



Casa abierta al tiempo

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD XOCHIMILCO**

División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento de atención a la salud
Licenciatura en estomatología

INFORME DE SERVICIO SOCIAL

Título:

“Evaluación de la expresión de IL-12 en osteoblastos cultivados *in vitro* bajo los efectos de la micro-vibración a 30 HZ”.

Asesor:

Rosina Eugenia Villanueva Arriaga

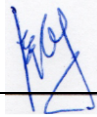
Alumna:

Elizabeth Sara Arellano García

Matricula: 2153064041

Periodo:

1 de febrero 2020 -31 de enero 2021



MSc. ROSINA EUGENIA VILLANUEVA ARRIAGA

ASESOR INTERNO



COMISIÓN DE SERVICIO SOCIAL DE ESTOMATOLOGÍA

DRA. GUADALUPE ROBLES PINTO

ÍNDICE

Lista de figuras.....	I
Resumen.....	II
Abstract.....	III
1. Introducción.....	10
2. Marco teórico.....	12
2.1 <i>Fisiología ósea</i>	12
2.2 <i>Histología del tejido óseo</i>	13
2.2.1 <i>Células osteogénicas</i>	13
2.2.2 <i>Osteoblastos</i>	14
2.2.3 <i>Osteoclastos</i>	15
2.2.3.1 <i>Características generales del osteoclasto</i>	15
2.2.3.2 <i>Migración de los percusores</i>	16
2.2.4 <i>Osteocitos</i>	17
2.3 <i>Matriz orgánica</i>	18
2.4 <i>Remodelación ósea</i>	21
2.5 <i>Citocinas</i>	23
2.5.1 <i>Función de las citocinas</i>	23
2.5.2 <i>Interleucina 12</i>	24
2.6 <i>Sistema rank/rank-l/opg</i>	26
2.6.1 <i>RANK</i>	26
2.6.2 <i>RANK-L</i>	27
2.7 <i>ELISA</i>	28
3. Planteamiento del problema.....	30
4. Objetivo general.....	30
4.1 <i>Objetivo Específico</i>	30
5. Hipótesis.....	30
6. Justificación.....	31
7. Material y Método.....	33
7.1 <i>Obtención de ratones de la Cepa Balb/C</i>	33
7.2 <i>Obtención de células osteoblásticas primarias derivadas del cráneo de ratón</i>	33

7.3 *Estimación de las células osteoblásticas por medio de la micro-*

<i>vibración</i>	37
7.4 <i>Medio de cultivo proteómico</i>	37
7.5 <i>Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAs)</i>	38
7.6 <i>Muestra estándar</i>	39
7.7 <i>Análisis estadístico</i>	40
8. Resultados.....	41
9. Discusión.....	43
10. Conclusión.....	46
11. Referencias bibliográficas.....	47

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1. Activación de Osteoclastos</i>	17
<i>Figura 2. Fases de Remodelado óseo</i>	22
<i>Figura 3. Vía de señalización IL-12</i>	25
<i>Figura 4. Sistema Efector RANK/RANKL/OPG</i>	26
<i>Figura 5. Regulación de osteoclastogénesis por el sistema RANKL/RANK</i>	27
<i>Figura 6. Ratones de la Cepa Bal/C</i>	33
<i>Figura 7. Células desprendidas del cráneo de ratón</i>	34
<i>Figura 8. Botón de células rojas y blancas</i>	35
<i>Figura 9. Los osteoblastos se resuspendieron y se sembraron en caja de 24 pozos</i>	35
<i>Figura 10. Osteoblastos recién sembrados observados por microscopio</i>	36
<i>Figura 11. Osteoblastos de la Cepa Bal/C 20 días de cultivo</i>	36
<i>Figura 12. Vibración de células osteoblásticas por medio del aparato Acceledent</i>	37
<i>Figura 13. Placa de 96 pozos</i>	38
<i>Figura 14. Lavado con solución buffer con micropipeta multicanal de 30</i>	39

LISTA DE TABLAS

<i>Tabla 1. Composición del hueso</i>	20
<i>Tabla 2. Resultados expresados en promedio y desviación estándar (n=5)</i>	42

LISTA DE GRÁFICAS

<i>Gráfico. Resultados IL-12</i>	41
--	----

AGRADECIMIENTOS

La presente Investigación está dedicada a mi DIOS todo poderoso, ya que su amor y bondad no tienen fin, en cada paso que doy, sé que tu estas ahí permitiéndome sonreír ante cada logro que es resultado de tu ayuda, y cuando caigo y siento no poder más me levantas para mejorar como ser humano, y crezca de diversas maneras.

Le doy gracias a mis padres Silvia García y Antonio Arellano por apoyarme en todo momento, por ser mi escalón para poder lograr mi sueño de ser Estomatóloga, por aguantar mi mal genio, por estar ahí en cada noche de desvelo, por sacrificar sus necesidades para poder yo siempre tener lo mejor, por los valores que me han inculcado y gracias a ellos siempre mantener los pies sobre la tierra.

A mis hermosas y maravillosas hermanas: Brenda, Betzabeth y Noemí por ser mi motor en cada paso que doy, por ser las personas por las que creo en el amor de verdad, no tengo palabras para explicar lo que ustedes son para mi vida, son las mujeres más fuertes que conozco, mis mejores amigas en todo momento, gracias por enseñarme a ser mejor persona cada día, gracias a ustedes sé que lo imposible siempre será posible con mucha dedicación y esfuerzo.

A mis mascotas, Diva, Kravitz, Ginger, Luca por estar en cada desvelo, por acurrucarse a mi costado mientras terminaba mis actividades por despedirme con un besito y recibirme con ese movimiento en su colita que me alegraba mi día para poder seguir.

A mis amigas, Anita, Zel, Yane y Kim por los buenos momentos que compartimos en esta etapa universitaria por siempre creer en mí cuando ni yo creía, por ser unas personitas tan admirables por ser un ejemplo de poder, les agradezco por su compañía y por su amor incondicional, sé que creceremos y seremos excelentes en esta hermosa profesión porque el único límite en esta tierra es el cielo.

Le doy gracias a mis profesores, porque a lo largo de mi paso en esta fantástica Universidad, me han inculcado conocimientos y valores, afianzando de esta manera mi formación profesional. A la MSc. Rosina Villanueva y Dr. Salvador García por darme la oportunidad de poder realizar a su lado esta interesante investigación por su apoyo, su orientación por siempre tratar de transmitirnos sus conocimientos, por ser una inspiración y tratar de ser tan excelentes como lo son ustedes.

-Nunca pares; nunca te conformes hasta que lo bueno sea mejor y lo mejor excelente-

RESUMEN

INTRODUCCIÓN. El tejido óseo se renueva constantemente por la acción coordinada de osteoclastos y osteoblastos. La remodelación implica una red compleja de señales entre célula – célula que involucra hormonas sistémicas, citocinas, factores de crecimiento y el entorno la carga mecánica. **OBJETIVO.** Evaluar los efectos de la micro-vibración en osteoblastos cultivados *in vitro* sobre la síntesis de IL-12. **MATERIAL Y MÉTODO** Los osteoblastos se derivaron del cráneo de ratón recién nacido de la cepa Balb/C , se colocaron en una caja Petri con medio de cultivo y se sembraron a 1×10^6 en placas de 24 pozos de 1.5cm, el medio de cultivo se le adicionó un 10% de suero fetal bovino (Gibco, USA), 1% de antibióticos (estreptomicina y anfotericina) y aminoácidos esenciales, posteriormente se colocaron en una incubadora de tejidos (New-Air, USA), al 95% de aire a una temperatura de 37°C, con una atmósfera de 5% de CO₂, las células osteoblásticas fueron sometidas a micro- vibración por 20 minutos de 0 a 72 hrs., con el aparato AcceleDent® (OrthoAccel, USA). El sobrenadante fue recolectado y almacenado en un ultracongelador (Scientific, USA) a -70°C. para su posterior ensayo por medio de ELISA para determinar la expresión de IL-12. **RESULTADOS.** Los efectos de la micro - vibración mostró una baja-regulación estadísticamente significativa en la síntesis de IL- 12 comparado con el grupo control. **CONCLUSIÓN.** Este estudio demostró que la estimulación con micro-vibración en cultivos de osteoblastos *in vitro*, mostraron una baja-regulación en la síntesis de la IL-12, lo que demuestra que permite la actividad osteoclástica.

Palabra clave: Micro-vibración, Osteoblastos, IL-12.

ABSTRACT

INTRODUCTION. Bone tissue is constantly renewed by the coordinated action of osteoclasts and osteoblasts. Remodeling involves a complex network of cell-cell signaling involving systemic hormones, cytokines, growth factors and the mechanical loading environment. **AIM:** To assess the effects of micro-vibration in cultured osteoblasts *in vitro* on IL-12 synthesis. **MATERIAL AND METHOD** Osteoblasts were derived from newborn mice calvaria of Balb/C strain, placed in a Petri dish with culture medium and seeded at 1×10^6 in 24-well plates of 1.5cm, the culture medium was added with 10% fetal bovine serum (Gibco, USA), 1% antibiotics (streptomycin and amphotericin) and essential amino acids, then placed in a tissue incubator (New-Air, USA), 95% air at a temperature of 37°C, with an atmosphere of 5% CO₂, the osteoblastic cells were subjected to micro-vibration for 20 minutes from 0 to 72 hrs, with the AcceleDent® apparatus (OrthoAccel, USA). The supernatant was collected and stored in an ultra-freezer (Scientific, USA) at -70°C for subsequent ELISA assay to evaluate the IL-12 expression. **RESULTS.** The effects of micro-vibration showed a statistically significant down-regulation of IL-12 synthesis compared to the control group. **CONCLUSION** This study demonstrated that micro-vibration stimulation of osteoblast cultures *in vitro* showed down-regulation of IL-12 synthesis, demonstrating that it enables osteoclastic activity.

Keyword: Micro-vibration, Osteoblasts, IL-12.

