

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



# Casa abierta al tiempo

TÍTULO:

“Efectos de la micro-vibración en la expresión de IL-4 e IL-13 en osteoblastos y osteoclastos murinos cultivados *in vitro*”

LUIS IVÁN JUÁREZ NORIEGA

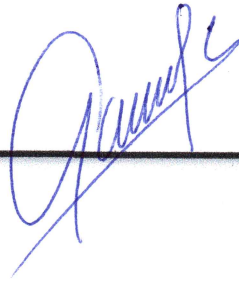
MATRICULA: 2123057074

PERIODO: AGOSTO 2016 – JULIO 2017

FECHA DE ENTREGA: OCTUBRE 2017

ASESOR:

DR. SALVADOR GARCÍA LÓPEZ

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Salvador García López', is written over a solid black horizontal line.

ASESOR:

DR. SALVADOR GARCÍA LÓPEZ

*Patricia Espinoza*

---

COMISIÓN DE SERVICIO SOCIAL DE LA LICENCIATURA DE  
ESTOMATOLOGÍA

## ÍNDICE

<b>CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b> .....	<b>8</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO II. INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>11</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1 Células Madre</b> .....	<b>12</b>
2.1.1 Células Madre Mesenquimales.....	13
<b>2.2 Células Óseas</b> .....	<b>13</b>
2.2.1 Osteoblastos .....	14
2.2.2 Osteocitos .....	15
2.2.3 Osteoclastos .....	15
2.2.4 Fisiología Ósea.....	16
2.2.5 Regeneración y Remodelación Ósea.....	17
<b>2.3 Interleucinas</b> .....	<b>19</b>
2.3.1 Interleucina – 4 .....	19
2.3.2 Interleucina – 13 .....	20
2.3.3 Interleucina – 4 e Interleucina – 13 en Conjunto .....	20
2.3.4 Otras Citocinas de Importancia.....	21
<b>2.4 ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) y ELISA Sándwich</b> <b>“DAS” ( Sandwich Doble Anticuerpo)</b> .....	<b>22</b>
<b>2.5 Prueba de Fosfatasa Ácida Resistente al Tartrato (TRAP+)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.6 Vibración de Micropulso en la Ortodoncia (AcceleDent)</b> .....	<b>24</b>
<b>3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo General</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Hipótesis</b> .....	<b>26</b>
<b>3.3 Justificación</b> .....	<b>27</b>



<b>4. MATERIAL Y MÉTODO</b> .....	<b>28</b>
4.1 Obtención de Ratones de la Cepa Balb/C .....	28
4.2 Desinfección de Instrumental y Preparación de Material.....	28
4.3 Obtención de Células Osteoblásticas del Cráneo de los Ratones .....	28
4.4 Mantenimiento de las Células Osteoblásticas .....	30
4.5 Obtención de Células Madre Mesenquimales .....	31
4.6 Diferenciación de Células Madre Mesenquimales a Osteoclastos y su Mantenimiento .....	33
4.7 Prueba de Resistencia al Tartrato (TRAP+).....	333
4.8 Micro-vibración de las Células .....	33
4.9 Preparación de Soluciones para ELISA.....	35
4.10 Ensayo de la prueba de ELISA para IL-4 e IL-13.....	35
4.11 Preparación de la Microplaca .....	35
4.12 Preparación de Curva .....	36
4.13 Colocación de las Muestras .....	36
4.14 Anticuerpo de Detección .....	36
4.15 Avidin Peroxidasa, ABTS y Lectura de las Placas.....	36
4.16 Análisis Estadístico .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>38</b>
5.1 Análisis de Resultados del ELISA: Expresión de IL - 4 e IL - 13.....	38
<b>6. DISCUSIÓN</b> .....	<b>40</b>
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>8. LIMITACIONES Y PROPUESTAS</b> .....	<b>42</b>
<b>9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>CAPÍTULO III. INFORME NUMÉRICO NARRATIVO</b> .....	<b>47</b>
<b>CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES</b> .....	<b>52</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Clasificación y tipos de Células Madre.....	<b>13</b>
<b>Figura 2.</b> Diferenciación a Osteoclastos .....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Remodelación Ósea .....	<b>18</b>
<b>Figura 4.</b> Citocinas anti-inflamatorias y acción anti-osteoclastogénica .....	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Citocinas pro-inflamatorias y su acción osteoclastogénica .....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Protocolo ELISA DAS .....	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Ratones en Alcohol Etílico .....	<b>28</b>
<b>Figura 8.</b> Huesos de Cráneo .....	<b>30</b>
<b>Figura 9.</b> Incisión para obtener huesos del cráneo .....	<b>30</b>
<b>Figura 10.</b> Osteoblastos .....	<b>30</b>
<b>Figura 11.</b> Extremidades de ratones en medio de cultivo .....	<b>32</b>
<b>Figura 12.</b> Incisión para obtención de tibia y fémur de ratón .....	<b>32</b>
<b>Figura 13.</b> Centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos .....	<b>32</b>
<b>Figura 14.</b> Botón obtenido tras centrifugación .....	<b>32</b>
<b>Figura 15.</b> Sembrado de células .....	<b>32</b>

<b>Figura 16.</b> Tinción de Osteoclastos .....	<b>33</b>
<b>Figura 17.</b> Micro-vibración con AcceleDent .....	<b>34</b>
<b>Figura 18.</b> Lector de ELISA .....	<b>37</b>
<b>Figura 19.</b> Placa de ELISA .....	<b>37</b>

## **LISTA DE GRÁFICAS**

<b>Gráfica 1.</b> Expresión de IL-4 e IL-13 Osteoblastos.....	<b>38</b>
<b>Gráfica 2.</b> Expresión de IL-4 e IL-13 Osteoclastos .....	<b>39</b>

## CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN GENERAL

El presente documento es el informe del servicio social que como pasante de la carrera de estomatología realicé del 1 de Agosto del 2016 – 31 de Julio del 2017 en el área de investigación de Ciencias Básicas del Departamento de Atención a la Salud.

Primeramente contiene el reporte de la investigación titulada “Efectos de la micro-vibración en la expresión de IL-4 e IL-13 en osteoblastos y osteoclastos murinos cultivados *in vitro*”, que tuvo como objetivo evaluar los efectos de la micro-vibración en estas células. Las células óseas cultivadas *in vitro* sometidas a la micro-vibración producen factores solubles relacionados con la remodelación del hueso. Más adelante contiene el informe numérico narrativo donde describo las actividades que realicé durante el periodo de servicio social presentándolas en cuadros mensuales y finalmente en el apartado de conclusiones comparto la experiencia vivida como pasante en este proyecto de investigación.

## RESUMEN

**Introducción.** Se ha demostrado que el uso de la micro-vibración en pacientes con pérdida del hueso induce la osteogénesis en la cortical externa del esqueleto. **Objetivo.** Evaluar los efectos de la micro-vibración en células osteoblásticas y osteoclasticas. **Material y Método.** Osteoblastos derivados del cráneo del ratón Balb/C fueron sembrados en cajas de 24 pozos de 1.5 cm (Gybc, USA) en un medio de cultivo F-12 DMEM (ATCC, USA) y osteoclastos derivados de células madre de la tibia de ratón fueron sembrados en cajas de 24 pozos de 1.5 cm en un medio de cultivo  $\alpha$ -MEM (ATCC, USA) adicionando 0.5  $\mu$ l/ml de  $1\alpha,25$ -Dihydroxivitamin D<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, USA), ambos medios cultivos fueron suplementados con 10% de Suero Fetal Bovino (Gybc, USA), 1% de antibióticos y antimicóticos, en una incubadora de tejidos (NuAire, USA) a una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire a una temperatura de 37° C. Las células se sometieron a micro-vibraciones (0.25 N; 30 Hz) con el aparato AcceleDent (Ortho Accel, USA) durante 20 minutos. Antes y después de las micro-vibraciones fue recolectado el sobre nadante de las células y almacenado en un ultracongelador a -70°C. (Thermo, USA) para posteriormente realizarles pruebas ELISA y evaluar la expresión de las IL-4 e IL-13 (Peprotech, Rocky Hills, N.S., USA). **Resultados.** La micro-vibración mostró significativamente sobre regulación de la producción de IL-4 e IL-13 (P<0.01) en los osteoblastos comparada con el grupo control. También, en los osteoclastos hubo una sobre regulación de IL-4 (P<0.01) e IL-13 (P<0.001). **Conclusión.** Las células óseas cultivadas *in vitro* sometidas a micro-vibración producen factores solubles relacionados con la remodelación del hueso.

**Palabras clave.** Osteoclastos, Osteoblastos, IL-4, IL-13, remodelación ósea, micro-vibración, AcceleDent.

## ABSTRACT

**Introduction.** It has been demonstrated that the use of micro-vibration in patients with bone loss induces osteogenesis in skeletal cortical bone. **Aim.** Evaluate the effects of micro-vibration in osteoblast and osteoclast bone cells. **Material and Method.** Osteoblast derived from Balb/C mouse calvaria were cultured in 24 well plates (Gybco, USA) measuring 1.5 cm each that included F-12 DMEM (ATCC, USA) medium culture. Osteoclast were derived from mesenchymal stem cells from the Balb/C tibia and likewise were cultured in 24 well plates (Gybco, USA) measuring 1.5 cm each and included  $\alpha$ -MEM (ATCC, USA) medium with 0.5  $\mu$ l/ml of 1 $\alpha$ ,25-Dihydroxivitamin D<sub>3</sub> (Sigma-Aldrich, USA). Both mediums were supplemented with 10% of Fetal Bovine Serum (Gybco, USA), 1% of antibiotic and anti-mycotic agents and stored in a tissue incubator (NuAire, USA) at an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> and 95% air at 37° C. The cells underwent micro-vibrations (0.25 N; 30 Hz) using the AcceleDent device (Ortho Accel, USA) during 20 minutes. Before and after the micro-vibrations the cultured supernatant was collected and stored in an ultra freezer at -70° C (Thermo, USA). The supernatant was later used for ELISA assays to evaluate the expression of IL-4 and IL-13 (Peprotech, Rocky Hills, N.S., USA). **Results.** Micro-vibration showed significant up-regulation of IL-4 and IL-13 (P<0.01) production in osteoblast compared to the control group. There was also up-regulation of IL-4 (P<0.01) and IL-13 (P<0.001) in osteoclast. **Conclusion.** Bone cells cultured *in vitro* that underwent micro-vibration produced soluble factors related with bone remodeling.

**Keywords.** Osteoclast, Osteoblast, IL-4, IL-13, bone remodeling, micro-vibration, AcceleDent.

## CAPÍTULO II. INVESTIGACIÓN

### 1. INTRODUCCIÓN

El hueso es un tejido que se encuentra en renovación constantemente. Su proceso de remodelado óseo es esencial para mantener homeostasis en el organismo. La remodelación ósea es un proceso equilibrado en el cual participan principalmente los osteoclastos y osteoblastos. Los osteoclastos son células que en el organismo cumplen la función de reabsorber el tejido óseo mientras que los osteoblastos se encargan de secretar la matriz ósea que posteriormente será mineralizada para reemplazar el hueso previamente reabsorbido. Durante la remodelación ósea el organismo secreta diversas citocinas e interleucinas mediadoras que influyen directamente la señalización de los pasos del remodelado. Son responsables de los procesos de diferenciación celular y ayudan a mantener un equilibrio entre el hueso que se reabsorbe y el hueso que es reemplazado. En los años recientes se ha demostrado que el uso de vibraciones en pacientes con patologías óseas ha ayudado al proceso de inducción de osteogénesis. También, se han realizado estudios en los cuales se han utilizado micro-vibraciones con una fuerza de 0.25 N (25 g) y una frecuencia de 30 Hz para acelerar los tratamientos de ortodoncia por medio del uso del aparato AcceleDent. El objetivo de este trabajo fue el evaluar los efectos de la micro-vibración en células osteoblásticas y osteoclasticas cultivadas *in vitro*.

