

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD
XOCHIMILCO**



Casa abierta al tiempo

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE ATENCIÓN A LA SALUD

MAESTRÍA EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

TITULO

EFFECTOS DE LA MICRO-VIBRACIÓN DE BAJA INTENSIDAD-ALTA FRECUENCIA EN
OSTEOCITOS CULTIVADOS *IN VITRO* SOBRE FACTORES SOLUBLES

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS ODONTOLÓGICAS

PRESENTA

LUIS JONATHAN SEBASTIÁN GONZÁLEZ

MATRICULA: 2192800625

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA: MSc. ROSINA EUGENIA VILLANUEVA ARRIAGA

ASESORA: DRA. NELLY MOLINA FRECHERO

ASESORA: DRA. ELIZABETH HERNÁNDEZ PÉREZ

AGOSTO, 2021

La Maestría en Ciencias Odontológicas de la
Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el
Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del
CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo a través del
convenio PFP 006077



CONACYT

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

**Programa Nacional de
Posgrados de Calidad, PNPC**

El Jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Xochimilco aprobó la tesis que presentó

LUIS JONATHAN SEBASTIÁN GONZÁLEZ

FECHA: 16 MARZO 2022

HONORABLE JURADO DE EXAMEN:

PRESIDENTA: MSc. ROSINA EUGENIA VILLANUEVA ARRIAGA

SECRETARIA: DRA. NELLY MOLINA FRECHERO

SINODALES: DR. ALFREDO NEVÁREZ RASCÓN

DR. VÍCTOR HUGO TORAL RIZO

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Mis más profundo agradecimientos a la Dra. Nelly Molina Frechero coordinadora de la Maestría en Ciencias Odontológicas por las facilidades durante la realización de este proyecto. Así mismo a mi tutora Dra. Rosina Eugenia Villanueva Arriaga, por su apoyo científico, tiempo y dedicación brindado. A la Dra. Elizabeth Hernández Pérez y Dr. Salvador García López por su asesoramiento e invaluable ayuda.

De misma forma a la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco junto con el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) autorizando el proyecto con número CVU 1014934 por su valioso soporte en la realización de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Agradezco a Dios por la vida permitida y cada día por ser un regalo maravilloso.

A mi madre Eulalia por su valentía, dedicación y buenos ejemplos hacia nosotros sus hijos, los cuales son los cimientos de los que somos ahora.

A mi cuñado Daniel y hermana Miriam por ser una inspiración y sobre todo el pilar más importante en mi educación, saben que los aprecio y quiero mucho.

A James por estar siempre a mi lado y ser mi amigo más sincero.

A Yulz por ser mi compañera en este viaje, alentándome a continuar cada día.

No quiero olvidarme de mis compañeros y Docentes de la Maestría, que transitaron esta carrera junto a mí, gracias.

ÍNDICE

TABLA DE CONTENIDOS.....	1
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS.....	2
1. RESUMEN.....	4
2. ABSTRACT	5
3. INTRODUCCIÓN.....	6
4. ANTECEDENTES.....	7
4.1 Células que actúan en la remodelación ósea.....	7
4.2 Factores celulares y moleculares que influyen en la remodelación ósea	9
4.3 Osteoclastogénesis	10
4.4 Resorción ósea fisiológica	10
4.5 Resorción ósea patológica.....	11
4.6 Citocinas que intervienen en la regulación de la resorción ósea	12
4.7 Citocinas antiinflamatorias	12
4.8 Citocinas proinflamatorias.....	14
4.9 Vibración en el tejido óseo.....	16
4.10 Osteocitos orquestadores de la remodelación ósea.....	18
4.11 AcceleDent	19
4.12 Vibración aplicada en pacientes con osteoporosis.....	19
4.13 Vibración aplicada en pacientes con ortodoncia	19
5 JUSTIFICACIÓN.....	21
6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	21
7 OBJETIVOS	22
8 HIPÓTESIS.....	22
9 METODOLOGÍA	23
10 RESULTADOS	26
11 DISCUSIÓN.....	32
12 CONCLUSIÓN.....	37
13 REFERENCIAS	38
14 ANEXOS.....	47

TABLA DE CONTENIDOS

Fig.1 Diagrama de flujo PRISMA de selección de estudios.

Fig. 2 (a y b) Resumen de la calidad metodológica de los estudios y riesgo de sesgo.

Tabla 1. Resumen de los estudios incluidos.

Tabla 2. Cuestionario JADAD modificado para la evaluación de riesgo de sesgo.

Tabla 3. Evaluación de los resultados obtenidos en ensayos con osteocitos

Tabla 4. Evaluación de los resultados obtenidos en ensayos con otro tipo de células óseas.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

‰: Porcentaje

µm: Micrómetros

ALP: Fosfatasa Alcalina

ATP: Adenosín Trifosfato

C-fos: Protooncogén

CFU-GM: Factor de Crecimiento Unidad Formadora Granulocito-Monocito

COX-2: Ciclooxygenasa

CSF-1: Factor estimulante de colonia Macrófagos 1

CSF-M: Factor Estimulante de macrófagos

CX43: Conexina 43

DMO: Mayor Densidad Ósea

DMP1: Fosfoproteína Acida de Matriz de Dentina 1

E11/gp38: Glicoproteína Transmembrana

ECM: Matriz Extracelular

Hz: Hertz

IFN-γ: Interferón Gamma

IL- Interleucina

LMHFV: Vibración de Baja Frecuencia-Alta Magnitud

MC3T3-E1: Línea Celular de Osteoblastos

MEPE: Fosfoglicoproteína Extracelular Matricial

MLO-Y4: Línea Celular de Osteocitos

MMP: Metaloproteinasas

MSC: Células Madre Mesenquimales

MTI-MMP: Metaloproteinasa de Matriz Tipo 1 de Membrana

NFATC1: Factor Nuclear de las Células T Activadas al Citoplasma 1

NF-KB: Factor Nuclear K β

NK: Natural Killer

NO: Óxido Nitroso

OC: Osteocalcina

OPG: Osteoprotegerinas

OPN: Osteopontina

PGE-2: Prostaglandinas

PHEX: Gen Regulador del Fosfato con Homologías con la Endopeptidasa en el Cromosoma x

PTH: Hormona Paratiroidea

RANK: Receptor Activador del Factor Nuclear K β

RANKL: Ligando del Receptor Asociado al Factor Nuclear Kappa β

RAW246.7: Línea Celular de Osteoclastos

RUNX2 o CBFA1: Factor de Transcripción Clave Asociado con la Diferenciación de Osteoblastos

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante Beta

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral Alfa

TRAF6: Proteína Quinasa Factor 6

1. RESUMEN

El hueso es un tejido dinámico que detecta y se adapta a cargas mecánicas la reabsorción y formación ósea tienen un papel importante en el crecimiento y mantenimiento esquelético, dentro del microambiente celular óseo las células interactúan sinérgicamente detectando estímulos mecánicos alterando la expresión de genes y orquestando la remodelación ósea. El propósito de este estudio fue realizar una revisión sistemática de los efectos de la micro-vibración en células óseas cultivadas *in vitro* sobre la síntesis de factores solubles que interviene en la remodelación ósea. Se realizó una búsqueda bibliográfica con osteocitos y otras células óseas *in vitro*, estableciendo la estrategia PICO, utilizando palabras clave como: “osteocitos”, “micro-vibración”, “remodelación”, “osteoclastogénesis”, “citocinas”, “osteoblastos”, implementando los criterios de inclusión y exclusión para la selección de los artículos, se estructuró por medio de PRISMA y la captación de datos finales por medio del método Jadad y Cochrane evaluando el riesgo de sesgo de cada uno de los artículos. Se incluyeron 11 artículos con alta calidad metodológica, la mayoría de los experimentos *in vitro* demostraron que la micro-vibración tuvo un aumento estadísticamente significativo capaz de mejorar la proliferación y diferenciación de las células madre mesenquimales (MSC), en osteoblastos (MC3T3-E1) sobre rēgulo la expresión de proteínas para inducir osteogénesis, los osteocitos (MLO-Y4) aumentaron la expresión de genes tales como la osteoprotegerinas (OPG), prostaglandinas (PGE₂) y óxido nítrico (NO) alterando y regulando los factores solubles (citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas) de las demás células, además de mostrar una disminución en la actividad de los osteoclastos (RAW246.7) en la resorción ósea. La micro-vibración influye en la remodelación ósea, la capacidad de las células parece responder a los estímulos interviniendo sobre la diferenciación y proliferación osteogénica e inhibición de la osteoclastogénesis.