1. Introducción

El hueso es un tejido dinámico, profusamente vascularizado e innervado y sometido a un proceso de remodelado continuo a lo largo de toda la vida. (Tresguerres *et al.*, 2005). Este sirve al cuerpo con varios propósitos: entre ellos el de soporte, el de movimiento, el de protección y el de homeostasis mineral, ya que los huesos en general sirven como depósito de minerales, fundamentalmente de Ca y P. (Duplomb; 2007)

El hueso está compuesto por diversas células y por una matriz extracelular, cuyos principales son: el componente inorgánico, constituyente mayoritario del hueso, está compuesto en un 95% por cristales de hidroxiapatita conteniendo además un 5% de impurezas como sodio, potasio, estroncio, fluoruros, carbonatos, pirofosfatos y cloruros entre otras; componente orgánico colágeno tipo 1 y la matriz extracelular ósea compuesta por proteoglicanos, la osteocalcina, la osteonectina, la osteopontina, las sialoproteínas, la fibronectina, la trombospondina y factores de crecimiento (Rizzoli; 2010, Tresguerres; 2006).

Teniendo en cuenta el importante papel que desempeña este tejido en la filosofía del organismo, es de vital importancia que tanto su composición, como su resistencia mecánica se mantengan a lo largo de la vida. En este sentido, el hueso es renovado constantemente por un proceso conocido como remodelado óseo (Raggatt, 2010), que reemplaza el hueso viejo por hueso nuevo. Esta renovación se lleva a cabo mediante la acción balanceada, y coordinada en el tiempo y en el espacio de los osteoblastos y los osteoclastos (Sims; 2008).

Los osteoclastos (OC), como únicas células capaces de extraer la matriz calcificada del hueso, son las protagonistas de la delicada tarea de disolver los cristales de fosfato cálcico y digerir el colágeno a través de estructuras altamente especializadas (Arboleya *et al.*, 2014). Los osteoblastos (OB), tienen la capacidad de estimular la neoformación del tejido óseo, mediante la síntesis de proteínas tales como las proteínas morfogénicas, factores de crecimiento y proteínas colágenas y no colágenas (Guerrero; 2005).

Las citocinas son un grupo de proteínas y glucoproteínas producidas por diversos tipos celulares que actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitarias e inflamatorias. Una de las principales citocinas es la IL-12 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. Marco teórico

2.1 Fisiología ósea

El tejido óseo constituye uno de los sistemas mayores del organismo, constituido por una matriz mineralizada y una fracción celular muy activa capaz de regenerarse. (Lafita; 2003; Fernández *et al.*, 2006)

Es un tejido conjuntivo mineralizado muy vascularizado e innervado, que está estructurado en laminillas de matriz osteoide calcificada. (Fernández *et al.*, 2006)

Entre sus funciones destacan: servir de sustento y protección a las partes blandas, ser anclaje muscular y base de los movimientos, así como constituir un gran reservorio de iones como el calcio, que se liberarán de forma controlada, acorde a las necesidades de cada momento, y por último, no por ello menos importante, servir de almacenaje activo de la médula ósea, interaccionando con las células precursoras de la hematopoyesis. (Lafita; 2003; Fernández *et al.*, 2006).

Desde un punto de vista estructural, el tejido conjuntivo mineralizado adopta dos variedades morfológicas:

- a) Cortical, o compacto,
- b) Trabecular, o esponjoso.

El hueso compacto (presente en las diáfisis de los huesos largos, láminas externa e interna de los planos y periferia de los cortos), visto al microscopio, posee una estructura con conductos o canales que discurren en paralelo a lo largo del mismo. Esos conductos, ya descritos en 1691 por Compton Havers, tienen un diámetro de 10 a 350 μm . En el interior de los más finos discurren un capilar y una vénula, y en los de mayor diámetro se hallan varios vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas. Concéntricamente a cada conducto se disponen las laminillas óseas en una disposición característica denominada osteona. Los conductos de Havers se comunican entre sí y con la superficie de la cavidad medular merced a un sistema de conductos transversales (de Volkmann).

En cuanto al hueso trabecular (localizado en la parte central de los huesos cortos, epífisis y metáfisis de los largos, y diploe de los planos), carece de conductos de Havers, posee cavidades irregulares ocupadas por médula ósea, y sus laminillas se disponen alrededor de esas cavidades. (Tresguerres *et al.*, 2005)

El hueso está recubierto en sus caras externa e interna por periostio y endostio. El periostio contiene en su capa superficial fibras de colágeno y fibroblastos, mientras que en su capa profunda se hallan, además, células precursoras de osteoblastos; Éste es responsable del diámetro y tamaño del hueso, así como también del ancho de la cortical. Por lo tanto, el periostio está relacionado con la resistencia del hueso. (Mastaglia; 2016)

El endostio, a su vez, está formado por células precursoras de osteoblastos y osteoclastos, dispuestas en forma de capa que recubre el conducto medular, los conductos de Havers y de Volkmann, así como las cavidades del hueso trabecular. El periostio y el endostio son esenciales en la nutrición, el crecimiento y la reparación del hueso. Tanto el hueso cortical como el trabecular se componen de células óseas, matriz orgánica (o sustancia osteoide) y sustancia mineral.(libro de Fisiología humana)

2.2 *Histología del tejido óseo*

2.2.1 *Células osteogénicas*

En el hueso coexisten varios tipos de células. Las células óseas se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea, rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (o mesenchymal stem cells). Desde los trabajos de Friedenstein en 1976 se conoce que estas stem cells pueden dar origen a cinco estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos, en respuesta a diferentes señales moleculares que inician la cascada de activación de diferentes genes. (Fernández *et al.*, 2006)

2.2.2 Osteoblastos

Los osteoblastos son células grandes (20-30 μm), de forma poliédrica, con citoplasma basófilo y con un aparato de Golgi y un retículo endoplásmico rugoso de tamaño importante. Proceden de las células mesenquimales pluripotenciales de la médula ósea, endostio, periostio y pericitos perivasculares (Fernandez *et al.*, 2006).

Son células encargadas de formar hueso, tienen la capacidad de sintetizar y secretar matriz ósea orgánica que está constituida por colágeno, proteoglicanos y moléculas pequeñas como osteocalcina, osteonectina y osteopenia.

Los osteoblastos presentan dos fases, debido a esto, morfológicamente su estructura anatómica cambia:

Fase Activa: El osteoblasto tiene forma cúbica, con citoplasma intensamente basófilo y sustancias osteoides.

Fase de Reposo: Su forma es aplanada, con citoplasma levemente basófilo.

Se localiza sobre la superficie ósea y participan en el proceso de mineralización de la matriz orgánica produciendo vesículas de matriz que acumulan iones, calcio y fosfato y son ricas en fosfatasa alcalina y pirofosfatasa, enzimas que inducen la creación de centros de nucleación para el depósito de las sales minerales.

Su vida activa se encuentra entre una y diez semanas; al final de este periodo toman dos destinos posibles: ser rodeadas por la matriz ósea que producen en convertirse en osteocitos (15%), o permanecer en la superficie del tejido óseo recién formado, aplanándose y constituyendo las células de revestimiento óseo (Gutierrez *et al.*, 2008).

Actualmente, se sabe que:

1. Sintetizan las proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso.
2. Dirigen la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular.
3. Contribuyen a la mineralización de las sustancias osteoides, gracias a la fosfatasa alcalina.
4. Median en la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas.
5. Sintetizan factores de crecimiento.

Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí por proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular, permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citoquinas o prostaglandinas. En estas células la conexión intercelular es la Conexina 43. (Fernandez *et al.*, 2006)

2.2.3 Osteoclastos

Los osteoclastos derivan embriológicamente de células progenitoras hematopoyéticas denominadas “unidades formadoras de colonias de granulocitos/macrófagos”, que son, además, y como su nombre indica, precursoras de granulocitos, monocitos y macrófagos (Tresguerres *et al.*, 2005).

Los osteoclastos, son las únicas células capaces de extraer la matriz calcificada del hueso, son los protagonistas de la delicada tarea de disolver los cristales de fosfato cálcico y digerir el colágeno, a través de estructuras altamente especializadas. Su papel patogénico en la inducción de la excesiva resorción ósea.

2.2.3.1 Características generales del osteoclasto

Los Osteoclastos se localizan en la superficie interna de los túneles de Havers del hueso cortical, en las trabéculas de diámetro superior a 200 micras y en la pared externa de los huesos, bajo el periostio. Aunque se pueden encontrar precursores potenciales en la sangre periférica, bazo y médula ósea, las células maduras son muy raras fuera de las superficies óseas, excepto en situaciones patológicas, como en el caso de los tumores de células gigantes. (Arboleya *et al.*, 2014)

Los Osteoclastos son una población escasa en el esqueleto ya que solamente comprenden el 1-2% de las células óseas. (Arboleya *et al.*, 2013) Tienen una vida media de 2 semanas y, en condiciones normales, después de este periodo sufren apoptosis. (Arboleya *et al.*, 2014)

Su morfología es característica cuando se activan y se reconocen fácilmente en las muestras sin decalcificar, como estructuras multinucleadas fuertemente polarizadas, con una región basal de intercambio de señales externas y una zona unida al tejido óseo calcificado, que posee una estructura específica denominada ribete en Cepillo. (Arboleya *et al.*, 2013)

Los Osteoclastos se desplazan, mediante podosomas, sobre las superficies calcificadas, donde una sola célula puede labrar, de forma consecutiva, varias lagunas de Howship. Poseen una serie de características inmunohistoquímicas que facilitan su identificación, entre ellas la expresión de fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP). (Osteoclastos: mucho más que una célula remodeladora del hueso).

2.2.3.2 Migración de los precursores

Se han detectado células de estirpe mononuclear con capacidad de diferenciación osteoclástica en la médula ósea y en el torrente sanguíneo. Aunque no se conoce si existe una población mononuclear específica precursora del osteoclasto, se sabe que determinadas subclases de monocitos circulantes y de células dendríticas, tienen la capacidad de transformarse en osteoclastos si son sometidas a determinadas señales específicas. Utilizando novedosas técnicas de fluorescencia que permiten visualizar el comportamiento celular in vivo, han mostrado recientemente que los osteoclastos maduros situados en las superficies de resorción proceden de monocitos circulantes que migran a las citadas regiones óseas, donde sufren la fusión, polarización y desarrollo de los elementos del citoesqueleto que caracterizan a los osteoclastos activos.