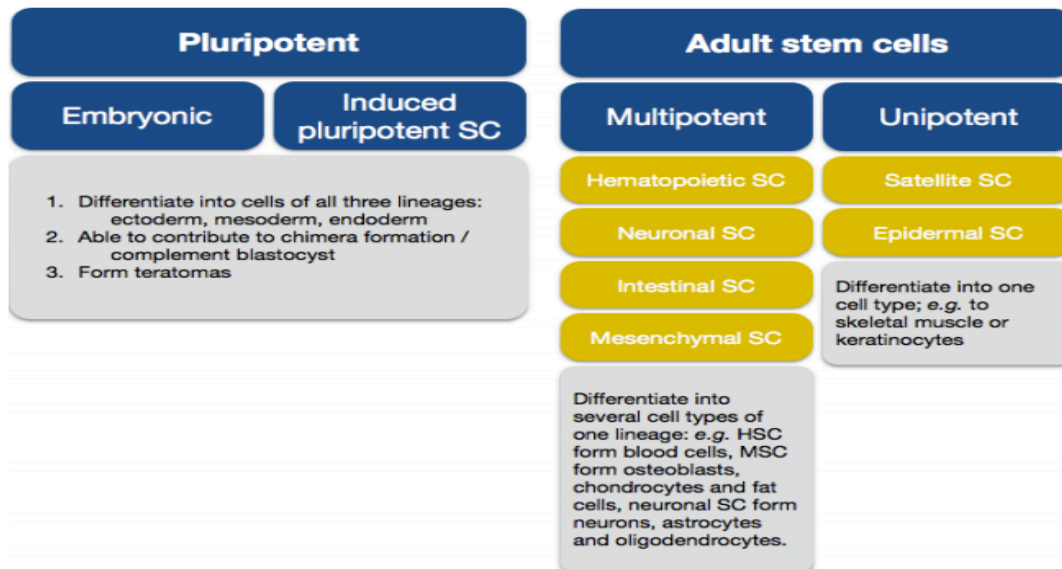
## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Células Madre

La célula madre es una célula indiferenciada que posee dos rasgos característicos, deben de ser capaz de renovarse así mismas y deben tener la capacidad de diferenciación multilineage. Una forma en la que estas células son clasificadas es por medio de su potencia en diferenciación. Las células madre pueden ser totipotente, pluripotente, multipotente y unipotente (Preston *et al.*, 2003; Dulak *et al.*, 2015) (Figura 1). En el humano la célula totipotente se conoce como cigoto y tiene la habilidad de formar al embrión y cualquier célula del cuerpo humano. Las células pluripotentes tienen la capacidad de diferenciarse a casi todas las células que provienen de las tres capas germinales de la célula madre embrionaria (Dulak *et al.*, 2015). En el organismo posnatal las células son multipotentes o unipotentes y se les conoce como células madre adultas. Las células multipotentes tienen la capacidad de diferenciarse a múltiples tipos de células de un mismo linaje mientras que las unipotentes únicamente se diferencian a un tipo de célula.

Las células madre existen en la mayoría de los órganos y ocupan la minoría en la población celular. Una característica importante de estas células es su habilidad de transdiferenciación la cual permite que una célula proveniente de un lugar pueda diferenciarse a una célula de otro lugar, como es el caso de las células madre de la médula ósea. Se sabe que las células madre de la médula ósea pueden diferenciarse a células de hígado, riñón, cardiomiocitos, musculares, de línea neural y del intestino, entre otras (Preston *et al.*, 2003). Las células madre son sumamente importantes en la actualidad ya que se ha comprobado en estudios *in vivo* e *in vitro* su capacidad de regenerar y reparar tejidos dañados.





**Figura 1** Clasificación y tipos de Células Madre  
Tomado de Dulak *et al.*, 2015

### 2.1.1 Células Madre Mesenquimales

Hace aproximadamente 40 años las primeras células madre mesenquimales fueron identificadas provenientes de la medula ósea. La medula ósea contiene poblaciones de células madre hematopoyéticas y una población de células poco comunes adherentes a plástico, inicialmente conocidas como células estromales y posteriormente nombradas células madre mesenquimales (Williams, 2011). Estas células madre mesenquimales adherentes a plástico y con características fibroblásticas se pueden diferenciar a condrocitos, adipocitos, miocitos y osteoblastos. Entre sus propiedades de mayor importancia están la promoción de regeneración ósea e inhibición de la respuesta inmune; también, tiene ventajas sobre las células madre embrionarias al tener menor riesgo a desarrollar enfermedades malignas y evitar problemas éticos (Qin *et al.*, 2014).

### 2.2 Células Óseas

El hueso es tejido conectivo mineralizado que constituye principalmente de células osteoclasticas, osteoblásticas y osteocitos (Alliston, 2014). A pesar de su apariencia inerte, el hueso es un órgano dinámico el cual se encuentra constantemente bajo remodelación; los osteoclastos reabsorben el hueso mientras

que los osteoblastos se encargan de regenerarlo. Evidencia demuestra que los osteocitos funcionan como mecanosensores y orquestadores de el proceso de remodelación ósea. Otros autores también incluyen a las células de revestimiento óseo como células óseas, su función aún no es muy clara pero se cree que juegan un papel muy importante de acoplamiento entre la resorción y formación ósea (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

### 2.2.1 Osteoblastos

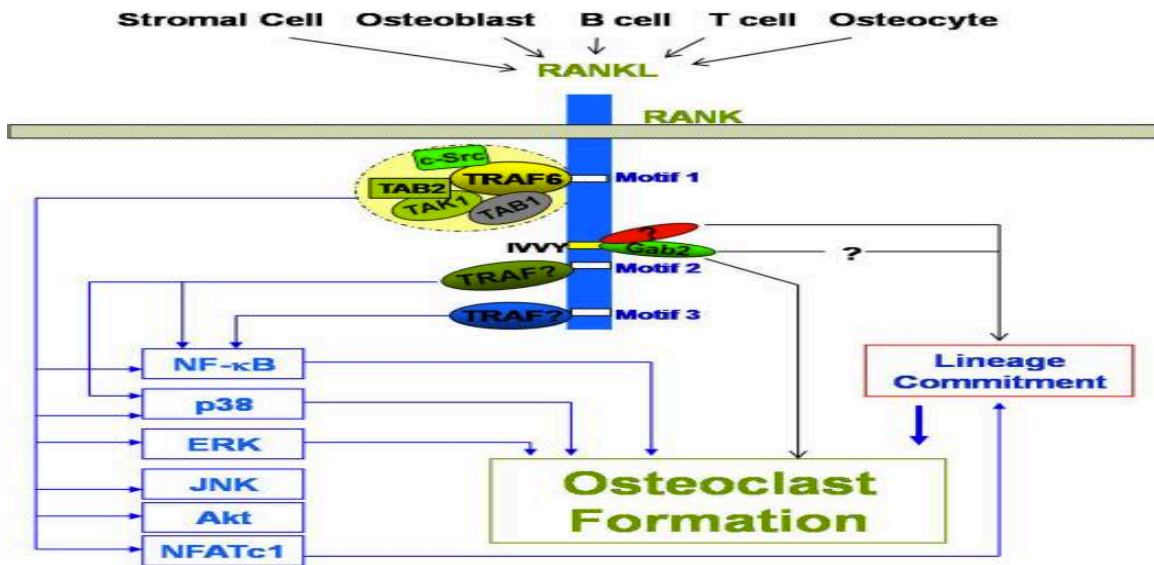
Los osteoblastos son células mononucleares, cuboidales ubicadas en la superficie de los huesos y componen del 4-6% del total de las células que residen en estos tejidos (Florencio-Silva *et al.*, 2015). Cumplen un papel muy importante en el mantenimiento de los tejidos óseos, son responsables de depositar la matriz ósea que forma el hueso y regulan a los osteoclastos. Estas células formadoras de hueso provienen de las células madre mesenquimales y son diferenciadas a osteoblastos por diversos genes y factores de transcripción que son liberados, entre ellos están la proteína morfogénica ósea (BMP), osterix (Osx), Cbfa1 o Runx2 y factor de transcripción activador 4 (ATF4) (Caetano-Lopes *et al.*, 2007). Estudios han demostrado que en ausencia de estos factores no hay diferenciación de las células madre mesenquimales a osteoblastos. La síntesis de la matriz ósea por medio de los osteoblastos ocurre en dos pasos principales, el depósito de la matriz orgánica y posteriormente su mineralización (Florencio-Silva *et al.*, 2015). También, regulan la resorción ósea por medio del ligando de receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANKL) el cual se enlaza con el receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK) de la superficie de las células pre-osteoclasticas para de esta forma inducirlas a su diferenciación y formar osteoclastos. Para mantener el balance entre la actividad que ocurre entre osteoblastos y osteoclastos, el osteoblasto también se encarga de secretar osteoprotegerina (OPG) la cual sirve como inhibidora uniéndose a RANKL evitando la unión RANK/RANKL y de esta forma eludir la diferenciación y activación de osteoclastos (Caetano-Lopes *et al.*, 2007).

### 2.2.2 Osteocitos

Los osteocitos son la célula de mayor abundancia en el hueso, componen aproximadamente del 90-95 % de la población de células óseas en el hueso. Su morfología es de célula dendrítica de cuerpo pequeño y numerosos procesos largos y esbeltos que conectan con osteocitos, osteoblastos y células de revestimiento óseo cercanas (Schaffler *et al.*, 2014). Una vez que los osteoblastos liberan la matriz ósea algunas de estas células son atrapadas en esta matriz, dando lugar a los osteocitos (Caetano-Lopes *et al.*, 2007). Los osteocitos actúan como mecanosensores y orquestadores de la remodelación ósea. La interconexión de los osteocitos tiene la capacidad de detectar la presión mecánica ayudando al hueso a su adaptación ante estas fuerzas; de esta forma orquestan la remodelación ósea ayudando a regular las actividades osteoclásticas y osteoblásticas (Florencio-Silva *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Osteoclastos

Los osteoclastos son células “gigantes” multinucleadas diferenciadas de células mononucleares del linaje de células monocíticas y macrófagos, ambas derivadas de progenitores hematopoyéticos de la médula ósea. La osteoclastogénesis depende de dos factores esenciales, el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) y RANKL; el M-CSF promueve la proliferación y sobrevivencia de los precursores osteoclásticos y el RANKL es el factor principal que conduce a la diferenciación de estos precursores a osteoclastos (Feng *et al.*, 2013) (Figura 2). Estos osteoclastos se encargan de degradar el hueso por medio de la secreción polarizada de enzimas proteolíticas como la catepsina K y ácido, los cuales hidrolizan y solubilizan los componentes orgánicos e inorgánicos del hueso (Charles *et al.*, 2014).