Palabras claves: osteocitos, micro-vibración, citocinas, Acceledent™, osteoclastogénesis, remodelación ósea.

2. ABSTRACT

Bone is a dynamic tissue that detect and adapt to mechanical loads. Bone resorption and formation play a key role in skeletal growth and maintenance. Within the bone cell microenvironment, cells interact synergistically, detecting mechanical stimuli, altering gene expression, and orchestrating bone remodeling. The purpose of this study was to perform a systematic review of the effects of micro-vibration in cultured bone cells in vitro on the synthesis of soluble factors involved in bone remodeling. A bibliographic search was carried out with osteocytes and other bone cells in vitro, establishing the PICO strategy, using keywords such as: "osteocytes", "micro-vibration", "remodeling", "osteoclastogénesis", "cytokines", "osteoblasts", implementing the inclusion and exclusion criteria for the selection of the articles, it was structured through PRISMA and the final data collection through the Jadad and Cochrane method, evaluating the risk of bias of each of the articles. 11 articles with high methodological quality were included, most of the in vitro experiments showed that micro-vibration had a statistically significant increase capable of improving the proliferation and differentiation of mesenchymal stem cells (MSC), in osteoblasts (MC3T3-E1) On regulation of protein expression to induce osteogenesis, osteocytes (MLO-Y4) increased the expression of genes such as osteoprotegerins (OPG), prostaglandins (PGE2) and nitric oxide (NO), altering and regulating soluble factors (cytokines, factors of growth and chemokines) of the other cells, in addition to showing a decrease in the activity of osteoclasts (RAW246.7) in bone resorption. Micro-vibration influences bone remodeling, the capacity of cells to respond to stimuli by intervening on osteogenic differentiation and proliferation and inhibition of osteoclastogenesis.

Keywords: osteocytes, micro-vibration, cytokines, AcceledeTM, osteoclastogénesis, bone remodeling.

3. INTRODUCCIÓN

El hueso es un importante reservorio de minerales y moléculas orgánicas. Es un tejido dinámico que detecta y se adapta a cargas mecánicas, la reabsorción y formación ósea juegan un papel importante en el crecimiento y mantenimiento óseo. Los osteoblastos y osteocitos son células que participan en el desarrollo óseo, derivan de las células madre mesenquimales, mientras que los osteoclastos del linaje de células madre hematopoyéticas actúan como orquestadores de la reabsorción ósea. Dentro del microambiente estas células sintetizan y secretan moléculas de señalización autocrinas y paracrinas, como factores de crecimiento, citocinas y quimiocinas para mantener la remodelación y arquitectura del hueso. La vibración de baja frecuencia-alta magnitud (LMHFV) es una forma de intervención no invasiva y biofísica que proporciona cargas cíclicas, además, es anabólica al hueso *in vivo*, aplicando LMHFV puede actuar promoviendo la formación ósea, esta se dirige a procesos activados por carga mecánica directa, a las células óseas, lo que provoca diferenciación osteogénica. Se ha demostrado que los efectos vibratorios en los osteocitos cultivados *in vitro* disminuyen la expresión de RANKL formador de osteoclastos. Se ha propuesto que aplicar fuerzas vibratorias de baja frecuencia (30Hz) estimula la diferenciación y maduración celular, lo que lleva a una remodelación ósea, por lo que en ortodoncia se introdujeron diferentes dispositivos como el “Acceledent” que pretende acelerar el movimiento más rápido de los dientes.

4. ANTECEDENTES

El esqueleto representa aproximadamente el 15% del peso total del cuerpo humano, proporciona soporte mecánico para la estatura y la locomoción, además de protección para los órganos vitales, también es un reservorio importante para una serie de minerales que incluyen calcio, fosfato, magnesio y moléculas orgánicas, incluidas las fibras de colágeno y la matriz amorfa¹, es un tejido dinámico que detecta y se adapta a la carga mecánica, la reabsorción ósea y la formación de hueso juegan un papel importante durante el crecimiento y el mantenimiento del tejido esquelético a través de una señalización intercelular compleja².

4.1 Células que actúan en la remodelación ósea

En el hueso coexisten varios tipos de células, que se hallan dentro del propio tejido óseo o en el estroma conjuntivo de la médula ósea rico en células mesenquimales pluripotenciales indiferenciadas (MSC), se conoce que estas pueden dar origen a cinco tipos de estirpes celulares distintas: fibroblastos, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos³.

Osteoblastos (OB)

Los osteoblastos diferenciados de las MSC son responsables de la síntesis de colágeno tipo I y del depósito de la matriz mineralizada dada por la expresión de la enzima fosfatasa alcalina (ALP) para facilitar la formación de hueso. Emiten procesos citoplasmáticos hacia la matriz, que comunican con la red de osteocitos y osteoblastos vecinos a través de proteínas transmembrana o integrinas, que actúan de enlace entre células o entre una célula y la matriz extracelular (ECM), permitiendo el paso de mensajeros como calcio, citocinas o prostaglandinas, la conexión intercelular está a cargo de la conexina 43 (Cx43)⁴. Los osteoblastos maduros aparecen como única fila de células cuboidales con núcleo basal redondo. En este punto los osteoblastos envejecidos se enfrentan a tres destinos posibles: (1) sufrir apoptosis, (2) dar paso a osteocito o (3) convertirse en células de revestimiento óseo⁵.

Osteocitos (OS)

Los osteocitos son los principales mecanosensores que responden a la tensión mecánica regulan la formación y resorción ósea traduciendo la fuerza en señales bioquímicas mediante señalización a otras células óseas efectoras a través de factores solubles autocrinos y paracrinos, descendientes de los osteoblastos, los osteocitos constituyen 90-95% de todas las células óseas del esqueleto. Juegan un papel importante en el control directo de la diferenciación y la actividad de los osteoclastos u osteoblastos, mediante señales anabólicas que se liberan rápidamente incluyendo óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGE), y otras moléculas pequeñas como el ATP para inducir activación de los osteoblastos⁶. Durante la osteogénesis, los osteoblastos depositan osteoides y se transforman en osteocitos incrustados en una matriz ósea mineralizada⁷. Uno de los primeros cambios que tiene lugar en la célula de inclusión es la formación de procesos dendríticos sufriendo una transformación de célula poligonal que es seguida por dendritas hacia el frente de la mineralización, se extienden al espacio vascular o la superficie ósea, además el sistema lacunocanalicular está muy cerca del suministro vascular por lo que el oxígeno y los nutrientes alcanzan a los osteocitos⁸. Los primeros datos respaldan que los osteocitos pueden enviar señales de resorción ósea⁹.

Osteoclastos (OC)

Son células de resorción ósea originadas en el mesodermo provienen del linaje hematopoyético o mesenquimal, siendo posible su diferenciación a partir de células de medula ósea o células mononucleares de sangre periférica, las cuales tienen la capacidad de servir como progenitores del linaje osteoclástico¹⁰. Se requiere un precursor inicial pluripotencial, el cual pasa por mínimo cuatro estadios previos, antes de convertirse en un osteoclasto enzimáticamente activo. En tal sentido, la célula madre pluripotencial es estimulada por el factor de crecimiento unidad formadora de colonia granulocito-monocito (CFU-GM), esta se compromete con un linaje que es común para macrófagos y osteoclastos, al hacerlo con el factor

estimulante de colonias macrófago-1 (CSF-1) se decide por el linaje osteoclastico, diferenciándose hacia preosteoclasto. De aquí en adelante se requiere la estimulación continua del factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-M) para alcanzar un estadio maduro, el cual se completa solamente, en presencia del ligando del receptor asociado al factor nuclear kappa β (RANKL). Un estadio intermedio entre preosteoclasto y osteoclasto multinucleado no activado se produce por fusión de células, formándose conglomerados multinucleados que expresan por primera vez marcadores específicos de osteoclasto; el proceso continúa hacia la maduración de la célula requiriendo tanto de RANKL como de CSF-M¹¹, para inducir la proliferación y activación de osteoclastos a través del receptor activador del factor nuclear κ B (RANK)¹².