Estas células, que deben expresar el RANK en su membrana, van a ser atraídas hacia la médula ósea o las superficies quiescentes, donde, tras recibir la señal RANKL, se transformarán en osteoclastos maduros, polarizados y con el citoesqueleto característico.

La señal RANKL es fundamental para la activación final de los osteoclastos, aunque probablemente se ejecute únicamente en el órgano diana, existiendo señales que podríamos considerar "anteriores" que provocan la migración de los precursores desde la circulación sistémica. Hasta el momento se han identificado varias señales de reclutamiento, entre las que destaca la quimioquina CXCL12, altamente expresada en células estromales situadas en las regiones perivasculares de la médula ósea. Los precursores osteoclásticos expresan el receptor de quimioquinas CXCR4, cuya unión a CXCL12 promueve el reclutamiento y supervivencia de los osteoclastos. (Arboleya *et al.*, 2014)

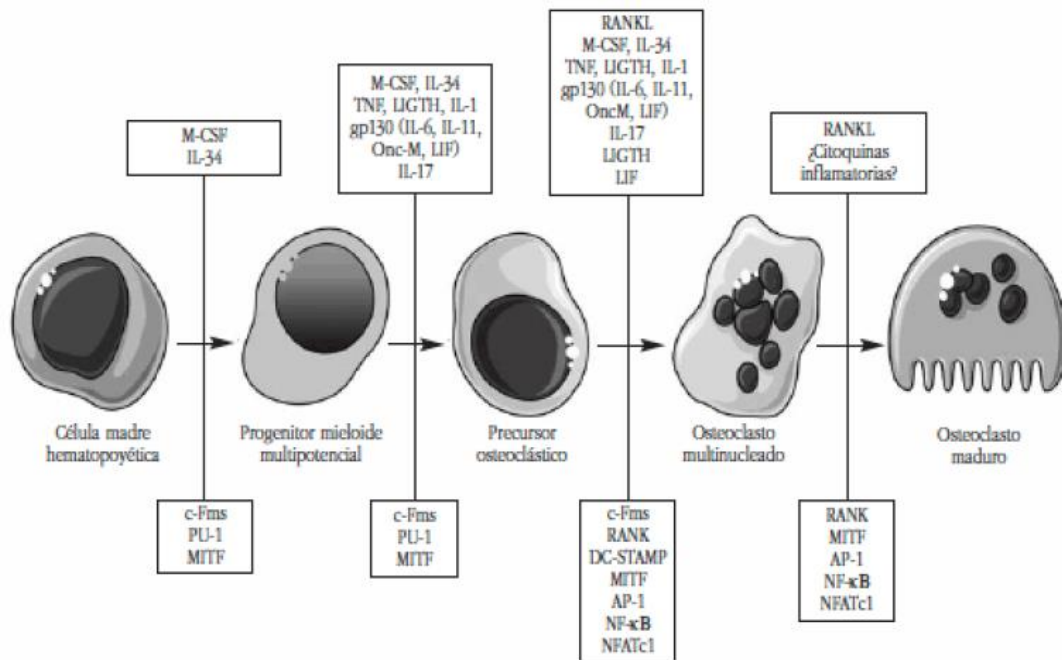


Figura 1. Activación de Osteoclastos

Arboleya L., Castañeda S. Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso, *Rev. Osteoporosis Metab Miner.* 2014; 6(4):1-18.

2.2.4 Osteocitos

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados dentro, transformándose en osteocitos. Los osteoblastos, osteoclastos y células limitantes se hallan en la superficie ósea, mientras que los osteocitos están en el interior. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso (10 veces más que los osteoblastos). Poseen forma estrellada y su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas u osteoplasmas y los procesos citoplasmáticos se comunican entre sí a través de los conductos calcóforos que están llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un sincitio

de células interconectadas que representa una única estructura, con la ventaja de que existe una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea, para asegurarse oxígeno y nutrientes. A través de sus proyecciones citoplasmáticas, los osteocitos establecen comunicaciones intercelulares con osteocitos vecinos mediante uniones gap, y también alcanzan las superficies perióstica y endocortical ósea, el lumen de los vasos sanguíneos y los canales haversianos, así como superficies adyacentes a la médula ósea en las superficies endocortical y trabecular. Este sistema lacuno-canalicular tiene el potencial de permitir la comunicación “célula-célula” entre los osteocitos y demás células del hueso, distribuyendo, también, las moléculas secretadas por los osteocitos en el microambiente hueso/médula ósea. Cuando se produce un trauma en el hueso el cese de la circulación sanguínea origina hipoxia y necrosis de los osteocitos que estén a más de 0.1 mm de un capilar intacto. (Fernández *et al.*, 2006)

Los osteocitos también participan en la síntesis y mineralización de la matriz osteoide, pero se cree que su función principal es la de controlar el remodelado óseo, detectando las variaciones mecánicas de las cargas, fenómeno denominado mecanotransducción. (Fernández *et al.*, 2006)

Los osteocitos constituyen el estadio final desde la línea osteoblástica y son incapaces de renovarse. Poseen los mismos marcadores que los osteoblastos, pero tienen como marcador específico el CD44, receptor de membrana que se expresa fuertemente en osteocitos y es negativo en osteoblastos y células limitantes. (Fernández *et al.*, 2006)

2.3 Matriz orgánica

Los huesos son auténticas matrices de nanocompuestos, principalmente nanocristales de hidroxiapatita en una matriz rica de colágeno, muy complejos y con forma altamente especializadas para dar soporte mecánico y también sirve de reserva de minerales, en particular del calcio y fosfato. (Bernabeu *et al.*, 2006)

La matriz del hueso está compuesta por dos fases principales a escala manométrica: orgánica (proteínas) e inorgánica (minerales) y sus composiciones serán en términos globales. (Bernabeu *et al.*, 2006)

El mineral óseo está compuesto principalmente por hidroxiapatita y la parte proteica de colágeno.

El colágeno actúa como base en la cual diminutos cristales planos de hidroxiapatita se unen para formar el hueso. El colágeno del hueso tiene una estructura fibrosa típica, cuyo diámetro varía entre 100 y 2000 nm. De manera similar, la hidroxiapatita en el mineral del hueso está en forma de nanocristales de dimensiones entre 4x50x50 (nm). Los minerales del hueso están también enriquecidos con algunos elementos sueltos para varias funciones metabólicas entre los que están los carbonatos, citratos, sodio, magnesio, fluoruros, cloruros y potasio. (Bernabeu *et al.*, 2006)

El principal papel de los minerales es dotar de dureza y rigidez al hueso, mientras que el colágeno lo dota de resistencia a la tracción y flexibilidad. Se piensa que la clave para la resistencia de los huesos es la compleja estructura jerárquica en la cual se organizan con un auto-ensamblado. Es importante puntualizar que los minerales no están directamente ligados al colágeno, sino ligados a través de las proteínas no colágenas. Las proteínas no colágenas suponen entre un 3% y un 5% de la composición del hueso, y proveen emplazamientos activos para la biomineralización y unión celular. (Bernabeu *et al.*, 2006)

La cantidad de agua presente en los huesos es un factor importante para determinar su comportamiento mecánico. Los lípidos también son necesarios para las funciones celulares y suponen un 2% del hueso, además juegan un papel importante en la biomineralización. El grado de biomineralización el factor más importante para determinar las capacidades mecánicas del hueso.

Fase Inorgánica	% Peso	Fase Orgánica
Hidroxiapatita	60	Colágeno
Carbonato	4	Agua
Citrato		0.9
		Proteínas no colágenas (osteocalcina, osteonectina, osteopontina, trombospondina, proteínas orfogenéticas, sialoproteínas, proteínas de suero)
Sodio	0.7	
Magnesio	0.5	
Cl-, F-, K+, Sr ²⁺ , Pb ²⁺ , Zn ²⁺ , Cu ²⁺ , Fe ²⁺		Polisacáridos, lípidos, citoquinas
		Células óseas primarias: osteoblastos, osteocitos, osteoclastos

Tabla 1. Composición del hueso

Bernabéu E., López O., Larena A. Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados, Patología del aparato locomotor. 2006; 4(3): 202-207.

2.4 Remodelación ósea

El proceso de remodelación ósea implica una serie de pasos que se inician a partir de un estímulo del tejido óseo, que puede ser inducido o provocado por una lesión. (Gutiérrez; 2008)

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases (Figura 2):

Fase quiescente o descanso: Se dice del hueso en condiciones de reposo. Los factores que inician el proceso de remodelado aún no son conocidos.

Fase de activación: El primer fenómeno que tiene lugar es la activación de la superficie ósea previa a la reabsorción, mediante la retracción de las células limitantes (osteoblastos maduros elongados existentes en la superficie endóstica) y la digestión de la membrana endóstica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de osteoclastos circulantes procedentes de los vasos próximos. (Fernandez *et al.*, 2006)

Fase de reabsorción: Seguidamente, los osteoclastos comienzan a disolver la matriz mineral y a descomponer la matriz osteoide. Este proceso es acabado por los macrófagos y permite la liberación de los factores de crecimiento contenidos en la matriz, fundamentalmente TGF- β (factor transformante del crecimiento β), PDGF (factor de crecimiento derivado de las plaquetas), IGF-I y II (factor análogo a la insulina I y II). (Gutiérrez; 2008)

Fase de formación: Simultáneamente en las zonas reabsorbidas se produce el fenómeno de agrupamiento de *preosteoblastos*, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron de la matriz que actúan como quimiotácticos y además estimulan su proliferación. Los preosteoblastos sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido y expresan BMPs (proteínas morfogenéticas óseas), responsables de la diferenciación. A los pocos días, los osteoblastos ya diferenciados van a sintetizar la *sustancia osteoide* que rellenará las zonas horadadas.

Fase de mineralización: A los 30 días del depósito de osteoide comienza la *mineralización*, que finalizará a los 130 días en el hueso cortical y a 90 días en el trabecular.