**Figura 2** Diferenciación a Osteoclastos  
Tomado de Feng *et al.*, 2013

## 2.2.4 Fisiología Ósea

El proceso de modelado y remodelado del hueso para la regulación y homeostasis de calcio, daño por fatiga y plasticidad fenotípica en respuesta al ambiente mecánico es conocido como fisiología ósea (Doherty *et al.*, 2015). Modelado es el proceso por el cual el hueso cambia de forma como respuesta fisiológica a causa de las fuerzas que interactúan con el y se ajusta gradualmente a sus necesidades; en la remodelación ósea el hueso se renueva para mantener su fuerza y homeostasia mineral, se elimina hueso viejo para posteriormente ser reemplazado por hueso nuevo (Clarke, 2008). En el proceso de modelado y remodelado óseo los osteoblastos y osteoclastos trabajan en conjunto, los osteoclastos producen iones de hidrogeno para disolver los minerales de los cristales de hidroxapatita y enzimas hidrolíticas, las cuales digieren la matriz orgánica del hueso. Posteriormente, los osteoblastos depositan matriz orgánica nueva, principalmente colágeno tipo I y regulan el proceso de mineralización ósea (Doherty *et al.*, 2015).

### 2.2.5 Regeneración y Remodelación Ósea

Debido a microfracturas y el equilibrio homeostático de los huesos, estos se encuentran bajo constante regeneración y remodelación para su adaptación ante diferentes cargas mecánicas (Hadjidakis *et al.*, 2006). El ciclo de remodelación ósea consiste en cuatro etapas: activación, resorción, inversión, y formación (Raggatt *et al.*, 2010). Los tiempos de las etapas de remodelación varían pero se cree que aproximadamente el tiempo de resorción dura 2 semanas, inversión 4-5 semanas y formación 4 meses (Hadjidakis *et al.*, 2006). Se le denominan unidades multicelulares básicas a las zonas en las que interactúan osteoclastos, osteoblastos y osteocitos para llevar a cabo el proceso de remodelado (Eriksen, 2010).

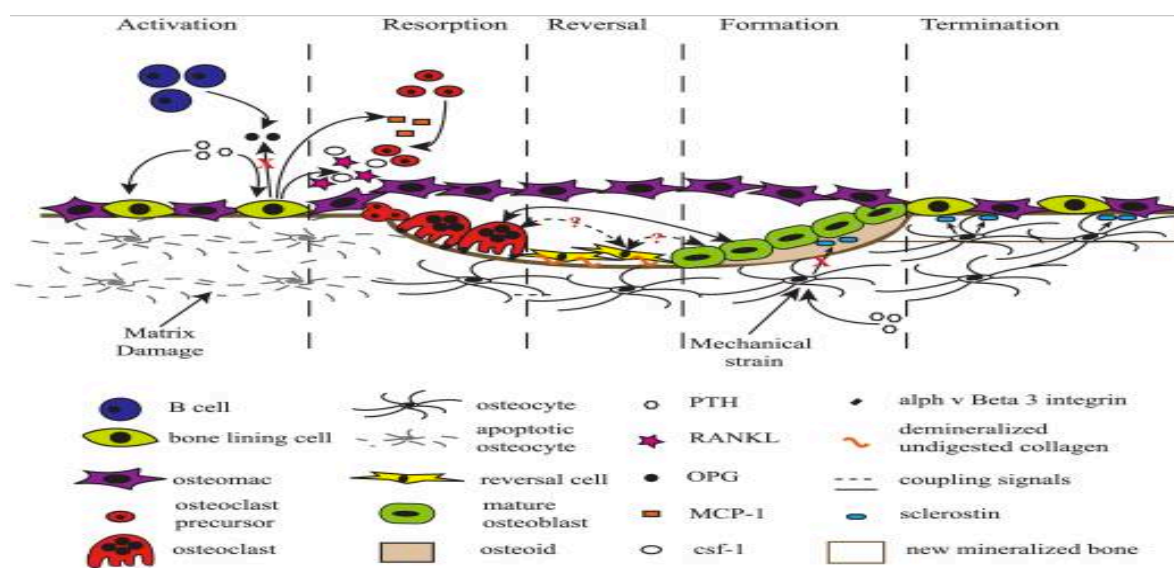
La etapa de activación es dictada por algún daño al tejido o liberación de hormona, por ejemplo, estrógeno u hormona paratiroidea (PTH). En condiciones normales los osteocitos secretan factor de crecimiento transformador  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) el cual inhibe la osteoclastogénesis. Cuando hay un daño óseo o la inmovilización de extremidades también ocurre apoptosis de los osteocitos; la disminución de osteocitos disminuye los niveles de TGF- $\beta$  y remueve la inhibición de osteoclastogénesis dando lugar a la producción de osteoclastos. Por otro lado, para mantener homeostasis cálcica en los huesos la glándula paratiroidea secreta PTH el cual se une a los receptores de PTH de la superficie de los osteoblastos. La unión entre PTH y osteoblastos activa a la proteína quinasa A y C y las vías de señalización intracelular de calcio que inducen y moderan la secreción de precursores osteoclásticos para su diferenciación.

Una vez secretados los precursores osteoclásticos los osteoblastos comienzan a orquestar la liberación de interleucinas, MCSF, RANKL y OPG. La producción de MCSF y RANKL incrementa mientras que la de OPG disminuye. Los osteoblastos también secretan metaloproteinasas de la matriz que degradan osteoide sin mineralizar para facilitar la adhesión de los osteoclastos al hueso y generar una “zona de sellado” en la cual se llevará a cabo la resorción ósea. Iones de hidrógeno son liberados en esa zona de sellado para generar un pH ácido que

genera la disolución de tejido mineralizado, la matriz orgánica remanente es degradada por enzimas como la catepsina K.

Posterior a la resorción mediada por los osteoclastos sigue la etapa de inversión. Se liberan células mononucleares que remueven colágeno remanente y preparan la superficie del hueso para la regeneración ósea dirigida por los osteoblastos (Raggatt, *et al.*, 2010).

Durante el proceso de remodelación ósea todo el hueso reabsorbido es reemplazado por hueso nuevo, existe un acoplamiento muy cercano y directo entre resorción y formación y las células responsables. El mecanismo por el cual existe este acoplamiento aun no es muy claro pero se sabe que la liberación de factores de crecimiento y interleucinas juegan un papel muy importante para mantener el balance (Eriksen, 2010). Una vez que las células mesenquimales y las células osteoblásticas progenitoras regresan a la zona de resorción, estas se diferencian a osteoblastos y secretan principalmente colágeno tipo I para reemplazar el hueso perdido. Para que el hueso llegue a su estado final se incorporan cristales de hidroxapatita al osteoide recién generado y se incorporan fosfatos inorgánicos para su mineralización. Una vez mineralizado el hueso los osteoblastos maduros pueden sufrir apoptosis, se pueden revertir a células de revestimiento o se pueden quedar incrustadas en la matriz mineralizada y diferenciar a osteocitos (Raggatt *et al.*, 2010) (Figura 3).



**Figura 3** Remodelación Ósea  
Tomada de Raggatt *et al.*, 2010

## 2.3 Interleucinas

Las interleucinas (IL) son un tipo de citocinas, estas interleucinas son proteínas de señalamiento producidas por el sistema inmune. La familia de las interleucinas son identificadas y diferenciadas entre ellas por un número, hasta la IL-38 (Stenken *et al.*, 2015). Las células inmunes y las células óseas tienen en común su sitio de origen, la médula ósea. Debido a su cercanía estos grupos de células trabajan en conjunto e influyen su activación, formación, maduración y hasta su función. El desarrollo de las células óseas es apoyado por las células del sistema inmune, por ejemplo, los macrófagos inducen la osteoblastogénesis mientras que los linfocitos T influyen la osteoclastogénesis. Se ha establecido que las IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7 y TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral, TNF) promueven la osteoclastogénesis directa e indirectamente mientras que el INF- $\beta$  (Interferón, INF), IFN- $\gamma$ , IL-3, IL-4, IL-10, IL-13, IL-12 solas o en conjunto con la IL-18 inhiben la formación de osteoclastos (Singh *et al.*, 2012).

### 2.3.1 Interleucina – 4

La IL-4 es una glicoproteína que tiene un conjunto de cuatro hélices cortas y es miembro del grupo de las citocinas de la cadena- $\gamma$  (Silva-Filho *et al.*, 2014). Son producto de los linfocitos T 2 (TH2) y también de los linfocitos NK, basófilos, mastocitos y eosinófilos. Su producción requiere un estimulante que eleva de forma intracelular el calcio libre (Paul, 2015). La IL-4 apoya el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B. Su función es mediada por el complejo de receptores de IL-4, IL-4R. Hay dos tipos de IL-4R, la cadena IL-4R $\alpha$  y la cadena  $\gamma$ -común. En presencia de el factor de necrosis tumoral (TNF) la IL-4 induce la expresión de las moléculas de adhesión vascular 1 (VCAM-1) sobre las células endoteliales reduciendo la selectina-E. Esto es importante ya que aumenta la incorporación de linfocitos T y eosinófilos en vez de granulocitos al sitio de inflamación lo cual indica que las IL-4 funcionan como moléculas anti-inflamatorias potentes (Silva-Filho *et al.*, 2014). La IL-4 inhibe de forma espontánea o estimulada la resorción ósea por su inhibición de la formación de osteoclastos, de igual forma afecta la función de las células ya diferenciadas a osteoclastos.

También se ha demostrado en estudios hechos a ratones que la IL-4 disminuye la velocidad de la remodelación ósea, lo que indica que tiene un efecto en la formación ósea y los osteoblastos (Ura *et al.*, 2000).

### **2.3.2 Interleucina – 13**

Existen varias similitudes entre la IL-4 y la IL-13. Al igual que la IL-4, la IL-13 proviene de varias fuentes como: linfocitos T, eosinófilos y mastocitos entre otras células pro-inflamatorias (Brightling *et al.*, 2010). La IL-13 es compuesta por cuatro hélices, muy similar a la estructura de la IL-4 y al igual tiene propiedades anti-inflamatorias al inhibir la liberación de citocinas pro-inflamatorias como macrófagos, monocitos, linfocitos B, linfocitos NK y células endoteliales. Su efecto anti-inflamatorio es muy importante ya que ha demostrado que tiene la habilidad de inhibir los efectos pro-inflamatorios del TNF- $\alpha$ . Se ha considerado como un uso para el tratamiento de la osteoartritis como inhibidor de procesos de inflamación, protección de condrocitos, reductor de la secreción de citocinas pro-inflamatorias y metaloproteinasas (Wojdasiewicz *et al.*, 2014).

### **2.3.3 Interleucina – 4 e Interleucina – 13 en Conjunto**

Estudios han demostrado que ambas IL inhiben la formación de osteoclastos y la resorción ósea a resultado de la supresión de ciclooxigenasa 2 (COX-2), prostaglandina que regula la diferenciación de células mesenquimales a osteoblastos. Los resultados de los estudios realizados en ratones han demostrado que las IL-4 e IL-13 inhiben la diferenciación de los osteoblastos lo cual conlleva a la inhibición de la función de los osteoclastos (Ura *et al.*, 2000) (Figura 4).