Dependiendo de la importancia en la osteoclastogénesis, las vías para la diferenciación de precursores hematopoyéticos a osteoclastos maduros se pueden dividir en dos categorías: canónicas y no canónicas¹³.

Dentro del nicho del microambiente, los osteoblastos, osteocitos y osteoclastos sintetizan y secretan moléculas de señalización paracrinas, incluidos factores locales (Factores de crecimiento y citocinas) y sistémicos (calcitonina y estrógenos) para mantener la remodelación y la arquitectura del esqueleto¹⁴.

4.2 Factores celulares y moleculares que influyen en la remodelación ósea

A nivel endócrino y molecular varios factores pueden influir en el proceso de remodelación ósea. Los osteoblastos productores de matriz expresan la proteína RUNX2 también denominada Cbfa1 y Osterix, necesarios para la diferenciación de osteoblastos, seguidos de fosfatasa alcalina (ALP) y colágeno, necesarios para la producción de osteoides. La osteocalcina (OC) proteína no colágena es producida por el osteoblasto tardío cuya función es la fijación del calcio y continúa siendo expresada por los osteocitos. Por algún mecanismo desconocido, algunas células designadas comienzan a incrustarse en el osteoide y comienzan a extender proyecciones dendríticas, manteniendo conexiones entre células y las ya incrustadas en la superficie del hueso⁹. Determinar los marcadores genéticos para osteocitos es difícil debido al número relativamente bajo de genes específicos

conocidos. Sin embargo, se caracteriza por las moléculas como E11 / gp38 y MT1-MMP que parecen desempeñar un papel en la formación de procesos dendríticos/canalículos¹⁵, mientras que moléculas como la destrina y CapG regulan el citoesqueleto. PHEX, MEPE y DMP-1 regulan la biomineralización y el metabolismo mineral¹⁶.

4.3 Osteoclastogénesis

Respecto a la osteoclastogénesis actualmente se sabe que los osteoblastos son fundamentales para la formación de osteoclastos. Los conocimientos actuales acerca de la regulación de la osteoclastogénesis se basan en la existencia de 3 moléculas clave: como la osteoprotegerina (OPG) miembro de la familia de receptores de factor de necrosis tumoral (TNF) y RANKL proteínas situadas en la superficie y sintetizadas por osteoblastos y linfocitos T, además del RANK situado en la membrana de osteoclastos⁴.

Si bien los osteoblastos y los condrocitos pueden producir RANKL, son los osteocitos, dentro de la matriz ósea, los que perciben los cambios en la carga y el microdaño que se cree estimulan la osteoclastogénesis⁸.

4.4 Resorción ósea fisiológica

El polipéptido RANKL, se expresa en múltiples tejidos incluidos los músculos esqueléticos, órganos inmunes, tejidos vasculares y glándulas mamarias, donde ejerce una función fisiológica o patológica¹⁷. El ciclo de remodelación está estrictamente regulado para lograr una resorción y formación equilibrada, la interacción entre RANKL/RANK produce una activación de diferenciación de la actividad osteoclástica aumentando la resorción⁴. Se requiere una concentración permisiva de M-CSF que se expresa en osteocitos y osteoblastos estimulando la expresión RANK, antes de la acción con RANKL, la unión de estos dos induce moléculas de señalización que incluyen proteínas quinasa, factor 6 (TRAF 6) asociado al receptor del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), factor nuclear - κ B (NF- κ B) y C-fos la última instancia para la activación de factores de transcripción, factor nuclear de células T activadas 1 (NFATC1) esto para regular la expresión de los genes de los osteoclastos.

La OPG secretada por los osteoblastos y osteocitos es capaz de inhibir la resorción osteoclástica uniéndose a RANKL evitando su unión a RANK¹⁸. Mientras que la esclerostina (codificada por producto proteico del gen Sost), un antagonista de la señalización de Wnt/ B-catenina. Es una proteína específica secretada por los osteocitos y sirve como regulador principal de la formación e inhibición de hueso¹⁹.

Ciertas hormonas y citocinas también pueden influir en regular la densidad ósea. Las hormonas, incluidos el estrógeno, la hormona paratiroidea (PTH) y el 1,25-dihidroxicolecalciferol (vitamina D3), regulan la actividad de las células óseas y controlan el equilibrio entre la resorción y la formación²⁰.

La PTH es una hormona sintetizada y secretada por la glándula paratiroidea su función principal es mantener la homeostasis del calcio en la sangre, además de regular la masa ósea de manera endocrina, varios efectos de la PTH sobre la formación de osteoclastos están mediados a través de los osteoblastos por la estimulación de RANKL y la inhibición de la expresión de ARNm de OPG. Mientras que la vitamina D3 (1 α , 25 (OH) 2 D 3), es esencial para el desarrollo normal y el mantenimiento del esqueleto, la enzima CYP227B1, que convierte 25D en la forma activa 1,25D promueve la proliferación y maduración del osteoblasto en humanos *in vitro*. Los estrógenos atenúan la osteoclastogénesis y estimulan la apoptosis de los osteoclastos²¹.

4.5 Resorción ósea patológica

La evidencia existente sugiere que varias citocinas juegan un papel importante en la resorción ósea fisiológica y la destrucción ósea patológica, como la artritis reumatoide, enfermedades periodontales y osteoporosis postmenopáusica, siendo afectadas por la inflamación, estudios recientes han demostrado que las citocinas pueden sustituir a RANKL para promover la diferenciación y función de los osteoclastos²², las quimiocinas son moléculas de unión a heparina homologas con una masa molecular de 8 a 12 kDa, en la osteoinmunología las quimiocinas en las células esqueléticas tienen la función de regular la remodelación ósea, junto con el sistema inmunológico adaptativo, controlando la migración, la localización y la función de las células inmunitarias durante la inflamación²³.

4.6 Citocinas que intervienen en la regulación de la resorción ósea

Además de OPG, el principal regulador negativo para la señalización de RANKL, diversas moléculas como el estrógeno y mediadores relacionados con el sistema inmune, incluidos IL-4, IL-13, IL-10, IL-18, IFN- γ ²⁴, actúan como factores osteoprotectores contra la destrucción ósea excesiva. A través de diferentes mecanismos, como interferir con una mayor expresión o señalización de RANKL, aumentado la expresión de OPG o inducir apoptosis de osteoclastos²⁵.

4.7 Citocinas antiinflamatorias

IL-4

Es una citocina Th2, pleiotrópica y es producida por las células T, activadas por antígenos juegan un papel importante en las respuestas inflamatoria e inmune, regula el crecimiento, la actividad y la supervivencia del linaje linfoide, se ha informado que suprime a la IL-17, el RANKL y la resorción ósea. Inhibiendo la diferenciación de osteoclastos inducidos por RANKL²⁶.

IL-10

Es una potente citocina antiinflamatoria, producida por los linfocitos T y B y células del linaje mieloide, suprime las repuestas inmunoproliferativas e inflamatorias de tal manera que puede regular negativamente la síntesis de citocinas y quimiocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6 y TNF- α Xu y cols. Mostraron que IL-10 tenía efectos inhibitorios sobre la osteoclastogénesis, las pruebas *in vitro* mostraron que puede inhibir la osteoclastogénesis al reducir la expresión del factor nuclear de las células T activadas citoplasmáticas 1 (NFATc1)²², inducida por RANKL encontrando un aumento de la expresión de OPG debido a la IL-10²⁵.

IL-13

Es una citocina secretada por las células T activadas que modulan el crecimiento y la función de varios tipos de células incluidas los monocitos y linfocitos B, suprime la producción de varias citocinas inflamatorias incluidas IL-1, IL-6 y TNF- α . Se observaron los efectos de la resorción ósea y la síntesis de PGE en células osteoblásticas *in vitro*. Al igual que la IL-4, la IL-13 anuló la actividad de reabsorción

ósea inducida por IL-1 en cultivos utilizando huesos largos de ratones fetales, tanto la IL-13 como la IL-4 suprimieron marcadamente la producción de PGE, mostrando que actúa como un regulador negativo ya que inhiben la resorción al suprimir la síntesis de PGE dependiente de la COX-2 en los osteoblastos²⁷.