Y de nuevo empieza fase quiescente o de descanso. (Fernández *et al.*, 2006)

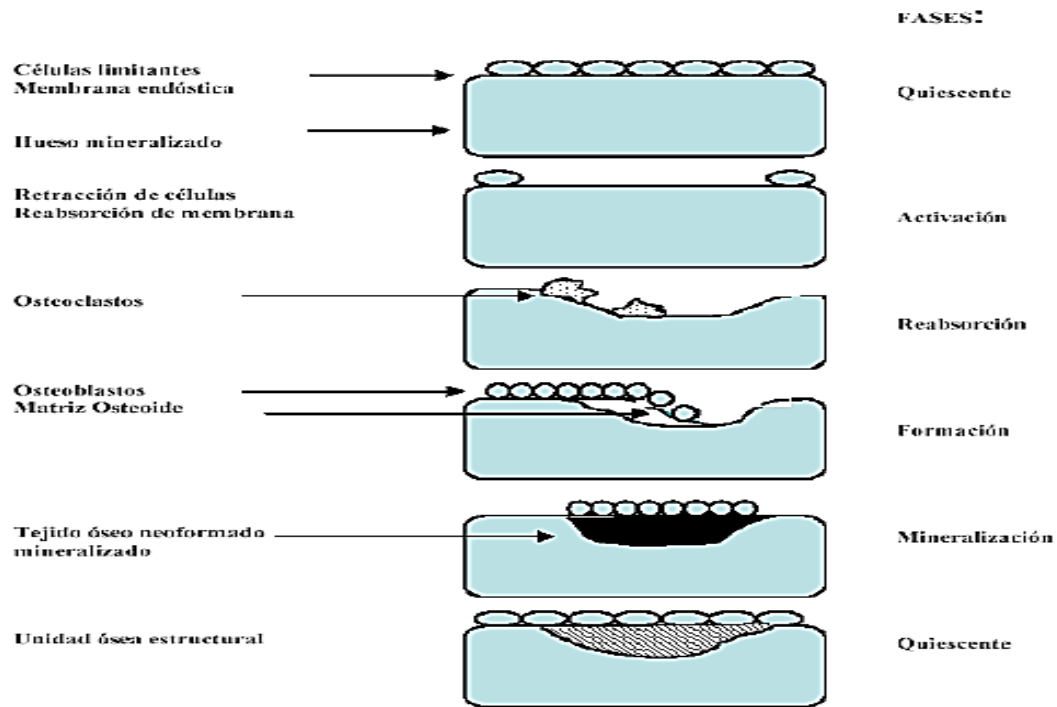


Fig. 1. Fases del remodelado óseo (Modificado de Compston) (2)

Figura 2. Fases de remodelado óseo.

Fernández I., Tresguerres Hernández-G., Alobera Gracia M. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo, *Med.oral patol.oral cir.bucal (Internet)* 2006 (Consultado 25 Feb 2020); 11(1).

2.5 Citocinas

Las citoquinas o citocinas (del griego “kyto” célula e “ina” sustancia) son moléculas de bajo peso molecular (de 10 a 40 kD) y constituidas por unos 120 a 180 aminoácidos, que poseen la capacidad de modular la función de células y tejidos, y que están producidas, principalmente, por los leucocitos, aunque algunas de ellas también pueden ser secretadas por otros tipos celulares. (Carrasco; 2011)

Actúan fundamentalmente como reguladores de las respuestas inmunitaria e inflamatoria; asimismo, intervienen como factores de crecimiento de distintas células, entre las cuales y de forma destacada, las células hematopoyéticas.

Dentro del grupo de las citocinas se incluyen las interleucinas (IL), los factores de necrosis tumoral (TNF), los interferones (IFN), los CSF y las quimocinas. (Filella *et al.*, 2002)

En condiciones fisiológicas, las citoquinas no se producen en cantidades significativas, siendo necesaria la activación de las células para que se produzcan en cantidades suficientes para ejercer sus efectos biológicos. La mayoría de ellas son secretadas al espacio extracelular en forma glicosilada, lo que incrementa su estabilidad y solubilidad.

Las citoquinas poseen una vida media muy corta y actúan a muy bajas concentraciones, del orden de picogramos, mediante la unión a receptores de alta afinidad que están presentes en la superficie de las células.

2.5.1 Funciones de las citoquinas

Las citoquinas, además de tener un papel fundamental en la respuesta inflamatoria e inmune, van a estar implicadas en numerosos procesos biológicos como en la hematopoyesis, la embriogénesis y la angiogénesis, así como en diferentes procesos celulares como la mitosis, la diferenciación, la migración o incluso la muerte celular.

Además, las citoquinas pueden actuar en lo que se conoce como cascadas de amplificación, estimulando la producción de otras citoquinas de forma consecutiva que amplían sus efectos biológicos, o bien desencadenando un efecto antagonista, regulando de esta forma la respuesta originada o su intensidad. (Carrasco; 2011)

2.5.2 Interleucina 12 (IL-12)

La interleucina 12 (IL-12) es una citocina que está involucrada tanto en la inmunidad innata como en la adaptativa, (Rodríguez *et al.*, 2015) fue inicialmente descubierta en 1989 por su capacidad de estimular la actividad de las células naturales asesinas (NK), poco después se han ido conociendo sus múltiples efectos sobre las diferentes poblaciones de linfocitos responsables de la inmunidad celular de nuestro organismo. (Sánchez *et al.*, 2001)

Su función más importante es la estimulación de las células T y NK para producir interferon- γ (IFN- γ) y promover la respuesta Th1, (Rodríguez *et al.*, 2015) porque IFN- γ es un mediador en la resistencia viral, fúngica, bacteriana y parasitaria. (Sánchez *et al.*, 2001)

También se ha demostrado que IL-12 es un inhibidor de la osteoclastogénesis en cultivos de médula ósea. (García-López; 2004)

Se ha demostrado que la IL-12 solo y en sinergia con IL-18 inhibe la formación de osteoclastos en co-cultivos de osteoblastos murinos y células del bazo. Además, parece que las células T desempeñan un papel importante en la inhibición de la osteoclastogénesis por IL-12 ya que su ausencia en cultivos anula los efectos del tratamiento con IL-12. (Horwood *et al.*, 2001)

Por otra parte, se ha demostrado que la tensión mecánica cíclica en el mismo sistema modelo estimula la producción de IL-12 por los osteoblastos calvariales de ratón, citocina con la capacidad de inhibir la resorción ósea. IL-12 inhibe la formación de osteoclastos inducida por RANKL en cultivos de células de médula ósea de ratón, un efecto mediado por IFN- γ . (García-López *et al.*, 2013)

La IL-12 es la única que en su estructura tiene 2 cadenas polipeptídicas: la P-40 y la P-35. (Sánchez *et al.*, 2001)

Está compuesta de un heterodímero de 70 kDa, una de las subunidades de 40kDa (p40) y la otra de 35 kDa.

Varios autores han demostrado que 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 citotóxicos y la citocina es la que promueve la diferenciación de células Th1. (Rodríguez *et al.*, 2015)

El receptor a IL-12 (IL-12R) está compuesto de las cadenas IL-12R β 1 e IL-12R β 2. Se requiere la coexpresión de las dos cadenas del IL-12R para la unión de la IL-12 y únicamente la cadena β 2 funciona como un componente de señales de transducción.

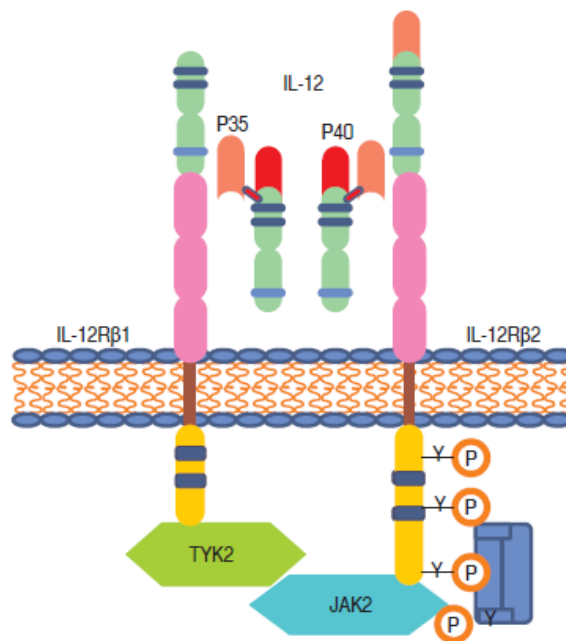


figura 3. Vía de señalización IL-12

Rodríguez-Montaño R, López-Elías MC, Pérez-Murillo M. El rol de IFN- γ , IL-12, IL-18 y sus receptores en la periodontitis, *Rev Mex Periodontol.* 2015; 6(1): 33-39.

2.6 SISTEMA RANK/RANKL/OPG

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. (Figura 6)

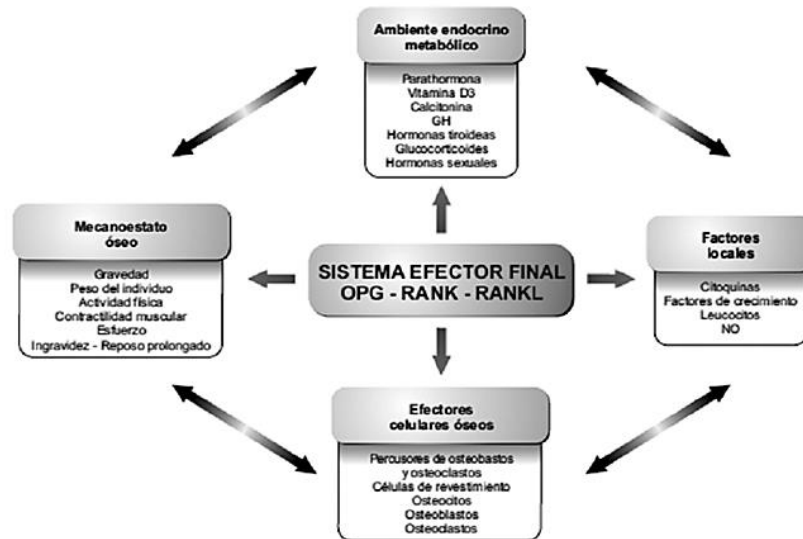


Figura 4. Sistema Efector RANK/RANKL/OPG

Esparza- Guerrero Y., Nava-Valdivia C., Saldaña-Cruz A., Vazquez-Jimenez J. El sistema RANK/RANKL/OPG y sus implicaciones clínicas en la osteoporosis, *El Residente*. 2016; 11(3): 99-104

