(1), 10-14.
18. García-López, Rosina Villanueva, Murray C. Meikle. (2015). the effects of gentle micropulse vibration on two types of murine osteoblasts. *American Association of Orthodontists*, mayo 15-19 2015.
19. García-López S, Villanueva R and Meikle MC. Alterations in the synthesis of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and their downstream targets RANKL and OPG by mouse calvarial osteoblasts in vitro: inhibition of bone resorption by cyclic mechanical strain. *Front. Endocrinol.* 2013 4:160. doi: 10.3389/fendo.2013.0016.
20. García-López S., Villanueva R., Massó F, Páez A., and Meikle MC. Micro-vibration on osteoblasts and bone marrow derivate osteoclasts cultivated in vitro produce soluble factors for osteoclast inhibition. *European Journal of Orthodontics* 2018;40 (5):e1-e233 <https://doi.org/10.1093/ejo/cjy060>
21. García-López S, Villanueva R., Noriega L, Pérez JL. Evaluación de la microvibración en osteoblastos y osteoclastos, cultivados *in vitro*, sobre la producción de IL-4 e IL-13, con el Uso de Aceledent. *Ortodoncia Actual* 2017; 14(54):42-45.
22. Graves, D. T., Delima, A. J., Assuma, R., Amar, S., Oates, T., & Cochran, D. (1998). Interleukin-1 and tumor necrosis factor antagonists inhibit the progression of inflammatory cell infiltration toward alveolar bone in experimental periodontitis. *Journal of periodontology*, 69(12), 1419-1425.
23. Hernández-Gil, I., Gracia, M. A. A., Pingarrón, M., & Jerez, L. (2006). Physiological bases of bone regeneration II. The remodeling process. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 11, E151-215.

24. Hongbao Ma, Kuan-Jiunn Shieh, Sheau-Long Lee. Study of ELISA Technique. (2006) Department of Medicine, Michigan State University, East Lansing, Michigan, USA. *Nature and Science*, 4(2).
25. Jee WS (2001) Integrated Bone Tissue Physiology. In *Bone Mech. Handbook*, Second Ed., 1-68. CRC Press, March 15. doi:10.1201/b14263-3.
26. Jing, D., Xiao, J., Li, X., Li, Y., & Zhao, Z. (2017). The effectiveness of vibrational stimulus to accelerate orthodontic tooth movement: a systematic review. *BMC oral health*, 17(1), 143. doi:10.1186/s12903-017-0437-7.
27. Keith R. Brunt, Richard D. Weisel, Ren-Ke Li (2012). Stem cells and regenerative medicine — future perspectives. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, <https://doi.org/10.1139/y2012-007-90:327-335>
28. Lerner, U. H. (2006). Inflammation-induced bone remodeling in periodontal disease and the influence of post-menopausal osteoporosis. *Journal of dental research*, 85(7), 596-607.
29. Lin, E., Calvano, S. E., & Lowry, S. F. (2000). Inflammatory cytokines and cell response in surgery. *Surgery*, 127(2), 117-126.
30. Locklin RM, Khosla S, et al. Mediators of the biphasic responses of bone to intermittent and continuously administered parathyroid hormone. *J Cell Biochem*. 2003; 89(1):180–90.
31. Martínez-Canabal, A., & Rivas-Arancibia, S. (2005). Funciones de las prostaglandinas en el sistema nervioso central. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 48(5), 210-216.
32. Mata-Miranda, M., Vázquez-Zapién, G. J., & Sánchez-Monroy, V. (2013). Generalidades y aplicaciones de las células madre. *Perinatología y reproducción humana*, 27(3), 194-199.
33. Mc Garrigle, M. J., Mullen, C. A., Haugh, M. G., Voisin, M. C., & McNamara, L. M. (2016). Osteocyte differentiation and the formation of an interconnected cellular network in vitro. *Eur. Cells Mater*, 31, 323-340.
34. McGrath E. La ruta OPG / RANKL / RANK como un objetivo terapéutico en el cáncer. Septiembre de 2011, volumen 6, número 9, páginas 1468–1473. *Journal of Thoracic Oncology*.
35. *Medical Physiology: Emile L. Boulpaep; Walter F. Boron. Imagen ... Walter F. Boron MD PhD, Emile L. Boulpaep MD.... Publicado por Elsevier Saunders (2005).*