IL-18

La interleucina 18 secretada a través de los macrófagos puede regular la diferenciación de Th1 y la producción de IFN- γ , siendo un inhibidor de la osteoclastogénesis mediada por el TNF- α ²⁸.

Interferón gamma (INF- γ)

El INF- γ el único de tipo II, es producto de células inmunitarias innatas y las células Th1. Tiene un papel dual en los osteoclastos ya que datos recientes sugieren que el IFN- γ no sólo puede inhibir directamente la diferenciación de osteoclastos, sino que también puede promover indirectamente la osteoclastogénesis al estimular la activación de las células T y la secreción de factores osteoclastogénicos RANKL Y TNF- α ²⁹. Este también incluye la promoción de la diferenciación de los osteoblastos y la inhibición de la formación de los adipocitos. El INF- γ puede activar a macrófagos, pero los macrófagos pueden secretar IL-18 para regular la producción de IFN- γ . Se ha demostrado que la IL-23 activa los osteoclastos. La adición de IL-23 a las células del estroma de la médula ósea condujo a una mayor diferenciación hacia el linaje de osteoblastos³⁰.

Curiosamente, algunas de las citocinas y factores de crecimiento, como IL-7, IL-12, IL-23, IL-6 y el factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), han demostrado propiedades osteoclásticas y antiosteoclásticas duales dependiendo del estado fisiopatológico del hueso *in vivo*³¹ o *in vitro*, se demostró que este doble efecto depende de la densidad y la etapa de diferenciación de la población de osteoclastos. Durante la remodelación ósea patológica asociada a infección, inflamación o malignidad, las células dentro del esqueleto como los linfocitos T y B activados, los fibroblastos sinoviales, osteoclastos, células endoteliales y células cancerosas juegan un papel importante en la expresión de RANKL mejorándolo a través de

mecanismos directos o paracrinos; estas células pueden expresar directamente RANKL pudiendo estar en forma soluble mejorando la expresión de altos niveles a través de la producción de factores pro-osteoclastogénicos y citocinas como TNF, IL-17, IL-1²⁴.

Uno de los desarrollos más significativos en la biología del tejido conectivo durante la década de 1980 fue el hallazgo de que las citocinas³² como IL-1, IL-6 Y el TNF, tienen una importancia en la pérdida ósea inflamatoria del periodonto³³.

4.8 Citocinas proinflamatorias

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

Promueve la homeostasis ósea al aumentar la producción de RANKL y M-CSF a partir de osteoblastos y células estromales, aumentando la diferenciación en osteoclastos independientemente de la señalización de RANKL/RANK³⁴. Además, TNF- α y RANKL elevan sinérgicamente la expresión de RANK, este efecto del TNF- α está estrechamente relacionado con otras citocinas inflamatorias³⁵.

IL-1 e IL-6

Se ha demostrado que los receptores en las citocinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6, y TNF- α pueden estimular la osteoclastogénesis y sustituir a RANKL para promover la diferenciación y función de los osteoclastos. La deficiencia de estrógenos produce un aumento de IL-1, IL-6 y TNF α , lo que lleva a una mayor expresión de RANKL y a un aumento de la osteoclastogénesis y la resorción ósea¹³.

IL-12

La IL-12 es una citocina inflamatoria reguladora integral de la respuesta inmune promoviendo los linfocitos Th1 que poseen una acción antiosteoclastogénica, es producida principalmente por macrófagos y células dendríticas, se ha demostrado que induce potentemente la producción de IFN- γ por las células T y NK, desempeña un papel inhibitor en la osteoclastogénesis, induce la apoptosis por interacciones entre FasL inducida por IL-12 y Fas inducida por TNF- α en osteoclastos²⁵.

IL-17

Se expresa predominantemente por las células Th17. Un tipo específico de células T auxiliares humanas, estas citocinas juegan un papel crucial en la inflamación y el desarrollo de enfermedades autoinmunes. Existe evidencia que la IL-17 induce la expresión de RANKL y citocinas proinflamatorias como IL-1 y TNF- α ³⁶.

IL-23

Uno de los estímulos más importantes para la síntesis de IL-17 es la IL-23 producida por las células detriticas y macrófagos activados. La IL-23 está implicada en enfermedades inflamatorias asociada a la IL-17, juega un papel crítico en el control de la pérdida ósea inflamatoria. Un trabajo reciente sugiere que la osteoclastogénesis es promovida por la IL-23 e inhibida por un anticuerpo anti-IL23. Por el contrario, otro estudio muestra la inhibición indirecta de la diferenciación de osteoclastos por IL-23 *in vitro*, bajo condiciones fisiológicas, IL-23 promueve una mayor masa ósea en huesos largos al limitar la resorción ósea cerca de la placa de crecimiento *in vivo*³⁷.

Metaloproteinasas (MMP)

Las interacciones entre las citocinas inflamatorias de señalización específica y las células eventuales no residentes (como leucocitos polimorfonucleares y el linaje de monocitos y macrófagos) requiere de remodelación. Las MMP, son una familia endopeptidasas dependientes del Zinc, son enzimas de degradación o reabsorción de los componentes de la matriz extracelular (ECM). Los blancos de MMP incluyen otras proteasas, inhibidores de proteasas, factores de coagulación, moléculas quimiotácticas, factores de crecimiento latentes, factor de crecimiento de proteínas de unión, receptores de la superficie celular y moléculas de adhesión celular. Particularmente la MMP-2 juega un papel en el desarrollo embrionario óseo, reparación de tejidos y tumorigénesis mientras que la MMP-7 estimula la diferenciación ósea y la degradación de la ECM, otra como la MMP-9 está involucrada en la remodelación ósea basada en osteoclastos, por el contrario, los TIMP son responsables de controlar la descomposición la ECM modulando negativamente las MMP³⁸.

En 1892, el anatomista y cirujano Julius Wolff postuló que la remodelación ósea no solo está influenciada por factores biológicos, sino que también está bajo un estricto control mecánico para una adaptación más eficiente a las situaciones de carga cambiante. Frost (1987) instó que diferentes rangos de carga biomecánica provocaron la formación o reabsorción ósea^{39,20}.

Después del evento inicial de mecanotransducción en la membrana celular, los estímulos mecánicos parecen influir en la remodelación óseas por su capacidad para regular la síntesis y/o acción de las citocinas³².

4.9 Vibración en el tejido óseo

Las fuerzas mecánicas pueden afectar la formación y reparación ósea mediante la regulación y diferenciación de las células óseas osteoprogenitoras⁴⁰. Recientemente, las vibraciones de baja magnitud (LM; <1 g, donde $g = 9.98 \text{ m / s}^2$), alta frecuencias (HF; 20-90 HZ) han ganado interés a medida que los estudios muestran que dicha señal mecánica puede influir positivamente en la homeostasis esquelética⁴¹ aumentando la diferenciación de osteoblastos, la síntesis de matriz y la mineralización *in vitro*⁴².

La LMHFV es una forma de intervención, no farmacológica, no invasiva y biofísica que proporciona cargas cíclicas. Se descubrió que la LMHFV, cuando se aplica a todo el cuerpo de los sujetos, es anabólico al hueso *in vivo*, lo que puede actuar promoviendo tanto la formación, morfología y resistencia ósea, así como disminuir la resorción. Se confirmó clínicamente a la LMHFV como un posible enfoque terapéutico para la osteoporosis. Pero aún sus efectos anabólicos *in vitro* no son del todo claros mediante la regulación y diferenciación⁴³. De acuerdo con ISO-2631, la exposición a vibraciones de baja intensidad (LIV) inducida a 0.3g a 30Hz se consideraría segura⁴⁴.

Estudios en animales mostraron que la LMHF estimuló una repuesta anabólica tanto en la carga de peso y hueso que no soporta peso. Además, fue capaz de rescatar a ratones de la osteoporosis inducida por ovariectomía disminuyendo la actividad de los osteoclastos en el esqueleto, mostrando evidencia del potencial antiresortivo. En seres humanos también mostró una respuesta el tratamiento con

LMFH ya que las mujeres posmenopáusicas tratadas con estimulación por vibración ganaron una mayor densidad ósea (DMO) en la cadera y columna vertebral, los niños con parálisis cerebral, una condición incapacitante, también acumularon una DMO más alta en hueso trabecular de regiones tibial y espinal después de 6 meses de intervención vibratoria⁴⁵.