Cytokine	Mechanism of anti-osteoclastogenic action	Evidence on direct effect on osteoclasts	Synergy/Antagonism with other pro-inflammatory cytokines	Evidence on opposite/osteoclastogenic effect
IFN- $\gamma$	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ RANK signaling (11)</li> <li>↓ cathepsin K (192)</li> <li>↓ 1,25-(OH)<math>_2</math>D<math>_3</math>, PTH and IL-1 mediated osteoclastogenesis (193)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ TRAF6 (11)</li> <li>↑ osteoclasts' apoptosis by Fas/Fas ligand signals (194)</li> <li>↓ RANKL-induced osteoclasts formation (195)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>synergy with IL-12 (125)</li> <li>antagonism with TNF-<math>\alpha</math> (194)</li> </ul>	(43,80,81)
IFN- $\beta$	<ul style="list-style-type: none"> <li>negative feedback regulation of osteoclasts via RANKL induced c-Fos signaling (85)</li> <li>↑ RANKL induced NO release (196)</li> <li>↑ expression of CXCL11 (84)</li> </ul>	(85)		
IFN- $\alpha$	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ TRAP and c-Fos (89)</li> </ul>			
IL-4	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ NFATc1 expression via STAT6 (197)</li> <li>↓ NFATc1 and c-Fos expression (198)</li> <li>↑ OPG and ↓ RANKL via STAT6 (199-201)</li> <li>↑ T cell surface molecules (202)</li> </ul>	(202, 203)	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓TNF-<math>\alpha</math> signaling, ↑IL-1 (203)</li> </ul>	
IL-10	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ NO (104)</li> <li>↑ OPG and ↓ RANKL expression (105)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ expression of NFATc1 (101)</li> <li>↓ expression of NFATc1, c-Fos and c-Jun downstream RANK signaling (102)</li> <li>↓ transcription of TREM2 downstream RANK signaling (103)</li> </ul>		
IL-13	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑OPG and ↓ RANKL via STAT6 (199-201)</li> </ul>			
IL-18	<ul style="list-style-type: none"> <li>T cells independent mechanism (110)</li> <li>↑ apoptosis of osteoclasts with ↑ NO production (108)</li> <li>↑ OPG from stromal cells (109)</li> <li>↑ GM-CSF from T cells (107)</li> <li>↑ IFN-<math>\gamma</math> from T cells (56)</li> </ul>		<ul style="list-style-type: none"> <li>synergy with IL-12 (50,55,110)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>↑ RANKL from T cells (204)</li> </ul>
IL-33	<ul style="list-style-type: none"> <li>↓ osteoclastogenesis (112,113)</li> </ul>			

**Figura 4** Citocinas anti-inflamatorias y acción anti-osteoclastogénica  
Tomade de Zupan *et al.*, 2013

### 2.3.4 Otras Citocinas de Importancia

Es importante mencionar otras citocinas como son las IL-1, IL-6, IL-11, IL-17 y TNF- $\alpha$  o también conocidas como citocinas pro-inflamatorias. Estas citocinas son factores importantes en la regulación de los osteoclastos y su producción se ve alterada en patologías que afectan el metabolismo óseo. Las citocinas pro-inflamatorias se consideran osteoclastogénicas ya que han demostrado estimular la diferenciación de osteoclastos al modular RANK/RANKL/OPG o al actuar directamente en estas células.

La IL-1, IL-6 y TNF-  $\alpha$  tienen muchas similitudes entre ellas, éstas provienen de las células del sistema inmune, principalmente de los macrófagos. Su función principal es su estímulo para inducir la resorción ósea y osteoclastogénesis. A diferencia de la IL-1 y TNF-  $\alpha$ , la IL-6 no solo induce la osteoclastogénesis pero se ha demostrado que los osteoblastos y células madre mesenquimales también producen IL-6 en cantidades nanomolares y tienen efectos anti-osteoclastogénicos.

También, la IL-11 es producto de las células mesenquimales de la médula ósea e induce la osteoclastogénesis y resorción ósea. En estudios realizados en ratones se demostró que aquellos con una deficiencia de receptores de IL-11 tenían un aumento de volumen de hueso trabecular ya que no se llevaba a cabo de forma adecuada la resorción ósea. Finalmente, la IL-17 es una citocina producto de los linfocitos T, que al igual que las previamente mencionadas induce a la osteoclastogénesis. Estudios han demostrado que la IL-17 junto con TNF- $\alpha$  e IL-1 se expresan de forma importante en aquellos pacientes que padecen de artritis reumatoide (Zupan *et al.*, 2013) (Figura 5). La importancia de mencionar estas citocinas pro-inflamatorias es que nos ayuda a entender los factores que sobre regulan la osteoclastogénesis. También, podemos contrastar y entender mejor el papel de las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-13 y sus propiedades anti-osteoclastogénicas que ayudan a mantener un equilibrio en el proceso de remodelación y regeneración ósea.

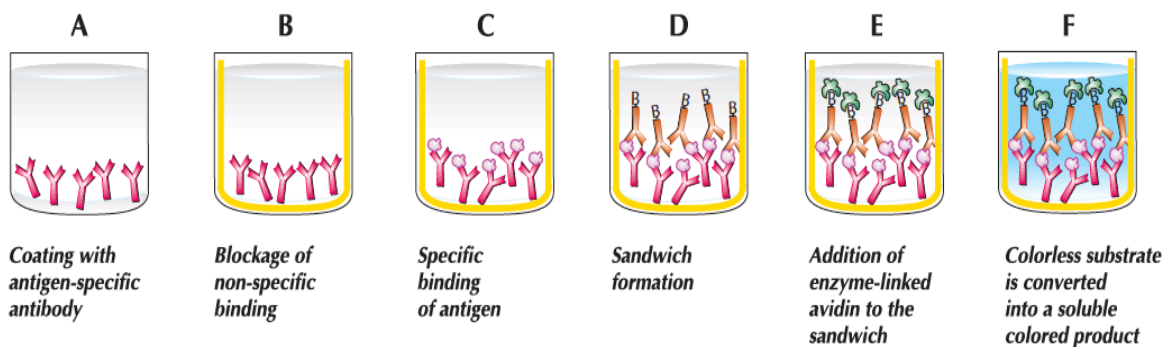
Cytokine	Mechanism of osteoclastogenic action	Evidence on direct effect on osteoclasts	Synergy/Antagonism with other pro-inflammatory cytokines	Evidence on opposite/anti-osteoclastogenic effect
IL-1	↑ RANKL in stromal cells (54,172,173)	(174)	synergy with TNF- $\alpha$ (54), IL-6 and TNF- $\alpha$ (53) and PGE <sub>2</sub> (175)	
TNF- $\alpha$	↑ RANKL dependent osteoclastogenesis (176), ↑ RANKL (172,173)	(53,176-179)	synergy with IL-1 (54), with IL-1 and IL-6 (53), with RANKL (176)	
IL-6	↑ RANKL and OPG (180)	(181)	synergy with IL-1 and TNF- $\alpha$ (53,182), with TNF- $\alpha$ (183), with PGE <sub>2</sub> (184)	(48)
IL-8	↑ RANKL(78)	(78,185)		↑ NO (104)
IL-11	↑ RANKL/OPG (186)	(181)	antagonism with IL-6 (187)	
IL-15	↑ differentiation of OC (188)		synergy with TNF- $\alpha$ (188)	
IL-17	↑ RANKL (189)	(190)	synergy with TNF- $\alpha$ and IL-1 (71-73), synergy with PGE <sub>2</sub> (189)	(74)
IL-32	↑ NFATc1, OSCAR and cathepsin K (191)		↑ release of IL-4 and IFN- $\gamma$ (191)	

**Figura 5** Citocinas pro-inflamatorias y su acción osteoclastogénica  
Tomado de Zupan *et al.*, 2013

## 2.4 ELISA (Ensayo por Inmunoabsorción Ligado a Enzimas) y ELISA Sándwich “DAS” ( Sandwich Doble Anticuerpo)

ELISA o enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas) es una técnica usada en laboratorios para cuantificar la concentración de antígenos o anticuerpos específicos en las soluciones complejas de las células. Su nivel de sensibilidad y especificidad son comparables a los de los radioinmunoensayos (RIA) con la ventaja de no requerir materiales costosos o

radioactivos. El protocolo de detección implica la lectura del cambio de color en los pozos de la placa tras una reacción química que al iniciar es transparente, los resultados obtenidos son comparados a la curva del protocolo para calcular la concentración del antígeno en la muestra. Las placas para un ELISA de Sándwich Doble son preparadas con un anticuerpo específico que reconoce el antígeno que se examinará y otro que lo detecta, anticuerpo de captura y anticuerpo de detección respectivamente. Ambos anticuerpos ayudan a mejorar de forma significativa la sensibilidad y especificidad del ensayo, este tipo de ensayo es recomendado principalmente para medir citocinas y hormonas en muestras biológicas (PeproTech, 2012) (Figura 6).



**Figura 6** Protocolo ELISA DAS  
Tomada de PeproTech 2012

## 2.5 Prueba de Fosfatasa Ácida Resistente al Tartrato (TRAP+)

Las enzimas son moléculas proteicas cuya función es acelerar los procesos químicos en las células, también se conocen como catalizadores. La fosfatasa ácida resistente al tartrato (TRAP) es una enzima que se ve muy relacionada con los osteoclastos. El aumento de la actividad osteoclástica es acompañada por el incremento de la síntesis y liberación de fosfatasa ácida tipo 5b, la cual es resistente a la influencia inhibitoria del tartrato, y se denomina TRAP. Estudios han demostrado una alta actividad de TRAP en los osteoclastos, las patologías que incrementan la resorción ósea han demostrado una cantidad elevada de esta enzima en la circulación. Se ha considerado que TRAP es una enzima de diagnóstico para patologías que involucran la resorción ósea (Bull *et al.*, 2002).

También, hay kits de tinción TRAP se utiliza para teñir la fosfatasa ácida resistente al tartrato en osteoclastos cultivados *in vitro* (K-Assay, 2017).

## 2.6 Vibración de Micropulso en la Ortodoncia (AcceleDent)

A lo largo de los años se han evolucionado diversas alternativas para tratar las patologías que afectan la densidad mineral del hueso. Una de esas enfermedades es la osteoporosis, principalmente presente en mujeres posmenopáusicas debido a una disminución de sus niveles de estrógeno. Dicha disminución afecta el proceso de desmineralización en los huesos produciéndoles defectos en su arquitectura. Aparte de su tratamiento farmacológico, es recomendado que los pacientes con osteoporosis realicen actividad física ya que el estímulo induce la formación ósea. Debido a la fragilidad de los huesos del paciente y el riesgo que presenta realizar esta actividad física, se han propuesto diversas terapias que les evite un riesgo a lesionarse. La vibración de cuerpo completo ha tenido mucho éxito y han comprobado que actúa como estímulo a la formación ósea ya que incrementa los niveles de hormonas de crecimiento y testosterona, los cuales previenen la osteoporosis. A pesar de diversos estudios, aún no queda muy clara la frecuencia o la magnitud de las vibraciones que se deben aplicar. Lo que sí se ha logrado determinar es que las vibraciones con dirección vertical producen mayor estímulo osteogénico que las vibraciones horizontales.