36. Miles, P. (2017). Accelerated orthodontic treatment-what's the evidence? *Australian dental journal*, 62, 63-70.
37. Miles, P., & Fisher, E. (2016). Assessment of the changes in arch perimeter and irregularity in the mandibular arch during initial alignment with the AcceleDent Aura appliance vs no appliance in adolescents: a single-blind randomized clinical trial. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 150(6), 928-936.
38. Moreno, J. L., Kaczmarek, M., Keegan, A. D., & Tondravi, M. (2003). IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood*, 102(3), 1078-1086.
39. Mundy, G. R. (1993). Role of cytokines in bone resorption. *Journal of cellular biochemistry*, 53(4), 296-300.
40. Nicks, K. M., Perrien, D. S., Akel, N. S., Suva, L. J., & Gaddy, D. (2009). Regulation of osteoblastogenesis and osteoclastogenesis by the other reproductive hormones, Activin and Inhibin. *Molecular and cellular endocrinology*, 310(1-2), 11–20. doi:10.1016/j.mce.2009.07.001
41. Nishimura, M., Chiba, M., Ohashi, T., Sato, M., Shimizu, Y., Igarashi, K., & Mitani, H. (2008). Periodontal tissue activation by vibration: intermittent stimulation by resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics*, 133(4), 572-583.
42. Oliveira, Caio Marcio Barros de, Sakata, Rioko Kimiko, Issy, Adriana Machado, Gerola, Luis Roberto, & Salomão, Reynaldo. (2011). Citocinas e dor. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, 61(2), 260-265. <https://dx.doi.org/10.1590/S0034-70942011000200014>.
43. Palazzini S, Palumbo C, Ferretti M, Marotti G (1998). Stromal cell structure and relationships in perimedullary spaces of chick embryo shaft bones. *Anat Embryol (Berl)*. 197: 349-357.
44. Pavlin, D., Anthony, R., Raj, V., & Gakunga, P. T. (2015, September). Cyclic loading (vibration) accelerates tooth movement in orthodontic patients: a double-blind, randomized controlled trial. In *Seminars in Orthodontics* (Vol. 21, No. 3, pp. 187-194). WB Saunders. <https://doi.org/10.1053/j.sodo.2015.06.005>.
45. Prystaz, K., Kaiser, K., Kovtun, A., Haffner-Luntzer, M., Fischer, V., Rapp, A. E., & Ignatius, A. (2018). Distinct effects of IL-6 classic and trans-signaling in bone fracture healing. *The American journal of pathology*, 188(2), 474-490.

46. Rodríguez-Montaña, R., del Carmen López-Elías, M., de Jesús Pérez-Murillo, M., & Guerrero-Velázquez, C. (2015). The role of IFN- γ , IL-12, IL-18 and its receptors in periodontitis. *Revista Mexicana de Periodontología*, 6(1), 33-39.
47. Rosenberg, N., Rosenberg, O., & Soudry, M. (2012). Osteoblasts in bone physiology—mini review. *Rambam Maimonides medical journal*, 3(2).
48. Ruan, X. Y., Jin, F. Y., Liu, Y. L., Peng, Z. L., & Sun, Y. G. (2008). Effects of vibration therapy on bone mineral density in postmenopausal women with osteoporosis. *Chinese medical journal*, 121(13), 1155-1158.
49. Shah, A. (2017). Use of Vibration in Orthodontics.
50. Shi, H. F., Cheung, W. H., Qin, L., Leung, A. H. C., & Leung, K. S. (2010). Low-magnitude high-frequency vibration treatment augments fracture healing in ovariectomy-induced osteoporotic bone. *Bone*, 46(5), 1299-1305.
51. García-López, Rosina Villanueva, Murray C. Meikle. (2015). the effects of gentle micropulse vibration on two types of murine osteoblasts. *American Association of Orthodontists*, mayo 15-19 2015.
52. García López, S., Villanueva, R. E., Parra, R. B., Montaña, L. F., Massó, L. F., & Amador, V. R. (2003). Determinación de la producción de interleucina-1 β al estímulo mecánico en osteoblastos humanos cultivados in vitro. *Revista de la Asociación Dental Mexicana*, 60(3), 85-89.
53. Steeve, K. T., Marc, P., Sandrine, T., Dominique, H., & Yannick, F. (2004). IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology. *Cytokine & growth factor reviews*, 15(1), 49-60.
54. Taichman, R. S. (2005). Blood and bone: two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem-cell niche. *Blood*, 105(7), 2631-2639.
55. Teitelbaum SL, Ross FP. Genetic regulation of osteoclast development and function. *Nat Rev Genet*. 2003; 4:638–49.
56. Thomson, J. A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S. S., Waknitz, M. A., Swiergiel, J. J., Marshall, V. S., & Jones, J. M. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *science*, 282(5391), 1145-1147.
57. Tresguerres, I. F., Gracia, M. A., del Canto Pingarrón, M., & Jérez, L. B. (2006). Physiological bases of bone regeneration II: The remodeling process. *Medicina oral, patología oral y cirugía bucal*. Ed. inglesa, 11(2), 12.
58. Werner, A. (2011). Acceleration by vibration. article at www.OrthodonticProductsOnline.com, 2.