El proceso de adaptación mecánica requiere que las células sean capaces de detectar señales mecánicas y transformarlas en señales biológicas, fenómeno conocido como mecanotransducción, se considera que los osteocitos son las principales células encargadas de esta actividad ya que se encuentran profundamente enterradas en la matriz ósea, esto provoca que estas células puedan verse expuestas a un amplio rango de estímulos que pueden incluir tensión, cizallamiento, cambios de presión o flujo de fluidos⁴⁶.

La capacidad de las células óseas para percibir las señales mecánicas en su entorno mineralizado requiere la presencia de mecano-receptores en otras palabras moléculas, complejos proteicos o estructuras biológicas capaces de detectar cambios en las diferentes fuerzas. Entre los elementos que se han postulado como responsables se encuentran diferentes integrinas, adhesiones focales, estructuras ciliares y diferentes proteínas de membrana⁴⁷. Del mismo modo, los canales sensibles a estímulos físicos, como canales de calcio o las conexinas son fundamentales en la recepción y posterior transducción de la señal permitiendo la entrada o salida de diferentes factores encargados de mediar la respuesta celular al estrés físico⁴⁸. Recientemente también se ha sugerido que el citoesqueleto, que conecta el interior celular con el entorno extracelular, puede ser un elemento crítico a la hora de determinar cómo los osteocitos sienten estas fuerzas⁴⁹.

La terapia de vibración se dirige a procesos activados por carga mecánica directa, en osteoblastos, osteocitos, miocitos y las MSC. Coadyuvando en la diferenciación osteogénica mientras restringe el compromiso adipogénico de MSC. Aunque se sabe poco sobre los efectos, en osteocitos incrustados en el tejido mineralizado, la vibración en cultivos de osteocitos *in vitro* disminuyó la expresión de RANKL formador de osteoclastos, y aumentó la comunicación celular⁵⁰.

4.10 Osteocitos orquestadores de la remodelación ósea

Está demostrado que el proceso de adaptación del hueso a las fuerzas mecánicas es orquestado por los osteocitos, siendo células más abundantes en el hueso, ocupan el tejido óseo a través de una red llena de líquido compuesta de cavidades (denominadas lagunas) que albergan los cuerpos celulares, y se interconectan entre sí por medio de proyecciones celulares que se ejecutan a través de canales estrechos (denominados canalículos). Los osteocitos parecen estar situados para detectar la carga mecánica y enviar señales a las células efectoras en la superficie del hueso, osteoblastos y osteoclastos, que llevan a cabo la formación y resorción del hueso, respectivamente, encontrado que los osteocitos se comunican con las células efectoras a través de uniones gap y factores solubles, y dicha comunicación está regulada mecánicamente. En particular, el esfuerzo cortante inducido por el flujo de fluido estimuló la producción osteocítica de factores solubles antiosteoclásticos⁴⁵.

Se sabe que las moléculas de señalización como NO, PGE₂ y ATP son liberados por los osteocitos en respuesta a estímulos externos como la tensión mecánica, muchas de ellas teniendo efectos sobre los osteoblastos¹⁵ una de las primeras moléculas liberadas es el NO, que inhibe la reabsorción, promueve la formación ósea y también puede reducir la apoptosis de los osteocitos^{51,52}. Las PGE₂ que se libera en las células óseas aumentan con la estimulación del flujo de fluidos y median las respuestas aguas abajo tales como mayor expresión de proteínas de unión gap, Cx43 y disminución de la expresión de OPG⁴⁵.

Un medio eficaz para la coordinación de las funciones celulares es mediante la comunicación directa de señales de célula a célula a través de uniones gap, son canales intercelulares formados por el apareamiento de una matriz hexámerica de monómeros de conexina o hemicanal en la membrana plasmática, con una conexión similar en la membrana de una célula adyacente formando así un poro acuoso entre las dos células, permitiendo el intercambio intercelular de iones, moléculas pequeñas y segundos mensajeros. La conexina 43 es la proteína de unión más abundante expresada en el hueso, las uniones gap compuestas de Cx43 permiten

la difusión de moléculas de menos de ~1200 Da, expresada por osteoblastos y osteocitos⁵³.

4.11 AcceleDent

El dispositivo AcceleDent (OrthoAccel Technologies, Inc. Houston, TX) se introdujo en la especialidad de ortodoncia para reducir el tiempo de tratamiento en 2009. La teoría que sustenta AcceleDent es que las fuerzas vibratorias de baja frecuencia (30 Hz) estimularan la diferenciación y maduración celular, lo que lleva a una remodelación ósea más rápida y movimientos de los dientes. Los dispositivos de vibración afirmaron que reducen el dolor y las molestias durante el tratamiento de ortodoncia⁵⁴.

4.12 Vibración aplicada en pacientes con osteoporosis

Para proteger y/o recuperar la cantidad y calidad ósea en pacientes osteoporóticos, se han desarrollado agentes farmacológicos que estimulan la actividad anabólica de los osteoblastos p. ej. “Terapia intermitente con hormona paratiroidea, inhibidor de la esclerostinas o que suprimen las acciones de resorción. de osteoclastos”; p. ej., “bifosfonato, modulador selectivo del receptor de estrógenos”. Se ha investigado el potencial de vibración de todo el cuerpo para que sirva como sustituto del ejercicio como una intervención no farmacológica para la osteoporosis, administrado a un sujeto parado sobre plataformas oscilatorias, donde se generan señales mecánicas a través de aceleraciones verticales y horizontales⁴⁴.

Se ha demostrado que las señales oscilatorias mecánicas de bajo nivel (vibraciones) aumentan la tasa de remodelación en los huesos largos cargados mecánicamente, actualmente se utiliza en la prevención de la osteoporosis en función de un aumento en el metabolismo óseo y una disminución de la pérdida ósea en el postoperatorio.

4.13 Vibración aplicada en pacientes con ortodoncia

También existe evidencia convincente de estudios en animales que utilizan el modelo de sutura craneal y el periostio de hueso largo, lo que sugiere que la carga dinámica mejora la formación de hueso y aumenta el movimiento del diente de ortodoncia en comparación con una fuerza estática. Si bien existe un cuerpo de

evidencia emergente de que la vibración mejora el movimiento de los dientes de ortodoncia en los animales, el efecto de las vibraciones de nivel análogo en el movimiento de los dientes en los pacientes no se ha investigado⁵⁵.

En un modelo de movimiento dental experimental indicó, que cuando se carga una fuerza en un diente, hay una inducción selectiva de resorción ósea por osteoclastos en el lado presionado en el hueso alveolar y formación de hueso por osteoblastos en el lado tenso. Este estrés diferencial hace que el diente se mueva en una dirección específica. Usando este modelo experimental de movimiento dental, se ha demostrado previamente que los osteocitos responden temprano al estrés mecánico y producen OPN en su acción como un mecanotransductor, lo que sugiere que los osteocitos juegan un papel crítico en la resorción ósea provocada por la fuerza mecánica⁵⁶.

Para comprender un poco más el proceso fisiológico de la remodelación ósea, en este trabajo de revisión se evaluaron y analizaron los estudios *in vitro*, de células óseas involucradas, cómo la mecanotransducción juega un papel importante sobre las diferentes citocinas, ya que al inducir estimulación mecánica se pretende determinar cómo actúan a nivel celular y molecular en el tejido óseo alterando y regulando la expresión de los diferentes genes tanto de osteoblastos y osteoclastos siendo guiados por los osteocitos cómo células mecanosensoras, ya que las vías moleculares siguen siendo en parte desconocidas.