Dado al éxito que ha brindado la vibración a la osteogénesis como coadyuvante de la terapia farmacológica en pacientes con osteoporosis, el método se ha incorporado en otras áreas como en la ortodoncia. Un factor de importancia en los tratamientos ortodónticos en la actualidad es el tiempo en el que se realizan. El tiempo que tarda en moverse un diente depende directamente de la velocidad fisiológica de la resorción y aposición ósea. Se han propuesto distintos complementos al tratamiento de ortodoncia convencional pero debido al dolor localizado que generan y la resorción de raíz severa que provocan se han ido descartando. Lo que si es muy claro es que los tratamientos de ortodoncia más cortos disminuyen diversos factores de riesgo a la salud del paciente como: riesgo a caries, enfermedad periodontal y resorción radicular. Es por esto que se ha

desarrollado un método que involucra la emisión de vibraciones cíclicas con una fuerza de 0.25 N (25g) a una frecuencia de 30 Hz. Las vibraciones son emitidas por el aparato AcceleDent, el cual se introduce a la boca del paciente diariamente por un tiempo de 20 minutos (Dubravko *et al.*, 2015). Una variedad de estudios por autores como Kopher, Mao, Miekle, Peptan, Vij y colegas realizado sobre suturas craneales de conejos demostraron que las fuerzas pulsátiles entre 1 Hz y 8 Hz con una fuerza de entre 0.3 N y 5 N incrementaban el crecimiento de las suturas. Trasladándolo a la boca, esto indicaba un incremento en la velocidad del movimiento de los dientes de 2.5 veces más rápido. Otro estudio realizado por Nishimura y colaboradores, fue sobre molares de ratas con una vibración de una fuerza de 60 Hz a lo largo de 10 minutos una vez cada 7 días, los resultados demostraron que el grupo de ratones que recibió la vibración obtuvieron un movimiento dental significativamente más rápido con una disminución en la resorción radicular de los dientes (Orton-Gibbs *et al.*, 2015).

La biología de la ortodoncia y el movimiento de los dientes ha demostrado la síntesis y expresión de citocinas en el organismo. En el proceso de remodelación ósea se ha observado que la IL-4 se encarga de moderar la homeostasis ósea al tener acción directa sobre los osteoclastos y su proceso de maduración. También, la IL-13 junto con la IL-4 se han visto reflejadas en el incremento de la expresión de OPG en los osteoblastos (García-López *et al.*, 2015).

Finalmente, Kau y colaboradores reportaron que el uso de AcceleDent en sus pacientes logró el movimiento de 2.4 mm en dientes mandibulares y 3 mm en dientes maxilares durante un mes de uso, dos veces más rápido de lo normal (Orton-Gibbs *et al.*, 2015). Dubravko y colaboradores coincidieron al demostrar que AcceleDent incrementaba de forma significativa la velocidad del movimiento dental en tratamientos de ortodoncia (Dubravko *et al.*, 2015).

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

¿Tiene algún efecto la micro-vibraciones sobre la síntesis de interleucinas (IL) durante el proceso de remodelación y regeneración ósea?

#### 3.1 Objetivo General

Evaluar los efectos de la micro-vibración en células osteoblásticas y osteoclásticas.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- a) Derivar células osteoblásticas del cráneo de ratón recién nacido de la cepa BALB/C.
- b) Derivar osteoclastos de células madre de la médula ósea de la tibia de ratón recién nacido de la cepa BALB/C.
- c) Establecer cultivos primarios de osteoblastos y osteoclastos *in vitro* y someterlos a micro-vibración de baja magnitud, alta frecuencia (30 HZ) con el aparato AcceleDent.
- d) Determinar la producción de IL-14 e IL-13 en los cultivos del sobrenadante de osteoblastos y osteoclastos a través del ensayo de ELISA.

#### 3.3 Hipótesis

El estímulo de micro vibración de baja magnitud, alta frecuencia a 30Hz sobre las células osteoblásticas y osteoclásticas cultivadas *in vitro* induce una sobre regulación en la expresión de la IL - 4 e IL - 13.

### 3.3 Justificación

Las patologías óseas se han vuelto un problema de la actualidad. Existen varias formas de tratarlas con medicamentos pero en enfermedades como la osteoporosis estos medicamentos han demostrado no ser 100% efectivos al inhibir su desarrollo. También, por su mecanismo de acción los medicamentos pueden generar efectos adversos que perjudican de mayor forma al paciente (Weber-Rajek *et al.*, 2015). Es por esto que se ha tratado de encontrar alternativas para estos pacientes que coadyuven a los tratamientos actuales.

Un tratamiento indispensable para la osteoporosis es la actividad física. Se han empleado tratamientos de vibración de cuerpo completo como fisioterapia para estos pacientes, los cuales inducen la osteogénesis (Weber-Rajek *et al.*, 2015). La osteogénesis forma parte de la remodelación ósea, un proceso indispensable para el organismo y el mantenimiento de la homeostasis en los huesos. A cargo de los procesos fisiológicos óseos se encuentran citocinas del sistema inmune que trabajan en conjunto con las células del hueso. Las citocinas influyen la activación, formación, maduración y hasta la función de los osteoblastos y osteoclastos (Singh *et al.*, 2012).

En la estomatología, la vibración al inducir osteogénesis, ha sido empleada en tratamientos de ortodoncia para acelerar el movimiento dental. Tras someter a pacientes a micro-vibraciones, un estudio demostró el movimiento de 2.4 mm en dientes mandibulares y 3 mm en dientes maxilares, movimiento dos veces más rápido de lo normal (Orton-Gibbs *et al.*, 2015).

El beneficio que puede brindar el uso de micro-vibraciones en los huesos es evidente. Al inducir la ontogénesis e incrementar la frecuencia del proceso de remodelación ósea, las micro-vibraciones podrían tener una relación directa con las patologías que alteran el metabolismo óseo. A futuro, se podrían emplear técnicas nuevas que utilicen estas vibraciones como tratamientos para patologías óseas para mejorar la condición de los pacientes.

## 4. MATERIAL Y MÉTODO

### 4.1 Obtención de Ratones de la Cepa Balb/C

Los ratones de 3 semanas de nacido y sexo indistinto de la cepa Balb/C se obtuvieron de la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UPEAL – Bioterio). Ahí mismo, siguiendo las normas estipuladas por el Bioterio se sacrificó a los ratones por dislocación cervical. Posteriormente se colocaron en un vaso precipitado con alcohol etílico para evitar cualquier tipo de contaminación (Figura 7).



**Figura 7** Ratones en Alcohol Etílico

### 4.2 Desinfección de Instrumental y Preparación de Material

Se comenzó preparando el instrumental y material que se iba a utilizar para la obtención y sembrado de las células. El instrumental y material previamente esterilizado se colocó dentro de la campana de flujo laminar (NuAire, USA) y se encendió la luz UV durante 5 minutos para rectificar la esterilización de la zona y de los productos en su interior. Previo a la esterilización con luz UV se utilizaron gasas estériles y alcohol etílico al 80% para limpiar el interior de la campana.

### 4.3 Obtención de Células Osteoblásticas del Cráneo de los Ratones

En una caja Petri de 3.5 mm se colocó 1 ml de medio de cultivo DMEM:F-12 (ATCC, USA) para poder colocar los huesos del cráneo conforme se fueran obteniendo del ratón (Figura 8). Los ratones que se encontraban desinfectando en



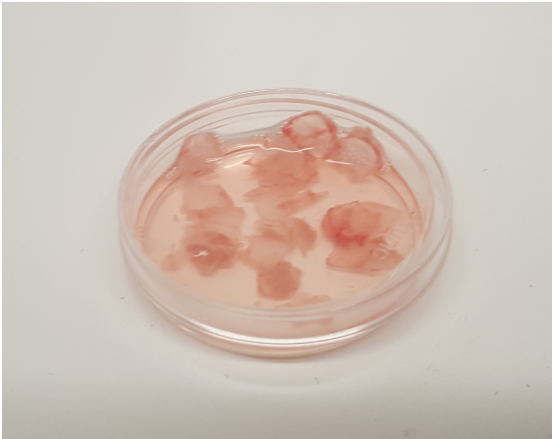
un vaso precipitado se obtenían dejando que escurriera el exceso de alcohol y posteriormente uno por uno se trasladaba a la cama de disección cubierta por papel aluminio desechable. Utilizando un bisturí No. 15 se hizo una incisión a la altura de la base del cuello por la espalda del ratón siguiendo una línea de hombro a hombro y se levantó esa piel hacia arriba y adelante con dirección a la cara del ratón para descubrir su cráneo (Figura 9). Con el mismo bisturí se realizó una incisión a lo largo de la sutura sagital, coronal y lambdoidea. Posteriormente, se utilizó una pinza de algodонера con la cual se luxó el hueso parietal a nivel de la sutura escamosa para desprenderlo en su totalidad del cráneo del ratón. El hueso fue depositado en la caja de Petri conteniendo el medio de cultivo en la cual se juntaron todos los huesos que se iban a obtener.

Una vez reunidos todos los huesos, se aspiró el medio de cultivo con una jeringa de 5 ml y se desechó, inmediatamente se colocó 1 ml de medio de cultivo nuevo con el cual se lavaron los huesos. Se colocó el medio de cultivo y se aspiró, se volvió a colocar el mismo medio de cultivo a la caja y se repitió el procedimiento de lavado 3 veces para posteriormente desecharlo y colocar 1 ml de Tripsina. Con un bisturí No. 15 se trituraron los huesos en la caja de Petri y se colocó durante 15 minutos dentro de la incubadora (NuAire, USA) calibrada a una atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> y una temperatura de 37° C. Después de los 15 minutos se aspiró la Tripsina y se colocó dentro de un tubo falcón de 14 ml y se agregó al tubo 1 ml de Antitripsina para contrarrestar el efecto de la Tripsina.

Posteriormente se colocó el tubo falcón en la centrifugadora durante 5 minutos a 1500 rpm para la obtención del botón celular. Se extrajo el tubo de la centrifugadora y se decantó el sobrenadante dejando únicamente el botón celular al cual se le agregó 5 ml de nuevo medio de cultivo DMEM:F-12 (ATCC, USA) y se utilizó un Vortex (Biosan, Latvia) para homogenizar y resuspender el botón celular con el medio de cultivo.

Finalmente, se aspiró el medio de cultivo del tubo falcón y se procedió al sembrado de las células en una caja de 24 pozos de la cual únicamente se utilizaron 5, se seleccionaron los pozos más céntricos para evitar alguna contaminación. Se colocó 1 ml del medio de cultivo por pozo. La caja se cerró

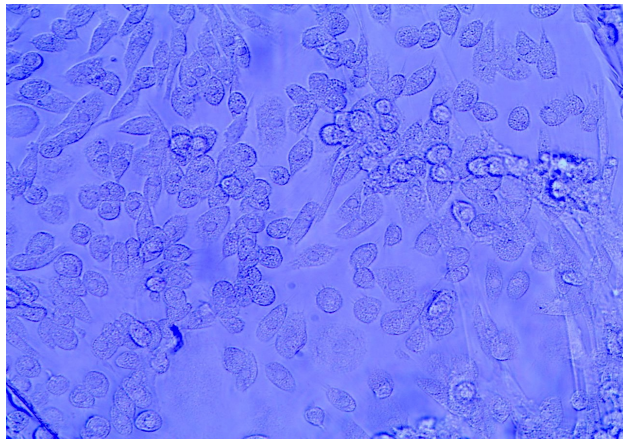
utilizando su tapa y se fijó con masking tape en el cual se colocó la fecha de su sembrado. Antes de colocar la caja en la incubadora se observaron las células debajo de un microscopio invertido para corroborar visualmente que se haya realizado el sembrado de forma exitosa y se revisaron periódicamente para poder ver su proceso de maduración (Figura 10).