59. Wolff Beiträge zur Lehre von der Heilung der Frakturen. Archiv für Klinische Chirurgie, (14): 1976:
60. Woodhouse, N. R., DiBiase, A. T., Johnson, N., Slipper, C., Grant, J., Alsaleh, M., & Cobourne, M. T. (2015). Supplemental vibrational force during orthodontic alignment: a randomized trial. *Journal of dental research*, 94(5), 682-689.
61. Wolff Beiträge zur Lehre von der Heilung der Frakturen. Archiv für Klinische Chirurgie, (14): 1976: 389-453.
62. Wright, H. L., McCarthy, H. S., Middleton, J., & Marshall, M. J. (2009). RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease. *Current reviews in musculoskeletal medicine*, 2(1), 56-64.
63. Zhang, J. M., & An, J. (2007). Cytokines, inflammation and pain. *International anesthesiology clinics*, 45(2), 27.

12. REPORTE

AGOSTO 2018	
Actividad	Tipo de actividad
Aprendizaje de los procedimientos de laboratorio	Práctica de cultivo de células Conocimiento del material a emplear
Laboratorio	Solicitud de ratones de la cepa Balb/C al UPEAL – Bioterio Esterilización de material Cultivo de células Mantenimiento de células Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Organización de protocolo de investigación Tema, planteamiento del problema y justificación. Búsqueda de artículos científicos
Otras	Tablas de evaluación para alumnos Cartas de consentimiento informado
SEPTIEMBRE 2018	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Cultivo de células Mantenimiento de células Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Búsqueda de información científica Selección de temas para marco teórico

OCTUBRE 2018	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Se agota el suministro de CO ₂ Se suspende el mantenimiento de cultivos Esterilización de material
Investigación	Recopilación de artículos científicos Objetivos e Hipótesis
Otras	Solicitud de CO ₂
NOVIEMBRE 2018	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Solicitud de ratones de la cepa Balb/C al UPEAL – Bioterio Esterilización de material Cultivo de células Mantenimiento de células Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Búsqueda de artículos científicos Segmentación de marco teórico
Otras	Apoyo organizativo en el congreso de egresados Apoyo revisando tareas extra clase
DICIEMBRE 2018	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Mantenimiento de células Micro-vibración de células osteoblasticas (Aparato AcceleDent)
Investigación	Recopilación de artículos científicos

	Marco teórico
Otras	Entrega de revistas Recopilación de datos
ENERO 2019	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Cultivo de células Mantenimiento de células Ensayo ELISAS IL1, RANKL, TNF- α Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Búsqueda de artículos científicos Elaboración de Informe
Otras	Elaboración de cartas para división de CBS Recopilación de datos (Excel)
FEBRERO 2019	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Mantenimiento de células Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Búsqueda de artículos científicos Elaboración de Informe
MARZO 2019	
Actividad	Tipo de actividad
Investigación	Elaboración de reporte de investigación (Microsoft Word) Material y Método
Otras	Huelga sindical

ABRIL 2019	
Actividad	Tipo de actividad
Investigación	Elaboración de reporte de investigación (Microsoft Word) Recopilación de resultados
Otras	Huelga sindical
MAYO 2019	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Mantenimiento de células Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Elaboración de reporte de investigación (Microsoft Word) Redacción de discusión
JUNIO 2019	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Elaboración de reporte de investigación (Microsoft Word) Conclusiones
Otras	Recopilación de datos (Excel)
JULIO 2019	
Actividad	Tipo de actividad
Laboratorio	Análisis de células en microscopio Fotografías de células
Investigación	Elaboración de reporte de investigación (Microsoft Word)
Otras	Recopilación de datos (Excel)