5 JUSTIFICACIÓN

Estudios recientes revelen los efectos de la micro-vibración cómo terapia para inducir remodelación ósea, reducen la actividad de los osteoclastos, e inducen factores solubles a nivel celular y molecular en las células osteoblásticas, para incrementar la densidad ósea en la cadera y columna vertebral en mujeres postmenopáusicas, por lo cual se ha propuesto cómo un amplio tratamiento seguro no farmacológico y no invasivo para tratar la osteoporosis en humanos⁵⁷, además de inhibir la adipogénesis y estimular la osteogénesis⁵⁸. La micro-vibración en conjunto con el tratamiento ortodóntico se ha propuesto para acelerar el movimiento dentario². Sin embargo, en la actualidad no se ha podido dilucidar el mecanismo a nivel celular y molecular por el cual es posible acelerar el movimiento dental en el tratamiento de ortodoncia por medio de la micro-vibración.

6 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en consideración que la estimulación de la micro-vibración aplicada al esqueleto inhibe la actividad osteoclástica e incrementa la densidad ósea en la superficie del hueso, se ha propuesto cómo tratamiento no invasivo en pacientes con deterioro estructural en el hueso. En cambio, este tipo de micro-vibración fue propuesta para acelerar el movimiento dentario durante el tratamiento de ortodoncia⁵⁴, no obstante los resultados reportados en la literatura son contradictorios^{60,61,62}, por lo que es de gran importancia el determinar qué citocinas expresan los osteocitos a nivel celular y molecular con la estimulación de la micro-vibración, eventos que contribuirán a implementar una terapéutica novedosa en la regeneración ósea y quizá en la aceleración del movimiento dentario durante el tratamiento de ortodoncia.

Pregunta de investigación

¿Cuál es el efecto de la micro-vibración de baja intensidad-alta frecuencia (LMHFV) en los osteocitos y cómo influye la remodelación ósea?

7 OBJETIVOS

Objetivo general

- Realizar una revisión sistemática de los efectos que ejerce la micro-vibración de alta frecuencia-baja intensidad en osteocitos cultivados *in vitro*.

Objetivos específicos

- Realizar recopilación de artículos y captura de la información de los efectos de la micro-vibración de alta frecuencia-baja intensidad en osteocitos cultivados *in vitro*.
- Evaluar los resultados obtenidos de los efectos de la micro-vibración en los osteocitos cultivados *in vitro*.
- Evaluar los resultados obtenidos de los efectos de la micro-vibración en otro tipo de células óseas cultivadas *in vitro*

8 HIPÓTESIS

Existe diferencia estadísticamente significativa, con o sin los efectos de la micro vibración de baja intensidad y alta frecuencia en los osteocitos cultivados *in vitro*, sobre la producción de factores solubles.

9 METODOLOGÍA

Se realizó un estudio descriptivo, usando artículos científicos de investigación y revisión, se utilizó la estrategia PICO ⁶³, seleccionando artículos publicados desde el año 2010 al 2020 considerando que fueran en inglés, artículos originales, disponibles de texto completos y de acceso libre. Esta búsqueda se realizó en bases de datos como Pubmed (78), Google scholar (0), Sciencedirect (13), Medline (2). Utilizando palabras clave “osteocitos”, “microvibración”, “osteoclastogénesis”, “osteoporosis”, “Acceldent”.

Definición de los criterios de selección

- **Criterios de inclusión:** estudios clínicos y experimentales donde utilizaron la micro-vibración de (alta frecuencia-baja intensidad) como terapia para la remodelación ósea, estudios *in vitro* donde a las células de hueso osteocitos se les aplicó estimulación con vibración y revisiones donde se habló de osteoclastogénesis y remodelación ósea.
- **Criterios de exclusión:** artículos que presentaron mínima información del tema y donde se enfocaron más a una enfermedad, que hagan alguna comparación con otro medicamento.

La selección bibliografía se estructuró sobre método PRISMA **Fig. 1**⁶⁴ se agregaron boléanos para combinaciones de búsqueda utilizando: “OR”, “AND” obteniendo.

Búsqueda: (((((((((macrovibration **AND** osteocyte) **OR** remodeling) **AND** bone) **OR** cytokines) **AND** interleukin 10) **AND** interleukin 12) **OR** RANKL)

Osteocyte **AND** vibration **AND** high **AND** frequency

Bone **AND** cells **AND** osteoclastogenesis

En la búsqueda PRISMA⁶⁴, se identificaron 93 artículos, al eliminar los duplicados se examinó el título y el resumen para ir excluyendo los de poca o nula información acerca del tema, se analizaron 11 artículos con texto completo haciendo referencia a los criterios de inclusión y exclusión por lo que se consideraron en el trabajo de revisión sistemática. 1) artículos en donde se hablará y aplicará micro-vibración en células óseas *in vitro* pertenecientes a líneas celulares como osteoblastos (MC3T3-E1), osteoclastos (RAW264.7) u osteocitos (MLO-Y4) o células primarias diferenciadas de ratón o humanos. Las características del resultado que se tomaron en cuenta fueron. 2) Desarrollo en la proliferación de cada tipo de célula, así como su diferenciación y cambios en la expresión de genes o proteínas

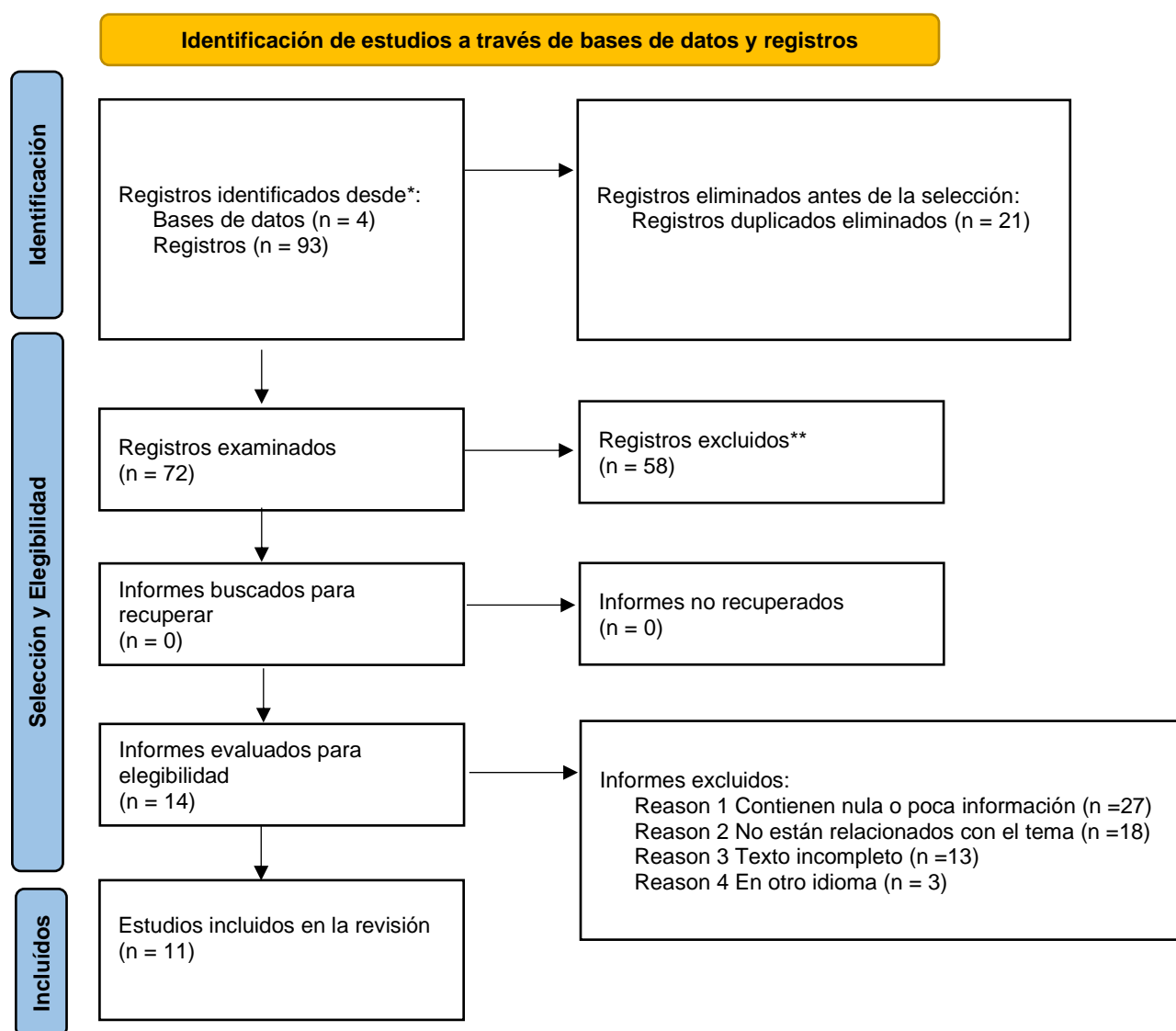


Fig.1 Diagrama de flujo PRISMA de selección de estudios

En la **tabla 1**, se incluyen los estudios seleccionados, los cuales fueron ensayos experimentales controlados, cuenta con un resumen de la información general cómo: Autor, Año de la publicación, tipo de células, país de origen, estímulo de vibración, frecuencia e intensidad y título del artículo.