**Figura 8** Huesos de Cráneo



**Figura 9** Incisión para obtener huesos del cráneo



**Figura 10** Osteoblastos

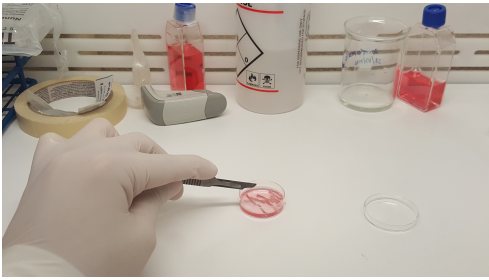
#### 4.4 Mantenimiento de las Células Osteoblásticas

Para mantener y madurar las células osteoblásticas obtenidas del hueso del cráneo del ratón se utilizó medio de cultivo DMEM:F-12 (ATCC, USA) que contiene 2.5 mM de L-glutamina, 15mM de HEPES, 0.5 mM de piruvato sódico y 1,200 mg/L de bicarbonato de sodio. Al medio se le añadió 10% de Suero Fetal

Bovino (Gybco, USA) y 1% de antibióticos y antimicóticos. Cada 48 horas se realizó el lavado y cambio de medio de cultivo de cada pozo. El procedimiento se llevaba a cabo en la campana de flujo laminar (NuAire, USA) con jeringas estériles de 5 ml para evitar cualquier tipo de contaminación. Se aspiraba y desechaba el medio de cada pozo, se le agregaba 1 ml de nuevo medio a cada pozo a los cuales se le volvía a aspirar y depositar el mismo medio repitiendo el lavado 3 veces por cada pozo. Finalmente se le colocaba 1 ml de medio nuevo y se tapaba la caja. Antes de volverlas a introducir a la incubadora se observaban bajo el microscopio invertido para valorar su avance.

#### **4.5 Obtención de Células Madre Mesenquimales**

De igual forma, se utilizó una caja de Petri de 3.5 cm a la cual se le añadió 1 ml de medio de cultivo EMEM (ATCC, USA) para la colocación de las extremidades de los ratones (Figura 11). Se realizó una incisión en las extremidades inferiores a nivel de la rodilla y otra a nivel del tobillo para la obtención de la tibia y fémur de los ratones (Figura 12). Ya reunidos todos los huesos necesarios se realizó un lavado en la caja de Petri y se colocó nuevo medio de cultivo en el cual fueron triturados. Finalmente, se realizó el centrifugado para la obtención del botón celular y el sembrado de las células en la placa de pozos (Figura 13, 14 y 15).



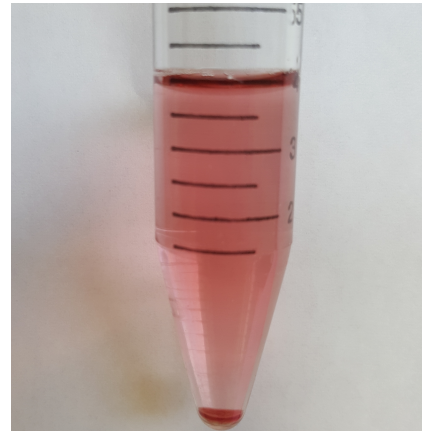
**Figura 11** Extremidades de ratones en medio de cultivo



**Figura 12** Incisión para obtención de tibia y fémur de ratón



**Figura 13** Centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos



**Figura 14** Botón obtenido tras centrifugación



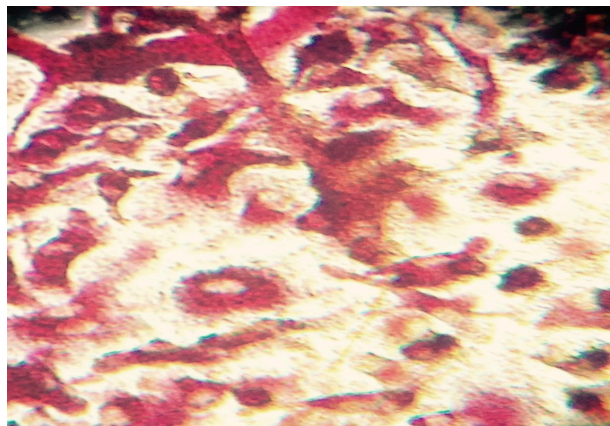
**Figura 15** Sembrado de células

#### 4.6 Diferenciación de Células Madre Mesenquimales a Osteoclastos y su Mantenimiento

Las células madre mesenquimales fueron diferenciadas a osteoclastos al agregar 0.5  $\mu\text{l/ml}$  de  $1\alpha,25\text{-Dihydroxivitamin D}_3$  (Sigma-Aldrich, USA) al medio de cultivo (EMEM) de cada pozo donde se sembraron células. Para asegurar que se llevara a cabo la diferenciación, a estas células se les realizó el lavado de pozo y cambio de medio de cultivo cada 24 horas durante una semana.

#### 4.7 Prueba de Resistencia al Tartrato (TRAP+)

Se realizó la Prueba de Resistencia al Tartrato para verificar que las células se hayan diferenciado a osteoclastos. Se lavaron los pozos con 100  $\mu\text{l}$  de Buffer de Fosfato Salino (PBS), posteriormente se agregó la misma cantidad de fijador a cada pozo y se dejó fijar por 5 minutos a temperatura ambiente. Se continuó al lavado de cada pozo 3 veces cada uno con 250  $\mu\text{l}$  de agua destilada. Finalmente, se adicionaron 200  $\mu\text{l}$  de Sustrato Cromógeno a cada pozo y se incubaron de 20 a 60 minutos a una temperatura de  $37^\circ\text{C}$ , se volvió a lavar con agua destilada y se verificó la tinción de las células debajo del microscopio. Las células que tomaban un color entre rojo y rosa eran células osteoclásticas (Figura 16).



**Figura 16** Tinción de Osteoclastos

#### 4.8 Micro-vibración de las Células

Para la micro-vibración (0.25 N; 30Hz) se utilizó el aparato AcceleDent (Ortho Accel, USA) sobre la caja de pozos durante 20 minutos (Figura 17). En el primer

día de micro-vibración se obtuvo el ml de sobrenadante de cada pozo e individualmente se introdujo en un microtubo, un microtubo por pozo. Se colocó una etiqueta en los microtubos indicando el número del pozo (1-5), la letra C (cráneo) o M (médula) y las letras AV (antes de vibrar), estas muestras representarían el control. Posteriormente se le agregó 1 ml de medio de cultivo a cada pozo, se tapó la caja y con masking tape se fijó el AcceleDent y se vibró durante 20 minutos consecutivos. Una vez terminada la vibración se repitió el proceso de colocar el sobrenadante de cada pozo en microtubos. Los microtubos fueron etiquetados de igual forma con el numero del pozo (1-5), la letra C (cráneo) o M (médula) y las letras PV (posvibrado), estas muestras representaban las experimentales.

Sin lavar los pozos, se agregó medio de cultivo nuevo y se colocó la caja en la incubadora para repetir el proceso de micro-vibración dos veces más y obtener un total de 3 fechas. Las muestras fueron guardadas con en un frasco con fecha del día que se trabajaron dentro de un Ultracongelador (Thermo, USA) a  $-70^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 17** Micro-vibración con AcceleDent



## 4.9 Preparación de Soluciones para ELISA

### **Buffer Fosfato Salino (PBS)**

Se diluyó buffer de 10xPBS a 1xPBS a un pH de 7.20 utilizando agua estéril

### **Buffer de Lavado**

Se utilizó PBS y se agregó Tween-20 para que quedara a una concentración de 0.05%

### **Buffer de Bloqueo**

Se utilizó PBS y se agregó Albúmina de Suero Bovino (BSA) para que quedara a una concentración del 1%

### **Diluyente**

Se utilizó Tween-20 a 0.05% y BSA a 0.1% y se agregaron a PBS

## 4.10 Ensayo de la prueba de ELISA para IL-4 e IL-13

Siguiendo el protocolo establecido por el laboratorio de fabricación PeproTech, se realizaron dos análisis de las muestras utilizando kits de ELISA para Murino, uno para IL-4 y otro para IL-13. Estos kits incluyen los componentes necesarios para obtener una medida cuantitativa de mL-4 y mL-13 respectivamente, natural o recombinante por medio de un Sándwich ELISA.

## 4.11 Preparación de la Microplaca

Se prepararon las placas para los ELISA de IL-4 e IL-13. Se comenzó agregando 100µl de anticuerpo de captura a cada pozo. Las placas se sellaron y se incubaron a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente se aspiraron los pozos con una pipeta multicanal para remover el líquido que tenían y se lavó 4 veces cada pozo utilizando 300µl de Buffer de Lavado por pozo, por lavado. Posteriormente se “sacudieron” las placas sobre una toalla de papel para remover excedentes líquidos y eliminar burbujas. Se agregó 300µl de Buffer de Bloqueo por pozo y se dejaron incubar ambas placas durante 1 hora a temperatura ambiente, después de la hora se repitió el proceso de lavado en las placas.

#### 4.12 Preparación de Curva

Las curvas se realizaron por duplicado, se colocó el estándar en las placas utilizando 100µl por pozo de los pozos 1-6 de las filas A y B. Los pozos 7 y 8 de ambas filas quedaron únicamente con 100µl de diluyente. Cada estándar quedó diluido de la siguiente manera en su placa correspondiente.

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1x	1/2x	1/4x	1/8x	1/16x	1/32x	D	D
B	1x	1/2x	1/4x	1/8x	1/16x	1/32x	D	D

#### 4.13 Colocación de las Muestras

Se agregaron 100 µl de muestra a cada pozo, los análisis se realizaron por duplicado y se evaluaron tres fechas diferentes por placa. Para saber que iba en cada pozo también se anotó en un mapa de una placa de ELISA para posteriormente poder leer y evaluar los resultados. Se taparon las placas y se incubaron a temperatura ambiente por 2 horas.

#### 4.14 Anticuerpo de Detección

En seguida se realizó el lavado de las placas 4 veces y se adicionó el anticuerpo de detección a los pozos que se trabajaron a una concentración de 1 µg/ml, se agregó 100 µl por pozo e incubaron a temperatura ambiente por 2 horas.