2.6.1 RANK

El receptor activador de factor nuclear κ B (RANK) es una proteína transmembrana clasificada como un receptor homotrimérico de tipo I, conformado por 616 aminoácidos. Es miembro de la superfamilia de receptores del factor de necrosis tumoral (TNF). Se expresa en la membrana de los osteoclastos; también está presente en la superficie de linfocitos B y T, fibroblastos y células dendríticas. (Esparza et al., 2016)

2.6.2 RANKL

El ligando del receptor activador del factor nuclear κ B (RANKL) es una proteína transmembrana expresada por osteoblastos y células mesenquimales, es homotrimérica, compuesta de 317 aminoácidos. Al igual que el receptor, pertenece a la superfamilia del TNF. (Esparza et al., 2016)

La unión del RANKL a su receptor (RANK) promueve la activación de la vía de señalización intracelular NF- κ B y, como resultado, genera la diferenciación de los preosteoclastos en osteoclastos maduros, facilitando la resorción de hueso. (figura 5)

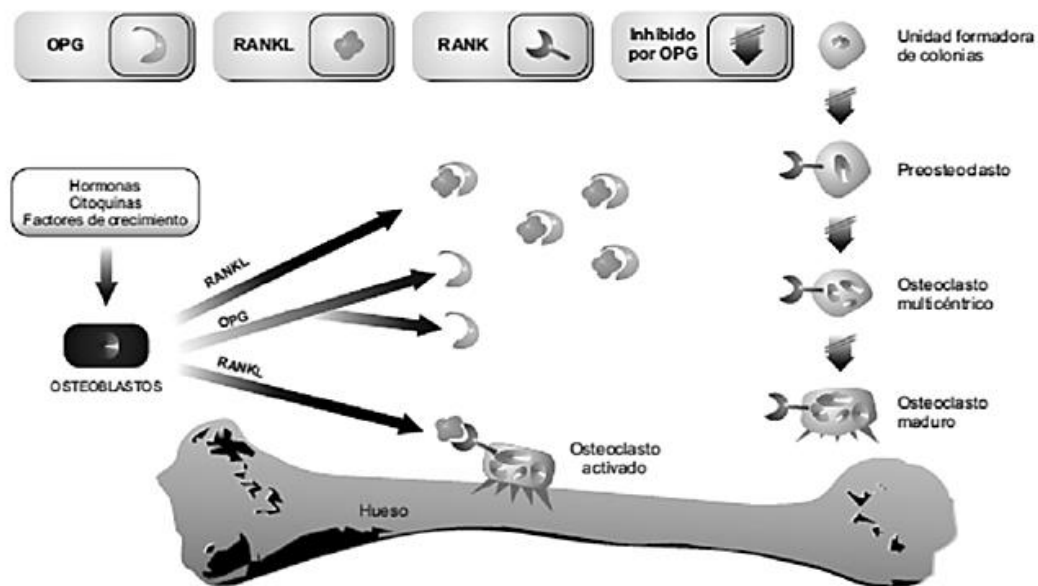


Figura 5. Regulación de osteoclastogénesis por el sistema RANKL/RANK
Esparza- Guerrero Y., Nava-Valdivia C., Saldaña-Cruz A., Vazquez-Jimenez J. El sistema RANK/RANKL/OPG y sus implicaciones clínicas en la osteoporosis, *El Residente*. 2016; 11(3): 99-104

2.7 Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) utiliza como sus siglas lo indican una enzima como marcador para mediar la formación de complejos antígeno-anticuerpo. Existen diversas variaciones al método de ELISA para detectar y cuantificar ligandos de alto peso molecular (>30000 daltons), el marcador enzimático que se emplea en estos análisis se conjuga con un ligando, que puede ser un antígeno, un anticuerpos específico para el antígeno de interés o un anticuerpo para el anticuerpo primario. (Guzman 2004)

La prueba ELISA se basa en varias teorías:

- 1) El antígeno y anticuerpo pueden enlazarse a una superficie portadora insoluble y retener su reactividad inmunológica.
- 2) Las enzimas tienen actividad específica alta y convierten una cantidad relativamente grande de sustrato en producto detectable, lo que permite detectar concentraciones muy bajas del ligando
- 3) La actividad enzimática o reactividad inmunológica de los conjugados se preserva y permanece estable durante el análisis y el almacenamiento.
- 4) Las enzimas no están presentes en el líquido biológico que se va a analizar.

Los anticuerpos utilizados en el método ELISA son de origen monoclonal o policlonal que se suministran como antisuero no fraccionado o fracciones de inmunoglobulina purificada, pueden ser solubles o estar inmóviles en un soporte sólido, son empleados como conjugados no marcados o enzimáticos y por último reaccionan con determinante antigénico específico de un antígeno o de un anticuerpo ligando-específico (anticuerpo primario) según el protocolo de análisis. (Guzman 2004)

Las combinaciones de enzima y sustrato que se emplean en los diversos métodos ELISA incluyen:

Peroxidasa de rábano y su sustrato, peróxido de hidrógeno que en presencia de cromógeno o-fenilendiamina produce un producto color amarillo-naranja medible

Galactosidasa beta y su sustrato o-nitrofenil-beta-D-galactopiranosido que se transforma en un producto nitrofenolato amarillento medible

Fosfatas alcalina y su sustrato p-nitrofenilfosfato que también se transforma en nitrofenolato.

Se utiliza ácido sulfúrico para inhibir la actividad enzimática y estabilizar el producto final de reacción que tiene color. (Guzman 2004)

3. Planteamiento del problema

¿La micro-vibración generada sobre cultivos *in vitro* de osteoblastos derivados del cráneo de ratón de la cepa Balb/c, tiene efectos significativos y cuantificables sobre la producción de IL-12?

4. Objetivo general

Evaluar los efectos de la micro-vibración en osteoblastos cultivados *in vitro* sobre la síntesis de IL-12.

4.1 Objetivos específicos

- a) Establecer cultivos primarios de osteoblastos derivados del cráneo de ratón de la cepa Balb/C.
- b) Evaluar el efecto de la micro-vibración de baja magnitud, alta frecuencia a 30 HZ en los cultivos de osteoblastos con el uso del aparato AcceleDent.
- c) Determinar los efectos de la micro-vibración sobre cultivos *in vitro* de osteoblastos en relación a la síntesis de IL-12 por medio del Ensayo de ELISA.

5. Hipótesis

La micro-vibración a 30 Hz durante 20 minutos sobre cultivos *in vitro* de células osteoblásticas sobre-regula la producción IL-12.

6. Justificación

El tejido óseo constituye uno de los sistemas mayores del organismo, constituido por una matriz mineralizada y una fracción celular muy activa capaz de regenerarse. (Lafita;2003)(Fernández et al 2006) Permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la homeostasis del metabolismo fosfocálcico, la cual implica una compleja red de señalización de célula-célula que involucra células sistémicas, citocinas producidas localmente, factores de crecimiento y el entorno mecánico de las células. (Garcia-Lopez et al 2005).

Se ha demostrado que la vibración de alta frecuencia de baja magnitud (LMHFV), una señal mecánica que puede mejorar la remodelación esquelética al disminuir la actividad osteoclástica (Xie et al., 2006), aumenta la densidad mineral ósea en la cadera y la columna durante la pérdida ósea posmenopáusica (Rubin et al., 2004); por lo tanto, LMHFV se ha propuesto como un amplio tratamiento no farmacológico para tratar la osteoporosis en humanos. Además, los osteocitos cultivados in vitro en presencia de LMHFV muestran niveles reducidos de sRANKL y PGE2, que inhiben el número y tamaño de los osteoclastos formados (Lau et al.2010), regulando positivamente la actividad de los osteoblastos. El LMHFV fue introducido en la ortodoncia por AcceleDent Aura™, su propósito de desarrollo es aplicar fuerza cíclica y vibración durante 20 minutos al día a una frecuencia de 0.25 N y 30 Hz para acelerar el movimiento de los dientes. Sin embargo, el mecanismo celular subyacente aún no se ha dilucidado. Aunque existe suficiente literatura para demostrar que la estimulación por micro-vibración puede aumentar la densidad mineral ósea humana (Rubin et al., 2004; Verschueren et al., 2004), no hay investigaciones para evaluar el efecto del dispositivo AcceleDent Aura en la vibración de micro-pulso producida por las células óseas in vitro. Varios estudios en animales y humanos han investigado el efecto de LMHFV sobre el movimiento acelerado de los dientes. Sin embargo, los resultados reportados son contradictorios (Kalajzic et al., 2014; Nishimura et al., 2008; Woodhouse et al., 2015). En un estudio realizado por Song-Hui Wu y cols, encontraron que LMHFV inhibe directamente la diferenciación de osteoclastos inducida por RANKL de células RAW264.7. Demostrando que la estimulación de LMHFV inhibió significativamente la expresión de catepsina K, MMP-9 y TRAP en células RAW264.7 evaluadas por PCR en tiempo real, lo que fue

consistente con una disminución en el número de grandes MNC positivas a TRAP. Además, también demostraron que LMHFV previno la formación de anillos de actina. Estos datos sugieren que LMHFV inhibe la activación de los osteoclastos (Song-Hui Wu et al., 2012). En otro estudio realizado por Esther Lau y colaboradores, aplicaron vibraciones de baja magnitud a células MLO-Y4 similares a osteocitos a varias frecuencias (30, 60, 90 Hz) durante 1 h. Descubrieron que los osteocitos eran sensibles a este estímulo vibratorio a nivel transcripcional: COX-2 aumentó al máximo en un 344% a 90 Hz, mientras que RANKL disminuyó de forma más significativa a 60 Hz. El medio acondicionado recogido de las células MLO-Y4 vibradas atenuó la formación de grandes osteoclastos en un 36% y la cantidad de reabsorción osteoclástica en un 20%. Encontrando así que la cantidad de RANKL soluble (sRANKL) en el medio acondicionado era un 53% menor en el grupo vibrado, mientras que la liberación de PGE₂ también disminuyó significativamente. Concluyendo que los osteocitos pueden detectar la vibración de LMHF y responder produciendo factores solubles que inhiben la formación de osteoclastos. Sin embargo, en la actualidad no se ha dilucidado a nivel celular y molecular cómo es posible lograr la aceleración del movimiento dental en el tratamiento de ortodoncia a través de la estimulación con la microvibración.