Tabla 1. Resumen de los estudios incluidos

Autor	Células	País	Dispositivo de vibración	Título
Lau <i>et al.</i> (2010)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos) y RAW264.7 (osteoclastos)	Canadá	Vibrador (ET-127, Labworks Inc) (0.3 g a 30, 60, 90 Hz)	Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteocytes in the regulation of osteoclasts.
Lau <i>et al.</i> (2011)	(MSC) de medula ósea de ratón	Canadá	vibrador (ET-127, Labworks Inc) (0.3 g a 60 Hz)	Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteogenic differentiation of rat mesenchymal stromal cells.
Li <i>et al.</i> (2012)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos) / MC3T3-e1 (osteoblastos)	China	transductor para un SAFHS (Sonic Accelerated Fracture Healing System, NexSound, China) (1.5MHz)	Low intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of osteoblasts through osteocytes.
Wu S <i>et al.</i> (2012)	Línea celular RAW264.7 (osteoclastos)	China	No especificado (0.3 g a 45Hz)	Low-magnitude high-frequency vibration inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells.
Uzer. (2014)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos)	USA	vibrador (Foneng Technologies Co., Ltd., China) (0.15, 1 g a 30 y 100Hz)	Gap junctional communication in osteocytes is amplified by low intensity vibrations <i>in vitro</i> .
Wu <i>et al.</i> (2016)	Línea celular MLO-Y4 (osteocitos)	China	vibrador (Foneng Technologies Co., Ltd., China) (0.4 g a 10, 30, 60 y 90 Hz)	The bio-response of osteocytes and its regulation on osteoblasts under vibration.
Marędziak <i>et al.</i> (2017)	células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC).	Polonia	Vibraciones generadas por un dispositivo electromagnético (0.3 g a 25,35, 45 Hz)	The Effect of Low-Magnitude Low-Frequency Vibrations (LMLF) on Osteogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells.
Hao <i>et al.</i> (2017)	Línea celular RAW264.7 (osteoclastos)	China	No especificado (2 Hz)	Osteocytes regulate osteoblast differentiation and osteoclast activity through Interleukin-6 under mechanical loading.

	y MLO-Y4 (osteocitos) Cultivos primarios de ratón (osteoblastos)			
Judex y Pongkitwiton. (2018)	Cultivo celular humano de osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos	USA	VPro5 (Propel Orthodontics 100Hz) AcceleDent (OrthoAccel Technologies 30 HZ)	Differential Efficacy of 2 Vibrating Orthodontic Devices to Alter the Cellular Response in Osteoblasts, Fibroblasts, and Osteoclasts.
Sakamoto <i>et al.</i> (2019)	Línea celular RAW264.7 (osteoclastos) y MLO-Y4 (osteocitos)	Japón	No especificado (0,5 g a 48,3 Hz)	Vibration enhances osteoclastogenesis by inducing RANKL expression via NF-κB signaling in osteocytes.
García <i>et al.</i> (2020)	Cultivos primarios de medula ósea de ratón (osteoblastos)	México	AcceleDent® Aura (0.25 N; 30 Hz)	Micro-vibrations at 30Hz on bone cells cultivated <i>in vitro</i> produce soluble factors for osteoclast inhibition and osteoblast activity

10 RESULTADOS

Evaluación de la calidad metodológica

Se evaluaron los 11 artículos seleccionados basándose en el método JADAD⁶⁵. **Tabla 2** para esta revisión sistemática se analizó la calidad y efectividad metodológica que estos presentaron, para así poder determinar en qué medida los estudios han abordado la posibilidad de sesgo en su diseño y realización. Por medio de 7 ítems, se da una puntuación en una escala de 0 a 5 puntos de manera que entre más respuestas positivas (**SI**), quiere decir que el artículo es de una mayor calidad metodológica, mientras que si tiene más respuestas negativas (**NO**), siendo la puntuación inferior a 3 el ensayo es pobre en su calidad metodológica donde:

Si = 1 punto y **No** = -1 punto

Tabla 2. Cuestionario JADAD modificado para la evaluación de la calidad metodológica.

Estudio	¿Los objetivos fueron adecuados?		¿Fueron estudios experimentales controlados?		¿Se describieron en detalle los sujetos de estudio y el entorno?		¿Se describe el método utilizado para la vibración?		¿Fue adecuado el tamaño de la muestra?		¿Se realizó el análisis de datos con muestra identificada?		¿Hubo un análisis estadístico apropiado?	
	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No	Si	No
Lau <i>et al.</i> 2010	1		1		1		1		1		1		1	
Lau <i>et al.</i> 2011	1		1		1		1		1		1		1	
Li <i>et al.</i> 2012	1		1		1			-1	1		1		1	
Wu <i>et al.</i> 2012	1		1		1		1		1		1		1	
Uzer <i>et al.</i> 2014	1		1		1			-1	1		1		1	
Wu <i>et al.</i> 2016	1		1		1		1		1		1		1	
Marędziak <i>et al.</i> 2017	1		1		1		1		1		1		1	
Hao <i>et al.</i> 2017	1		1		1			-1	1		1		1	
Judex y Pongkitwitoon 2018	1		1		1		1		1		1		1	
Sakamoto <i>et al.</i> 2019	1		1		1			-1	1		1		1	
García <i>et al.</i> 2020	1		1		1		1		1		1		1	

Evaluación del riesgo de sesgo en los estudios

Se utilizó la herramienta de la Colaboración Cochrane⁶⁶ que permitió evaluar el riesgo de sesgo en los estudios utilizados para esta revisión sistemática **Fig. 2**, se incluyeron los siguientes dominios: sesgo en los objetivos que fuesen adecuados para la población de estudio, sesgo en si fueron estudios experimentales controlados, sesgo en la descripción a detalle de los sujetos de estudio y su entorno, sesgo en la descripción del método utilizado para estimulación vibratoria es células óseas cultivadas, sesgo tamaño de la muestra, sesgo en la realización de análisis de datos con una cobertura suficiente de la muestra identificada y sesgo en análisis estadístico apropiado. Dos revisores evaluaron la descripción de cada dominio verificaron que los resultados arrojados estuviesen completos en los ensayos, utilizando el termino en cada dominio si estos eran de “bajo riesgo de sesgo”, “poco claro” y “alto riesgo de sesgo” se utilizó la herramienta RoB2 para la elaboración de

las cifras de riesgo de sesgo, siete estudios presentaron bajo riesgo de sesgo, mientras que cuatro de ellos presentaron algunas preocupaciones.