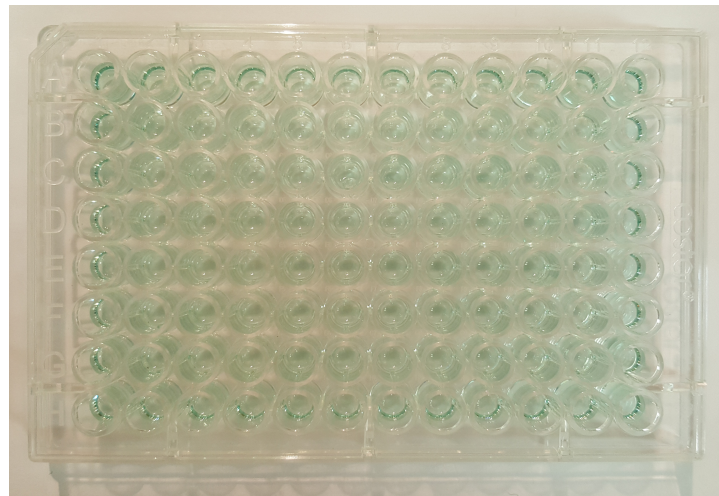
#### 4.15 Avidin Peroxidasa, ABTS y Lectura de las Placas

Nuevamente se lavaron las placas 4 veces. Se diluyeron 5.5 µl de avidin peroxidasa en 10,994.5 µl de diluyente para obtener un total de 11,000 µl o 11 ml. A cada pozo se le agregaron 100 µl de los 11 ml de avidin peroxidasa preparados y se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se volvió a lavar la placa 4 veces por última vez y se agregaron 100 µl de ABTS a cada pozo. Se incubaron a temperatura ambiente y se revisaron cada 5 minutos para observar el cambio de color, una vez que se notara el cambio entre los primeros 5 – 15 minutos se introdujeron al lector de ELISA para obtener una lectura a un espectro de 405 nm (Figura 18 y 19).





**Figura 18** Lector de ELISA



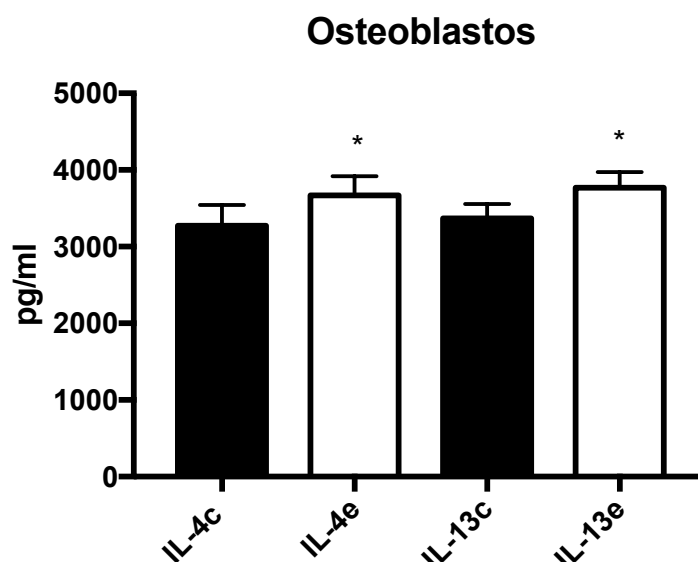
**Figura 19** Placa de ELISA

#### 4.16 Análisis Estadístico

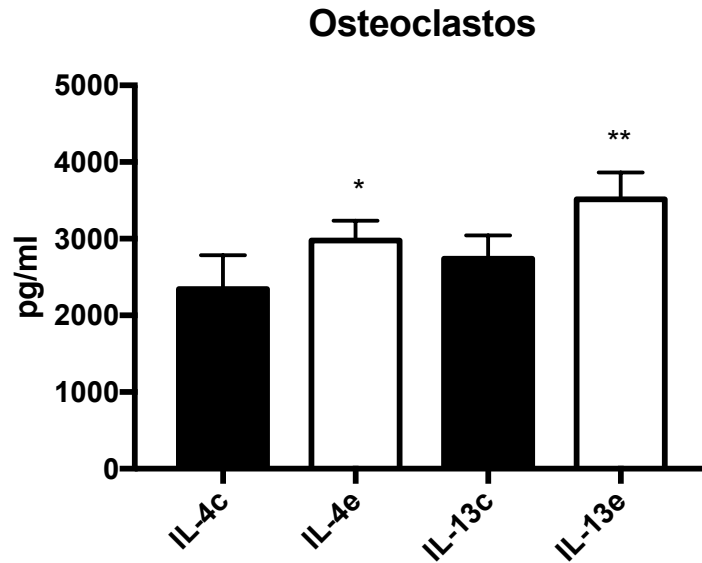
Los datos son expresados como el promedio  $\pm$  SEM. La diferencia entre los grupos control y experimental fueron determinados por la prueba estadística de U-Mann Whitney, utilizando el software Graph Pad Prism 7 (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) el nivel de significancia fue establecido a:  $P < 0.05$ .

### 5. RESULTADOS

#### 5.1 Análisis de Resultados del ELISA: Expresión de IL - 4 e IL - 13



**Grafica 1.** Producción de IL-4 e IL-13 en osteoblastos derivados del cráneo de ratón. Monocapas de osteoblastos cultivados in vitro fueron sometidos a microbivibración durante 20 minutos y el sobrenadante fue ensayado para IL-4 e IL-13 por medio de ELISA. Los resultados demostraron que el grupo experimental presentó significativamente una sobre-regulación de IL-4 ( $3535 \pm 85.97$ ) comparada con el grupo control ( $3271 \pm 78.41$ )  $*P < 0.01$ . La IL-13 en el grupo experimental presentó significativamente una sobre-regulación de ( $3750 \pm 96.98$ ) comparada con el grupo control ( $3165 \pm 53.99$ )  $*P < 0.01$ . Los resultados son presentados como el Promedio  $\pm$  SEM para 5 cultivos.



**Grafica 2.** Producción de IL-4 e IL-13 en osteoclastos derivados de células madre de la tibia del ratón Balb/c. Monocapas de osteoclastos cultivados in vitro fueron sometidos a micro-vibración durante 20 minutos y el sobrenadante fue ensayado para IL-4 e IL-13 por medio de ELISA. Los resultados demostraron que el grupo experimental presentó significativamente una sobre-regulación de IL-4 ( $2999 \pm 85.97$ ) comparada con el grupo control ( $2371 \pm 78.41$ ) \* $P < 0.01$ . La IL-13 en el grupo experimental presentó significativamente una sobre-regulación de ( $3465 \pm 96.98$ ) comparada con el grupo control ( $2856 \pm 53.99$ ) \*\* $P < 0.001$ . Los resultados son presentados como el Promedio  $\pm$  SEM para 5 cultivos.

## 6. DISCUSIÓN

El objetivo de este estudio fue el de evaluar los efectos de la micro-vibración de baja magnitud alta frecuencia a 30HZ durante 20 minutos en cultivos de células osteoblásticas y células de la médula ósea derivadas en osteoclastos para determinar si era posible estimular la producción de IL-4 e IL-13, expresión genética de las células óseas relacionadas con la remodelación ósea. Los resultados de este estudio demostraron que durante los 20 minutos de estimulación con la micro-vibración fue posible la sobre regulación de IL-4 e IL-13 estadísticamente significativa, comparada con el grupo control tanto en los osteoblastos como en las células derivadas de la médula ósea en osteoclastos. La sobre regulación de IL-4 e IL-13 ha mostrado de incrementar la expresión de Osteoprotegerina (OPG) en osteoblastos (Moreno *et al.*, 2003), dando como resultado una decodificación en la expresión de RANKL, lo cual conlleva a inhibir la diferenciación osteoclástica (Ura *et al.*, 2000). Por lo tanto la microvibración de baja magnitud, alta frecuencia a 30 Hz aplicada a cultivos *in vitro* de células osteoblásticas y osteoclásticas puede inhibir la diferenciación osteoclástica, lo cual contribuye a la remodelación del hueso, a través de una carga fisiológica que es aplicada sobre la células óseas (García-López *et al.*, 2005; García-López *et al.*, 2013), en este caso a través de la micro-vibración. La frecuencia de micro-vibración ha sido evaluada a diferentes Hertz la cual induce diferentes respuestas metabólicas (Komrakova *et al.*, 2013) por el otro lado el esqueleto normalmente en términos fisiológicos experimenta relativamente poca frecuencia (1-3 Hz) sin embargo esta expuesto a magnitudes de 2000 a 3000 micro vibraciones durante el día para mantener en homeostasis la remodelación del esqueleto, además de la participación de la hormona paratiroidea (HPT) (Lombardi *et al.*, 2011) y del estrógeno y la testosterona (Manolagas *et al.*, 2013) entre otras hormonas que contribuyen a la remodelación ósea para mantener integra la estructura del esqueleto. Por lo tanto no es claro como esta micro-vibración aplicada a los dientes durante el tratamiento de ortodoncia pudiera sobre regular o bajo regular la expresión de citocinas que contribuyen a la remodelación ósea durante el tratamiento de ortodoncia, ya que las cargas masticatorias inducen remodelación

del proceso alveolar, sin embargo la aplicación de la micro-vibración a 80Hz en pacientes con osteoporosis, contribuye a incrementar el hueso cortical (Rubin *et al.*, 1992; Rubin *et al.*, 2001). Se requieren futuros estudios para poder determinar los eventos fisiológicos con la remodelación ósea a través de la estimulación con la micro-vibración de baja magnitud, alta frecuencia a 30HZ.

## 7. CONCLUSIONES

- a) Fue posible derivar osteoblastos derivados del cráneo de ratón y osteoclastos derivados de células madres de la tibia de ratón Balb/C.
- b) Los osteoblastos y osteoclastos cultivados *in vitro* sometidos a micro-vibraciones (0.25 N; 30 Hz), mostraron una sobre regulación de la expresión de IL-4 e IL-13.
- c) Las células óseas cultivadas *in vitro* sometidas a micro-vibración producen factores solubles relacionados con la remodelación del hueso.

## 8. LIMITACIONES Y PROPUESTAS

- Realizar pruebas ELISA de citocinas e interleucinas pro-inflamatorias como RANKL, OPG, IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-7 e IL-17 presentes en el proceso de remodelación ósea.
- Comparar los resultados de las pruebas ELISA de interleucinas pro-inflamatorias con los de interleucinas anti-inflamatorias.

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alliston T. Biological Regulation of Bone Quality. *Curr Osteoporos Rep.* 2014 Sep;12(3):366-75. Citar de esta manera.
- Antibody Products & ELISA Kits: Resource Guide. (2012). *PeptoTech*, (3rd Edition), pp.32-39.
- Brightling CE, Saha S, Hollins F. Interleukin-13: prospects for new treatments. *Clin Exp Allergy.* 2010 Jan; 40(1): 42–49.
- Bull H, Murray PG, Thomas D, Fraser AM, Nelson PN. Acid Phosphatases. *Mol Pathol.* 2002 Apr;55(2):65-72.
- Caetano-Lopes J, Canhão H, Fonseca JE. Osteoblasts and Bone Formation. *Acta Reumatol Port.* 2007 Apr-Jun;32(2):103-10.
- Charles JF, Aliprantis AO. Osteoclasts: more than ‘bone eaters’. *Trends Mol Med.* 2014 Aug;20(8):449-59.
- Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008 Nov;3 Suppl 3:S131-9.
- Doherty AH, Ghalambor CK, Donahue SW. Evolutionary Physiology of Bone: Bone Metabolism in Changing Environments. *Physiology (Bethesda).* 2015 Jan;30(1):17-29.
- Dubravko P, Ravikumar A, Vishnu R, and Gakunga PT. Cyclic loading (vibration) accelerates tooth movement in orthodontic patients: A double-blind, randomized controlled trial. 2015. *Seminars in Orthodontics*, 21(3), pp. 187-194.
- Dulak J, Szade K, Szade A, Nowak W, Józkwicz A. Adult stem cells: Hopes and hypes of regenerative medicine. *Acta Biochim Pol.* 2015;62(3):329-37.
- Eriksen EF. Cellular mechanisms of bone remodeling. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010 Dec;11(4):219-27.
- Feng X, Teitelbaum SL. Osteoclasts: New Insights. *Bone Res.* 2013 Mar 29;1(1):11-26.

- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015;2015:421746.
- García-López S, Villanueva R, Meikle MC. Alterations in the synthesis of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , 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.
- Garcia-Lopez S, Meikle MC, Villanueva RE, et al. Mechanical deformation inhibits IL-10 and stimulates IL-12 production by mouse calvarial osteoblasts in vitro. *Arch Oral Biol.* 2005;50(4):449–52.
- García-López, S., Villanueva, R., and Meikle, M.C. The effects of gentle micropulse vibration on two types of murine osteoblasts. Paper presented at the *2015 Annual Session May 15-19, AAO, San Francisco, CA.*
- Hadjidakis DJ, Androulakis II. Bone Remodeling. *Ann N Y Acad Sci.* 2006 Dec;1092:385-96.
- Kamiya Biomedical Company. TRAP Staining Kit. Cat. No. KT-008. [www.Kamiyabiomedical.com/pdf/KT-008.pdf](http://www.Kamiyabiomedical.com/pdf/KT-008.pdf)
- Kau, C.H., Nguyen, J.T., English, J.D.,. Clinical Experience with the Use of Pulsatile Forces to Accelerate Treatment. 2010. *Orthodontic Practice US*, 1(1), pp.10-15.
- Komrakova M, Sehmisch S, Tezval M, et al. Identification of a vibration regime favorable for bone healing and muscle in estrogen-deficient rats. *Calcif Tissue Int.* 2013;92(6):509–20
- Lombardi G., Di Somma C., Rubino M., Faggiano A., Vuolo L., Guerra E., Contaldi P., Savastano S., Colao A. The roles of parathyroid hormone in bone remodelling:prospects for novel therapeutics. *J Endocrinol Invest* 2011;34(7):18:22.
- Manolagas SC., O'Brien CA., Almeida M. The Role of estrogen and androgen receptor in bone health and disease.*Nat Rev Endocrinol.* 2013;9(12):699-712.



- Moreno JL, Kaczmarek M, Keegan AD, Tondravi M. IL-4 suppresses osteoclast development and mature osteoclast function by a STAT6-dependent mechanism: irreversible inhibition of the differentiation program activated by RANKL. *Blood*. 2003;102(3):1078–86.
- Orton-Gibbs, S., and Kim, N.Y., 2015. Clinical Experience with the Use of Pulsatile Forces to Accelerate Treatment *Journal of clinical orthodontics: JCO*, 49(9), pp. 557-573.
- Paul WE. History of Interleukin-4. *Cytokine*. Author manuscript; available in PMC 2016 Sep 1.
- Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulosom R, Wright NA. The new stem cell biology: something for everyone. *Mol Pathol*. 2003 Apr;56(2):86-96.
- Qin Y, Guan J, Zhang C. Mesenchymal stem cells: mechanisms and role in bone regeneration. *Postgrad Med J*. 2014 Nov;90(1069):643-7.
- Raggatt LJ, Partridge NC. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J Biol Chem*. 2010 Aug 13;285(33):25103-8.
- Rubin CT, Bain SD, McLeod KJ. Suppression of the osteogenic response in the aging skeleton. *Calcif Tissue Int*. 1992;50(4):306–13.
- Rubin C, Xu G, Judex S. The anabolic activity of bone tissue, suppressed by disuse, is normalized by brief exposure to extremely low-magnitude mechanical stimuli. *FASEB J*. 2001;15(12):2225–9.
- Schaffler MB, Cheung WY, Majeska R, Kennedy O. Osteocytes: Master Orchestrators of Bone. *Calcif Tissue Int*. 2014 Jan;94(1):5-24.
- Silva-Filho JL, Caruso-Neves C, Punheiro AAS. IL-4: an important cytokine in determining the fate of T cells. *Biophys Rev*. 2014 Mar; 6(1): 111–118.
- Singh A, Mehdi AA, Srivastava RN, Verma NS. Immunoregulation of bone remodeling. *Int J Crit Illn Inj Sci*. 2012 May-Aug; 2(2): 75–81.
- Stenken JA, Poschenrieder AJ. Bioanalytical Chemistry of Cytokines- A Review. *Anal Chim Acta*. 2015 Jan 1;853:95-115.

- Ura K, Morimoto I, Watanabe K, Saito K, Yanagihara N. Interleukin (IL)-4 and IL-13 Inhibit the Differentiation of Murine Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. *Endocr J.* 2000 Jun;47(3):293-302.
- Weber-Rajek M, Mieszkowski J, Niespodziński B, Ciechanowska K. Whole-body vibration exercise in postmenopausal osteoporosis. *Prz Menopauzalny.* 2015 Mar;14(1):41-7.
- Williams AR, Hare JM. Mesenchymal stem cells: Biology, patho-physiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res.* 2011 Sep 30;109(8):923-40.
- Wojdasiewicz P, Poniatowski ŁA, Szukiewicz D. The Role of Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in the Pathogenesis of Osteoarthritis. *Mediators Inflamm.* 2014; 2014: 561459.
- Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med (Zagreb).* 2013;23(1):43-63.

### **CAPÍTULO III. INFORME NUMÉRICO NARRATIVO**

Realicé mi servicio social en el periodo comprendido del 1 de Agosto del 2016 al 31 de Julio del 2017 en el área de investigación de Ciencias Básicas del Departamento de Atención a la Salud; fui asignado al proyecto de investigación Efectos de la deformación mecánica en osteoblastos cultivados *in vitro* para lo cual mi asesor fue el Dr. Salvador García López.

Durante el periodo de servicio social realicé búsqueda de información científica relacionada con el tema de la investigación antes mencionada en diversas fuentes como bibliográficas, electrónicas (Pubmed) y publicaciones periódicas en revistas especializadas impresas.

Desarrollé trabajos de laboratorio en el Laboratorio de Biología Celular e Inmunología al cual asistí todas las semanas de Lunes a Viernes en un horario de 9:00 a 14:00 horas. Dentro de las actividades de laboratorio realicé cultivos, maduración e identificación de células óseas derivadas de ratones. También hice pruebas ELISA para identificar factores solubles de las células óseas. Todas estas son practicas necesarias para el proyecto de investigación.

Así mismo, tuve participación en el proyecto de investigación denominado Síndrome Metabólico en el cual también participa el Dr. Salvador García López. En dicho proyecto realicé actividades de toma de medidas antropométricas y recaudar e interpretar datos. Las practicas se llevaron a cabo en la escuela primaria Profesor Victoriano Guzmán y en Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez.

A continuación presento los cuadros de las actividades que realicé en el servicio social mensualmente de Agosto del 2016 – Julio del 2017.

## AGOSTO 2016

Actividad	Tipo de Actividad
Aprendizaje de los procedimientos de investigación	Aprendizaje de práctica de cultivo de células
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Solicitud de ratón Balb/C al Bioterio<ul style="list-style-type: none"><li>• Cultivo de Células</li></ul></li><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio<ul style="list-style-type: none"><li>• Fotografías</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Búsqueda de Información Científica</li><li>• Recopilación de Artículos Científicos</li></ul>

## SEPTIEMBRE 2016

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio</li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Búsqueda de Información Científica</li><li>• Recopilación de Artículos Científicos</li></ul>

## OCTUBRE 2016

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio</li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Búsqueda de Información Científica</li><li>• Recopilación de Artículos Científicos</li></ul>
Otras	<ul style="list-style-type: none"><li>• Asistencia a Congreso de Egresados UAM-Xochimilco</li></ul>

## NOVIEMBRE 2016

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio<ul style="list-style-type: none"><li>• Fotografías</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li></ul>

## DICIEMBRE 2016

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio</li><li>• Micro-Vibración de células<ul style="list-style-type: none"><li>• Ensayos ELISA</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li><li>• Recopilación y Redacción de Resultados</li></ul>

## ENERO 2017

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Solicitud de ratón Balb/C al Bioterio<ul style="list-style-type: none"><li>• Cultivo de Células</li></ul></li><li>• Cambio de medio de cultivo<ul style="list-style-type: none"><li>• Análisis en microscopio<ul style="list-style-type: none"><li>• Fotografías</li></ul></li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li></ul>
Prácticas de Apoyo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Toma de medidas antropométricas</li><li>• Captura de datos obtenidos (Excel)</li></ul>

## FEBRERO 2017

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio</li><li>• Micro-Vibración de células<ul style="list-style-type: none"><li>• Ensayos ELISA</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li><li>• Recopilación y Redacción de Resultados</li></ul>
Practicas de Apoyo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Encuesta de Alimentación</li><li>• Toma de peso y talla</li></ul>

## MARZO 2017

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio<ul style="list-style-type: none"><li>• Fotografías</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li></ul>
Practicas de Apoyo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Recopilación de Datos</li><li>• Elaboración de Consentimientos Informados</li></ul>

## ABRIL 2017

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>• Cambio de medio de cultivo</li><li>• Análisis en microscopio<ul style="list-style-type: none"><li>• Fotografías</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>• Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li></ul>
Practicas de Apoyo	<ul style="list-style-type: none"><li>• Recopilación de Datos</li><li>• Elaboración de Consentimientos Informados</li></ul>

## MAYO 2017

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>Solicitud de ratón Balb/C al Bioterio<ul style="list-style-type: none"><li>Cultivo de Células</li></ul></li><li>Cambio de medio de cultivo</li><li>Análisis en microscopio<ul style="list-style-type: none"><li>Fotografías</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li></ul>
Practicas de Apoyo	<ul style="list-style-type: none"><li>Toma de muestras de sangre</li></ul>

## JUNIO 2017

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>Cambio de medio de cultivo</li><li>Análisis en microscopio</li><li>Micro-Vibración de células<ul style="list-style-type: none"><li>Ensayos ELISA</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>Elaboración de Reporte de Investigación (Word)</li><li>Recopilación y Redacción de Resultados</li></ul>
Practicas de Apoyo	<ul style="list-style-type: none"><li>Toma de muestras de sangre</li><li>Distribución de Omega 3</li></ul>

## JULIO 2017

Actividad	Tipo de Actividad
Laboratorio	<ul style="list-style-type: none"><li>Cambio de medio de cultivo</li><li>Análisis en microscopio<ul style="list-style-type: none"><li>Prueba Trap +</li></ul></li></ul>
Investigación	<ul style="list-style-type: none"><li>Conclusión de Proyecto de Investigación (Word)</li><li>Recopilación y Redacción de Resultados</li></ul>

## **CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES**

Tras cumplir el periodo que me fue asignado para realizar mi servicio social en el área de investigación de Ciencias Básicas del Departamento de Atención a la Salud con el Dr. Salvador García López puedo concluir que ha sido una experiencia de mucho aprendizaje.

Dado al tema de mi proyecto de investigación he podido expandir mis conocimientos y profundizar en áreas en las cuales podría tener crecimiento profesional a futuro. Así mismo, al realizar practicas de laboratorio y ensayos ELISA también logré afianzar técnicas que me pudieran ser útiles en futuras investigaciones. La información que investigué y las prácticas que pude realizar me han ayudado a complementar mi educación en la institución. También este proyecto me ha ayudado a mejorar mis habilidades de investigación, algo que para esta institución es sumamente importante.

Concluyo esta etapa de mis estudios satisfecho y agradecido con los conocimientos obtenidos y con las oportunidades que la institución y mis profesores me han brindado.