7. Material y métodos

7.1 Obtención de Ratones de la Cepa Balb/C

Para la entrega de dichos ratones, se tuvo que realizar una carta, ser autorizada y entregada a la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco, con las siguientes características: Cepa o Línea Balb/C, Sexo: Indistinto, Edad máxima de 2 semanas y con un peso indistinto. (Figura 6)



Figura 6. Ratones de la Cepa Bal/C recién nacidos obtenidos del Bioterio de la UAM-X.

7.2 Obtención de células osteoblásticas primarias derivadas del cráneo de ratón

Los osteoblastos de cráneo de ratón se prepararon y caracterizaron mediante una modificación del método descrito previamente por Heath y colaboradores (Heath et al., 1984). Los cráneos del ratón recién nacido de la cepa Balb/C se diseccionaron del tejido blando adherente, se colocaron en caja Petri con medio de cultivo F-12/modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM) suplementado con 10% de suero bovino fetal (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), 1 % de antibióticos y antimicóticos, se eliminó el medio y se colocó Tripsina por un periodo de 20 minutos, se cortaron en pedazos los huesos, la Tripsina junto con las células disgregadas se colocaron en un tubo Falcon de 12 ml y se colocó la misma porción de medio de cultivo para neutralizar la acción de la

tripsina, se centrifugaron a 1500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga GS-15R BECKMAN™ (Figura 7) , se decantó el tubo falcon y se colocó 1ml nuevo de medio de cultivo F-12 DMEM, se procedió a vibrar en un Vortex V-1 plus BIOSAN™, las células sedimentadas se resuspendieron a una proporción de 1:1 en un medio F-12/modificación de Dulbecco del medio de Eagle (DMEM) suplementado con 20% de suero bovino fetal (GIBCO, Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), con un 1 % de antibióticos y antimicóticos (Figura 8), Posteriormente se sembraron en cajas de 24 pozos de 1.5 cm (Gybco, USA). La muestra consistió de 5 pozos sembrados a la 1×10^6 células y la caja se colocó en una incubadora de tejidos (NuAire, USA) a una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de aire a una temperatura de 37° C (Figura 9). Las células se identificarán como osteoblastos por criterios morfológicos y el hecho de que más del 95% se teñirá fuertemente para la fosfatasa alcalina (ALP). (Figura 10 y 11)



Figura 7. Las células desprendidas del cráneo de ratón fueron colocadas en un tubo falcon para su centrifugación a 1500 rpm a 27°C.

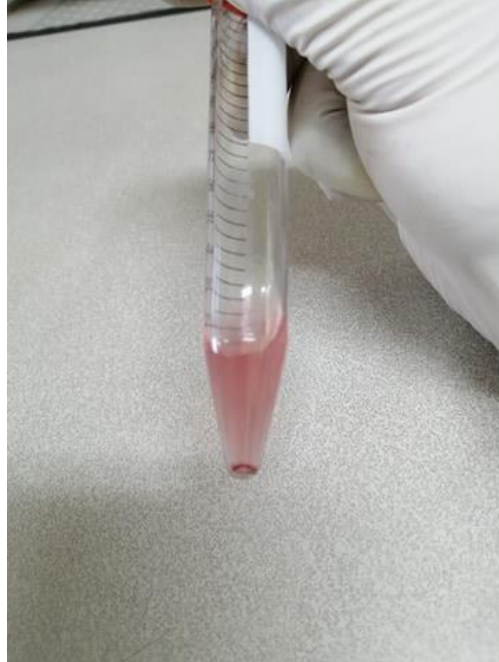


Figura 8. Posterior al centrifugado se observa el botón de células rojas y blancas, las células blancas corresponden a las células osteoblásticas.



Figura 9. Los osteoblastos se resuspendieron en 1ml de medio de cultivo y se sembraron en cajas de 24 pozos (1.5 cm) a una densidad de 1×10^4 por pozo.

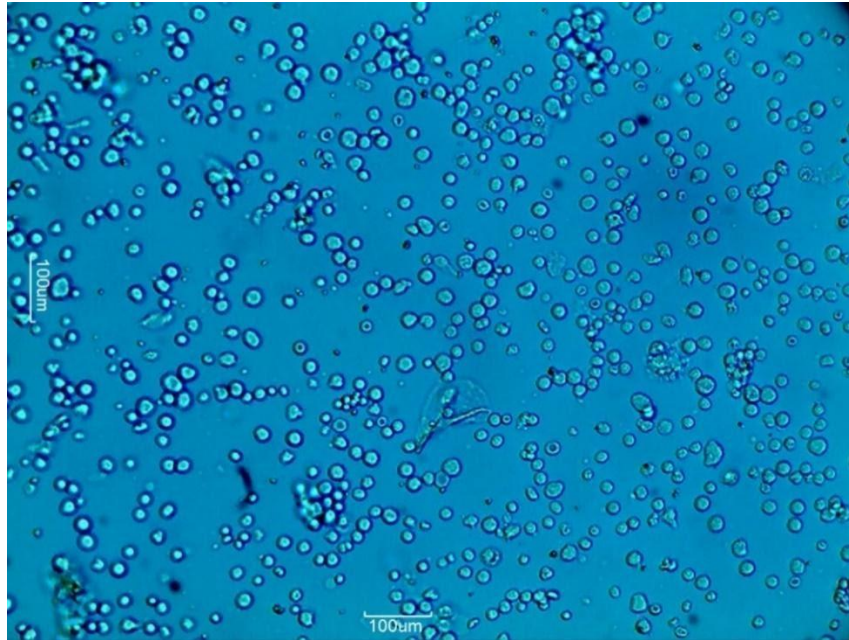


Figura 10. Osteoblastos recién sembrados observados con un microscopio invertido

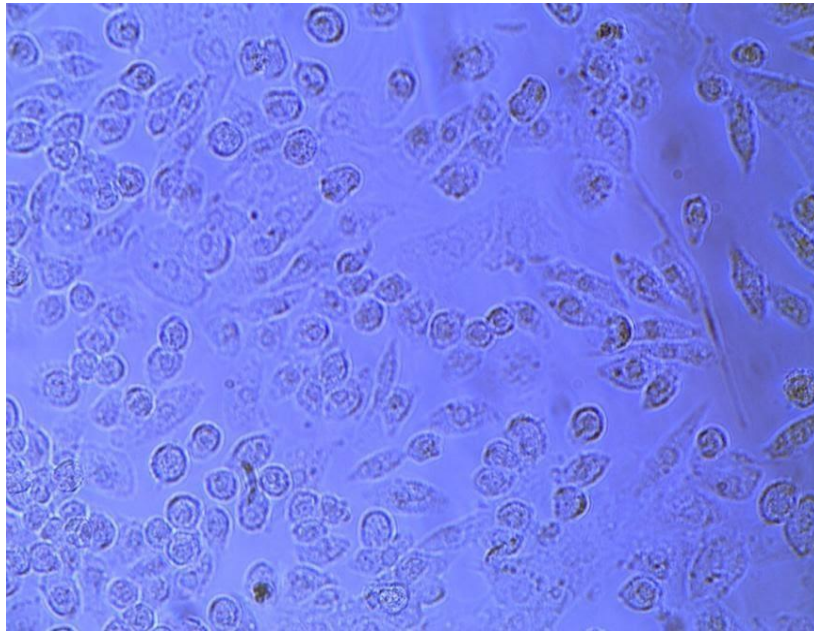


Figura 11. Osteoblastos primarios derivados del cráneo de ratón de la cepa Balb/C a los 20 días de cultivo.

7.3 Estimulación de las células osteoblásticas por medio de la micro-vibración.

Las células osteoblásticas fueron sometidas a micro- vibración, en la caja de cultivo de 1.5 cm y dicho procedimiento se realizó con el aparato AcceleDent® (OrthoAccel, USA), la caja se colocó sobre el AcceleDent® sostenida con masking y sosteniéndolo con ambas manos y apoyado en una superficie firme se llevó a cabo la vibración durante 20 min por 4 días seguidos, recolectando las muestras, tanto la muestra control (antes de ser vibrada) y la experimental (después de ser vibrada), se tomaron 200 µl de sobrenadante de ambas células, una vez adquirida la muestra se rotuló cada tubo con fecha y tipo de célula y se almacenaron en un ultracongelador (Scientific, USA) a -70°C.(Figura 12)



Figura 12. Se vibraron las células osteoblásticas en la caja de cultivo por medio del aparato AcceleDent®, durante 20 minutos durante 4 días.

7.4 Medio de cultivo proteómico.

Posterior a la micro-vibración el sobrenadante de todas las muestras de los medios se complementaron con 1 mg/ml de cóctel inhibidor de la proteasa (Sigma-Aldrich P1860, St. Louis, MO, EE. UU.), Se almacenaron a -70° C y se analizaron 2 días después para IL-12 mediante ensayo de inmunoabsorbentes ligados a enzimas (ELISA, I + D Systems, Minneapolis, MN, EE. UU.). La absorbancia se midió a 450 nm de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

7.5 Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISAs)

Este consistió en la colocación de un antígeno primario en una placa de 96 pozos y este a su vez va a ser reconocido por un anticuerpo secundario (Figura 13), el colorante sobre los pozos de la placa nos permitió medir indirectamente mediante la espectrofotometría el antígeno de la muestra, para esto se realizó lo siguiente:

Se realizó la preparación de los reactivos para la citocina a evaluar, esto se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. (IL-12). Se hizo la preparación de los 96 pozos, el cual consiste en diluir el anticuerpo de captura en PBS a una concentración de $1\mu\text{g/ml}$, inmediatamente se adicionan $100\mu\text{l}$ a cada uno de estos pozos de la placa, se selló y se incubó por 24 horas a temperatura ambiente. Una vez pasada las 24 horas se aspiró el contenido de los pozos y se realizó el lavado 4 veces, se vierte la solución de buffer en un recipiente la cantidad que se ocupará para realizar el lavado, se agregan $100\mu\text{l}$ en cada pozo, se sacude en la tarja para vaciar el buffer y se golpea suavemente sobre una toalla de papel, para retirar el exceso y burbujas restantes. Se adiciona $300\mu\text{l}$ de buffer de bloqueo a cada uno de los pozos y se incuba la placa durante 1 hora a temperatura ambiente, se aspira y se repite el procedimiento de lavado 4 veces más la solución buffer. (Figura 14)

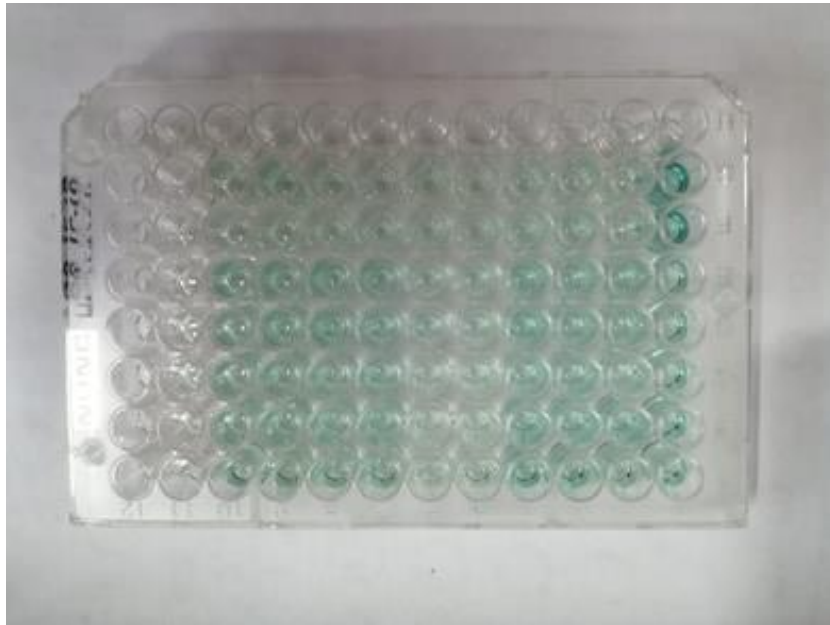


Figura 13. Placa de 96 pozos



Figura 14. Se utilizó la Micropipeta multicanal de 300 μ L. Para el lavado con solución buffer.

7.6 Muestra Estándar

Para este procedimiento se utilizaron 998 μ l de diluyente y se mezclaron con 2 μ l de la interleucina que se va a realizar, se van a colocar 100 μ l en cada pozo marcado y se incubó la placa por 2 horas.

Dichas curvas se realizaron por duplicado.

Anticuerpo de detección.

Se procede a lavar la placa con la solución buffer 4 veces, se va a diluir el cuerpo de detección en diluyente con una concentración de 1 μ g/ml, se adicionó 0.1 ml de anticuerpo de detección a 10 ml de diluyente y se agregaron 100 μ l a cada pozo así lo dejamos incubar por 2 horas a temperatura ambiente.

Peroxidasa Avidina.

Se aspiraron y se lavó la placa nuevamente por 4 veces, se diluyó una alícuota 5.5 µl de peroxidasa avidina 1:1000 en diluyente, se le colocó 100 µl en cada pozo y se dejó incubar por 30 min a temperatura ambiente.

Substrato ABTS

El ABTS se tiene que encontrar a temperatura ambiente para ser utilizado, la placa se aspirara y se lavara 4 veces, se le adicionaran los 100 µl de la solución a cada uno de los pozos, esta se estará monitoreando cada 5 min y se dejara incubar a temperatura ambiente, una vez que se desarrollen los colores en los pozos, se pondrá en el lector de ELISAs a 400 nm y se realizaran 3 lecturas diferentes en lapsos de 5 min cada una.

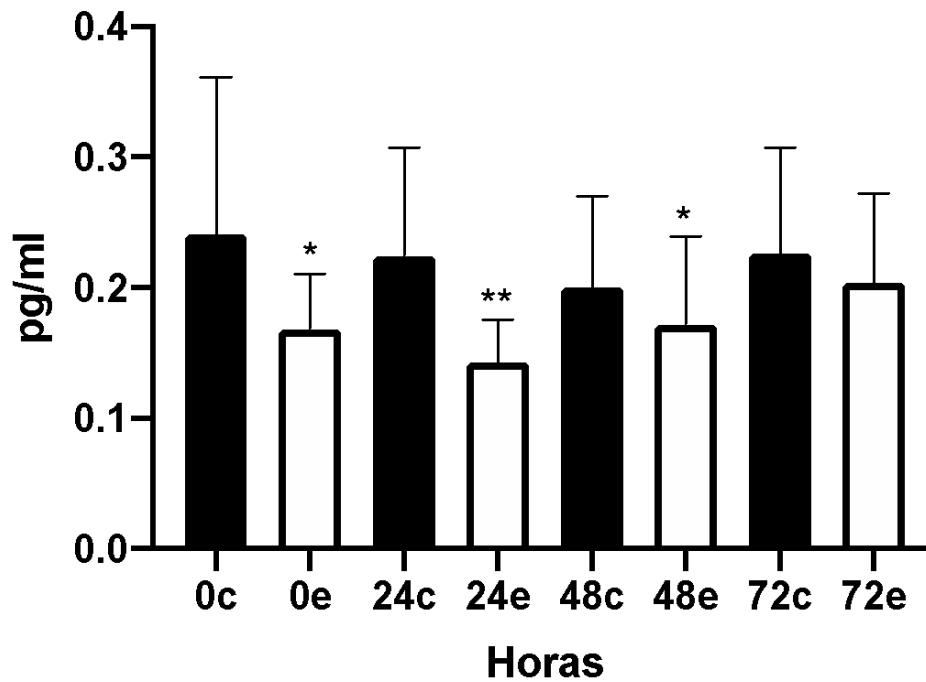
7.7 Análisis Estadístico.

Los datos fueron expresados como el promedio \pm Desviación Standard (DS). La diferencia entre los grupos control y experimental, fueron determinados por la prueba estadística de U-Mann Whitney, utilizando el software Graph Pad Prism 8 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA.) el nivel de significancia estadística fue establecido a: $P < 0.05$

8. Resultados

Se cuantificó el sobrenadante de las monocapas de osteoblastos diferenciados del cráneo de ratones, de la cepa Balb/c cultivado *in vitro* en la síntesis de IL-12

IL-12 osteoblastos



Gráfica 1. Monocapas de osteoblastos diferenciados del cráneo del ratón de la cepa Balb/c cultivados *in vitro*, los cuales fueron sometidos a micro-vibración de baja magnitud y alta frecuencia (0.25N ; 30Hz), durante 20 minutos, de 0 a 72 horas con el aparato Aceledent Aurea. El sobrenadante fue ensayado para IL-12 por medio de ELISA. La primera columna representa al control (barra negra) y la segunda columna el experimental (barra blanca). Los resultados son expresados en promedio \pm la desviación estándar (n=5). La prueba de Wilcoxon fue utilizada para determinar significancia. Se encontró una baja regulación estadísticamente significativa en el grupo experimental comparada con el control en la expresión de IL-12 a las 0 (* p <0.01), 24 (** p <0.001), 48 (* p <0.01).

Horas	Promedio	Desviación estándar
0c	0.241	± 0.119
0e	0.168	± 0.042 *
24c	0.224	± 0.083
24e	0.142	±0.033 **
48c	0.200	± 0.069
48e	0.171	± 0.067 *
72c	0.226	±0.081
72e	0.203	± 0.068

Tabla 2. Promedio en la evaluación de los efectos de la micro vibración en la expresión de IL-12 en osteoclastos del grupo control comparada con el grupo experimental

9. Discusión

El propósito de esta investigación fue la evaluación de los efectos de la micro-vibración a una magnitud de 0.25 N y una frecuencia de 30 HZ en osteoblastos cultivados *in vitro* para determinar la síntesis de IL-12 por medio de ELISA, citocina relacionada con la remodelación ósea.

Para probar la hipótesis “La micro-vibración a 30 Hz durante 20 minutos sobre cultivos *in vitro* de células osteoblásticas sobre-regula la producción IL-12”, se realizaron cultivos de células madres provenientes del cráneo de ratones de la Cepa Balb/C siguiendo un protocolo ya establecido por otros investigadores (Heath *et al.*, 1984), se usaron ratones de 2 semanas de edad, ya que se ha demostrado que los ratones recién nacidos muestran cultivos celulares más proferativos. (Heng *et al.*, 2010).

Este estudio demostró que el efecto de la micro-vibración produjo una baja regulación estadísticamente significativa de IL-12 de 0 a 48 comparada con el grupo control. Estos datos sugieren que IL-12 pueden agregarse a la lista creciente de genes que responden al estrés mecánico. (García-López *et al.*, 2005)

La IL-12 es una citocina que es producida principalmente por macrófagos y células dendríticas, incluyendo a los osteoblastos como se demostró en este estudio. Se ha señalado que esta citocina induce Interferon gama (IFN- γ) el cual es producido por los linfocitos T (Robinson y O`Garra, 2002). Además se ha demostrado que la IL-12 solo y en sinergia con IL-18 inhibe la formación de osteoclastos en co-cultivos de osteoblastos murinos y células del bazo (Horwood *et al.*, 2001). Además, se demostró que los efectos inhibitorios de estas citocinas estaban bloqueados por la adición de un anticuerpo neutralizante anti-IFN- γ por lo que se sugiere que el IFN- γ desempeña un papel importante en la inhibición IL-12 e IL-18 durante la actividad de resorción del hueso por los osteoclastos (Yamada *et al.*, 2002). Por lo tanto el efecto inhibitorio de la IL-12 estimulado por la micro-vibración indica que tuvo un efecto contrario, es decir en lugar de inhibir la actividad osteoclástica, contribuye la actividad osteoclástica inhibida por IL-12.

Por el otro lado, se ha demostrado que la tensión mecánica cíclica en el mismo sistema modelo estimula la producción de IL-12 por los osteoblastos calvariales de ratón, citocina con la capacidad de inhibir la resorción ósea. IL-12 inhibe la formación de osteoclastos inducida por RANKL en cultivos de células de médula ósea de ratón, un efecto mediado por IFN- γ . (García-López *et al.*, 2013)

En este estudio se realizaron cultivos de células osteoblásticas primarias derivadas del cráneo de ratón las cuales se sometieron a micro-vibración con el aparato AcceleDent, con la finalidad de determinar eventos bioquímicos relacionados con la remodelación en respuesta a esta estimulación mecánica y así poder entender la complejidad a nivel celular y molecular de este proceso. El descubrimiento del sistema RANKL-RANK-OPG para ajustar la reabsorción ósea ha permitido hacer avances importantes en el estudio de la regulación del modelamiento y remodelamiento óseo. Este sistema de señalización es esencial para la homeostasis esquelética, se ha demostrado que durante el movimiento dentario es evidente la expresión de este mismo ya que la evidencia científica pudo determinar que hay un equilibrio de RANKL y OPG durante la osteoclastogénesis (Mercado *et al.*, 2016). Es importante reconocer que los osteoblastos cultivados *in vitro* se ven privados de los estímulos mecánicos a los que están expuestos *in vivo*; en otras palabras, las células se encuentran en un estado fisiológico predeterminado que en el esqueleto intacto conduce a una disminución de las deformaciones óseas por debajo del crítico umbral requerido para mantener la estructura ósea normal. (García-López *et al.*, 2013). Estudios previos demuestran que los osteoblastos de ratón MC3T3-E1 Subclone 14 (ATCCR-CRL-2594TM) y los osteoblastos murinos de la calota son sensibles a la micro-vibraciones suaves con el dispositivo AcceleDent Aura, que pudieran estar involucrados en factores solubles que contribuyen a la regulación de la remodelación ósea. (García-López *et al.*, 2015).

La introducción de la micro vibraciones de baja magnitud, alta frecuencia, fue desarrollada para incrementar la densidad ósea en la superficie del hueso, principalmente para la mujeres con deficiencia hormonal, un tratamiento novedoso no farmacológico, sin embargo fue propuesto en el tratamiento de ortodoncia para acelerar el movimiento dentario por lo que el AcceleDent Aura TM fue desarrollado para aplicar micro vibraciones cíclicas con el propósito de acelerar el movimiento del diente del 15% al 30%, si bien, hasta el momento no

se ha aclarado el mecanismo para lograr este objetivo a nivel celular y molecular, por lo que se necesita más investigación para comprender como las microvibraciones aceleran los movimientos de ortodoncia.

10. Conclusión

- a) Fue posible derivar osteoblastos del cráneo de ratón de la cepa Balb/C *in vitro*.
- b) La micro-vibración aplicada a los osteoblastos murinos cultivados *in vitro* demostró una baja regulación de IL-12, por lo que en lugar de inhibir, permite la formación de osteoclastos
- c) Se requieren de más estudios a nivel celular y molecular por el cual la micro-vibración quizá pueda acelerar el movimiento dentario durante el tratamiento de ortodoncia.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Arboleya L, Castañeda S. Osteoclastos: mucho más que células remodeladoras del hueso, *Rev Osteoporos Metab Miner*. 2014; 6(4):1-18.
2. Arboleya L, Castañeda S. Osteoinmunología: el estudio de la relación entre el sistema inmune y el tejido óseo, *Reumatol Clin*. 2013; 9(5): 303-315.
3. Bernabéu E, López O, Larena A. Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados, *Patología del aparato locomotor*. 2006; 4(3): 202-207.
4. Carrasco Otero L. Citoquinas: de fieles aliadas a temibles enemigas, *ANALES*. 2011; 24(1): 76-90.
5. Esparza Guerrero Y, Nava Valdivia C, Saldaña Cruz A, Vazquez Jimenez J. El sistema RANK/RANKL/OPG y sus implicaciones clínicas en la osteoporosis, *El Residente*. 2016; 11(3): 99-104
6. Fernández E, González H, Castro A, Lisboa D. Osteología: relevancia de conceptos médicos en el ámbito odontológico, *Rev Clin Periodoncia Implantol Rehabil Oral*. 2015; 8(1): 2-13
7. Fernández I, Tresguerres Hernández G, Alobera Gracia M. Bases fisiológicas de la regeneración ósea I: Histología y fisiología del tejido óseo, *Med oral patol oral cir bucal (Internet)* 2006 (Consultado 25 Feb 2020); 11(1). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000100011&fbclid=IwAR2xvB3L-MirP1pdVqoiqBh3u3XBOKxhsgC7aFyiZAUdOOEziUbBKBEKK6U
8. Fernández I, Tresguerres Hernández G, Alobera Gracia M. Bases fisiológicas de la regeneración ósea II: El proceso de remodelado, *Med oral patol oral cir bucal (Internet)* 2006 (Consultado 25 Feb 2020); 11(2). Disponible en: http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1698-69462006000200012&fbclid=IwAR2xvB3L-MirP1pdVqoiqBh3u3XBOKxhsgC7aFyiZAUdOOEziUbBKBEKK6U
9. Filella X, Molina R, Ballesta AM. Estructura y función de las citocinas, *Med Integral*. 2002; 39(2): 63-71.
10. García Lopez S, Meikle MC, Villanueva R.E, Montañó L, Masso F, Ramirez Amador V, Bojalil R. Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts in vitro, *Archives of Oral Biology*. 2005; 50(4):449-452.
11. García López S, Villanueva R, Meikle M.C. 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. *Frontiers in endocrinology*. 2013;4(160):1-7
12. García López S, Villanueva R, Meikle M.C. The effects of gentle micropulse vibration on two types of murine osteoblasts. *American Association of Orthodontists*: 2015.
13. García López S, Villanueva R.E, Masso F, Paez Arenas A, Meikle MC. Microvibrations at 30 Hz on bone cells cultivated in vitro produce soluble factors for osteoclast inhibition and osteoblast activity, *Archives of Oral Biology* 110. 2020: 104594.

14. Guerrero CA, Martínez A, Sarmiento J, Cardozo C. La proteína de estrés, heat shock cognate (HSC70) se expresa en osteoblastos sometidos a centrifugación, *Rev Fac Med Univ Nac Colomb.* 2006; 54(3): 169-180.
15. Gutiérrez Gómez J. El proceso de remodelación ósea, *Ortho-tips.* 2008; 4(3): 170-176.
16. Guzman Vazquez Elizabeth. Las pruebas de ELISA, *Gac Med Mex.* 2004; Vol.140 (3).
17. Heath JK, Atkinson Sj, Meikle MC, Reynolds JJ. Mouse osteoblasts synthesize collagenase in response to bone resorbing agents. *Biochim Biophys Acta* 1984; 802:151-4.
18. Heng Z, Zi Kuan G, Xia J, Hong L, Xiao Yan W, Hui Yu Y, Yi Z, Ning M. A protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse compact bone. *Nat Pub Gro.* 2010;5(3):550-560
19. Horwood NJ, Elliott J, Martin TJ, Gillespie MT. IL-12 alone and in synergy with IL-18 inhibits osteoclast formation in vitro. *J Immunol.* 2001;166:4915–4921
20. Lafita J. Fisiología y fisiopatología ósea, *ANALES.* 2003; 26(3): 3-10.
21. Lau E, Al Dujaili S, Guenther A, Liu D, Wang L, You L. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts bone. 2010; 46: 1508–1515.
22. Martínez B, López O, Pellejero L, Gil T. Estudio de la composición ósea para su apropiada regeneración con materiales implantados, *Patología del Aparato Locomotor.* 2006; 4(3): 202-207.
23. Mercado S, Carreón B, Zapana N. Movimiento dental acelerado mediante fuerzas vibratorias (ACCELEDENT®) en tratamientos ortodónticos contemporáneos llevada a la práctica diaria. *Rev Evid Odontol Clinic.* 2016; 2(1):67-72
24. Ochoa Azze R. Técnicas Inmunoenzimáticas para ensayos clínicos de vacunas y estudios inmunoepidemiológicos. La Habana: Finlay Ediciones [Internet]. 2012 [revisión 2012; consultado 27 Feb 2020]. Disponible en: https://www.paho.org/cub/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=casas-editoriales&alias=739-pubfinlay-librobasesmetodolanticuerposeclin-2008&Itemid=226
25. Peral Cagigal B, Redondo LM, Verrier Hernández A, Soto Serrat A. Estudio experimental sobre la regeneración ósea mandibular de la rata con diferentes biomateriales, *Rev Esp Cirug Oral y Maxilofac.* 2008; 30(5): 1-13.
26. Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and molecular mechanisms of bone remodeling, *J Biol Chem.* 2010; 285:25103-8.
27. Riancho José A, Delgado Calle J. Mecanismos de interacción osteoblasto - osteoclasto, *Reumatología Clínica.* 2011; 7(2): 1-4.
28. Rizzoli R. Atlas of Postmenopausal Osteoporosis. 3a ed, Business Media; 2010.
29. Robinson DS, O'Garra A. Further checkpoints in Th1 development. *Immunity.* 2002;16:755–758
30. Rodríguez Montaña R, López Elías MC, Pérez Murillo M. El rol de IFN- γ , IL-12, IL-18 y sus receptores en la periodontitis, *Rev Mex Periodontol.* 2015; 6(1): 33-39.
31. Rubin C, Recker R, Cullen D, Ryaby J, McCabe J, McLeod K. Prevention of postmenopausal bone loss by a low-magnitude, high-frequency mechanical stimuli:

- A clinical trial assessing compliance, efficacy, and safety. *Journal of Bone and Mineral Research*. 2004; 19: 343–351.
32. Tresguerres J A F. *Fisiología Humana*. 3th ed. Madrid: McGraw-Hill Interamericana de España; 2005.
 33. Xie L, Jacobson, JM Choi, ES Busa, B. Donahue, LR Miller, LM, Judex S. Low-level mechanical vibrations can influence bone resorption and bone formation in the growing skeleton. *Bone*. 2006; 39: 1059–1066.
 34. Yamada N, Niwa S, Tsujimura T, Iwasaki T, Sugihara A, Futani H, Hayashi S, Okamura H, Akedo H, Terada N. Interleukin-18 and interleukin-12 synergistically inhibit osteoclastic bone-resorbing activity. *Bone*. 2002;30:901–908
 35. Zhao B, Ivashkiv L. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors, *Arthritis Research & Therapy*. 2011; 13:234.