Study	Risk of bias							Overall
	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	
Lau 2010	+	+	+	+	+	+	+	+
Lau 2011	+	+	+	+	+	+	+	+
Li 2012	-	+	+	-	+	+	+	-
Wu 2012	+	+	+	+	+	+	+	+
Uzer 2014	+	+	+	X	+	+	+	-
Wu 2016	+	+	+	+	+	+	+	+
Mareziak 2017	+	+	+	+	+	+	+	+
Hao 2017	+	+	+	X	+	+	+	-
Judex & Pongkitwitoon 2018	+	+	+	+	+	+	+	+
Sakamoto 2019	+	+	+	X	+	+	+	-
García 2020	+	+	+	+	+	+	+	+

D1: The objectives were appropriate for the study population
 D2: They were controlled experimental studies
 D3: Study subjects and environment were described in detail
 D4: The method used for vibratory stimulation in cultured bone cells is described
 D5: Sample size was adequate
 D6: Data analysis was performed with sufficient coverage of the identified sample
 D7: There was an appropriate statistical analysis

Judgement
 X High
 - Unclear
 + Low

Fig.2(a) Resumen de la calidad metodológica de los estudios y riesgo de sesgo

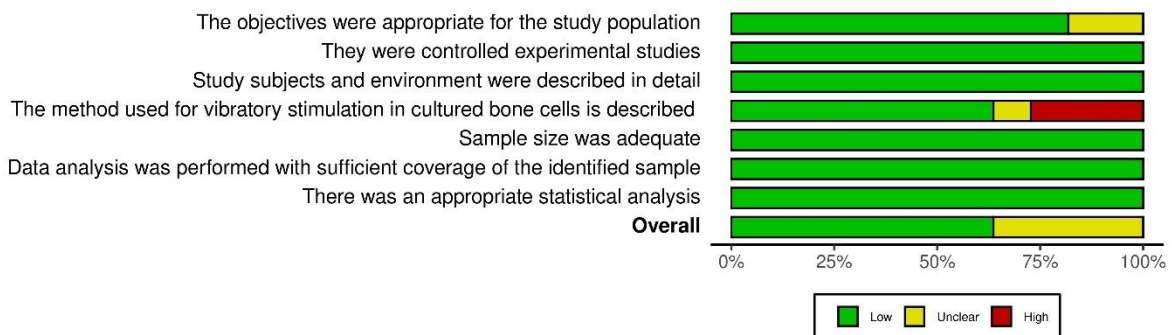


Fig. 2 (b) Resumen de la calidad metodológica de los estudios y riesgo de sesgo

Características y comparación de resultados

Se brinda el resultado obtenido de los artículos en la tabla 3 y 4. En relación con el riesgo de sesgo entre los 11 estudios la mayoría se clasificó de alta calidad metodológica ya que abordaron adecuadamente la aplicación del dispositivo vibratorio a excepción de cuatro en los cuales hubo poca información de cómo se introdujeron y qué aparato se utilizó para el estímulo. Seis estudios utilizaron líneas celulares de osteocitos (MLO-Y4) evaluando diferentes tipos de proteínas, en dos de ellos realizaron un modelo de elementos finos y cómo la micro-vibración repercute en la membrana, el núcleo y el citoesqueleto alterando las proteínas de señalización y cómo modifica la expresión molecular y celular de las demás células óseas, los otros cinco fueron con osteoclastos, osteoblastos, fibroblastos y cómo estas células interactúan sinérgicamente con los diferentes tipos de proteínas de las demás células para llevar a cabo la regeneración ósea.

Tabla 3. Evaluación de los resultados obtenidos en ensayos con osteocitos

Autor	Tiempo vibración y días	Prueba de laboratorio	Análisis estadístico	Factores solubles	Resultados del grupo experimental en comparación con el control
Lau <i>et al.</i> (2010)	1 h	ELISA	T de student, ANOVA, $p < 0.05$	PGE ₂ , RANKL, OPG, COX-2	<ul style="list-style-type: none"> • OPG no fue alterado, • COX -2 a 90 Hz se elevó 3.4 veces ($P < 0,01$), • PGE₂ disminuyo (-61%) • RANKL a 60 Hz (-55%). • MLO-Y4 con LHMf liberaron fs • Reducción de RAW264.7 positiva para TRAP (-36%) vs control
Li <i>et al.</i> (2012)	20 min cada 12, 24, 36 y 48 hrs,	Ensayo MTT y ELISA	ANOVA, Tukey, $p < 0.05$	Proliferación de OB, NO y PGE ₂	<ul style="list-style-type: none"> • El MC de MLO-Y4 con LIPUS sin cambios en crecimiento MC3T3-e1, e inhibió la proliferación celular. • ALP aumentó su actividad 30% • MLO-Y4 continuó secretando y liberando NO y PGE₂ vs control.
Uzer (2014)	30 min	Citometría de flujo RT-PCR y Western Blot	ANOVA, Newman-Keuls, Spearman Rank, $p < 0.05$	Cx43, Akt	<ul style="list-style-type: none"> • El núcleo mostró cambios a 30Hz siendo mayor 27%, que a 100Hz, • La GJIC aumento un 25 %, dependiendo de la proteína AKT. sin estar asociada con Cx43 ya que permaneció sin cambios después de la vibración vs control.
Wu <i>et al.</i> (2016)	1 h	ELISA, RT-PCR Citometría de flujo	ANOVA, Tukey, $p < 0.05$	Membrana Actina, NO, PGE ₂ , MC ALP, Ca ²⁺	<ul style="list-style-type: none"> • 30Hz en la membrana provocó una pequeña deformación. • 90Hz cambios en la morfología y los núcleos, • La F-actina mostró estructura diferente alrededor del núcleo. • Aumento de NO, PGE₂, Ca²⁺ y mejoró la osteogénesis vs control.
Hao <i>et al.</i> (2017)	10 min, 30 min, 1, 3 y 6 hrs	Western Blot RT-PCR Ensayos de proliferación celular	ANOVA, Tukey, $p < 0.05$	IL-6, JAK, STAT3 y ERK	<ul style="list-style-type: none"> • IL-6 aumentó la expresión de Runx2, ALP, OCN, RANKL y OPG $p < 0.001$ inhibiendo el desarrollo de OC. • JAK, STAT3 y ERK se encargan de la diferenciación de OB en OC al aplicar un anticuerpo que bloquea IL-6, aumentó la actividad de estas células vs control.
Sakamoto <i>et al.</i> (2019)	1 min cada 12, 24 y 48 hrs	Western Blot RT-PCR Inmunofluorescencia	T student, ANOVA, Tukey, $p < 0,01$ y $0,05$.	NF- κ B RANKL	<ul style="list-style-type: none"> • Efectos en RAW264.7 mostraron aumento en la proliferación celular sin afectar la diferenciación. • En MLO-Y4 activo y elevó la fosforilación de IκB. • El movimiento dental experimental RANKL y OPG elevó a NF-κB y RANKL en los osteocitos del lado de compresión del hueso alveolar <i>in vivo</i>, mejoró la osteoclastogénesis vs control.

Tabla 4. Evaluación de los resultados obtenidos en ensayos con otro tipo de células óseas.

Autor	Tiempo vibración y días	Prueba de laboratorio	Análisis estadístico	Factores solubles	Resultados del grupo control en comparación con el experimental
Lau <i>et al.</i> (2011)	1 h x 6 días	RT-PCR Ensayo de proliferación celular Citometría de flujo	T de student, p <0.05	ALP Runx2 Osterix COL1A1 OPN BSP	<ul style="list-style-type: none"> La proliferación de MSC y expresión de ALP en ambos grupos por 14 días no se encontraron diferencias Osx, ALP, COL1A1, OPN y BSP para día 6 fueron más altos (P<0.01) y Runx2 día 2 a14 Cultivos LMHF contenían una cantidad menor de mineralización de matriz normalizada del (-24%).
Wu S <i>et al.</i> (2012)	15 min al día	RT-PCR Western Blot	ANOVA, Dunnett, p <0,05	RANKL F-Actina C-fos	<ul style="list-style-type: none"> MNC control positivas para TRAP contenían (≥ 3 núcleos) Tratadas con RANKL aumentaron 70 veces (10 núcleos) LMHFV mostró disminución p<0.01, inhibió los anillos de actina interrumpiendo la organización citoesquelética. Catepsina K, MMP-9, TRAP y C-fos reducción p<0.001, C-fos p<0.05.
Marędziak <i>et al.</i> (2017)	10 min durante 21 días	ELISA RT-PCR Citometría de flujo	ANOVA, Dunnett, p <0,05	ALP, BMP-2, OCL y OPN	<ul style="list-style-type: none"> En la diferenciación osteogénica las células a 25 Hz mostraron mayor proliferación, el tiempo de duplicación de la población fue menor (p<0,01), aumentó de nódulos osteogénicos creados por ME rica en hidroxapatita. ALP, BMP₂ OCN, OPN e integrinas su mayor actividad fue a los 21 días en todas las frecuencias vs control
Judex, & Pongkitwitoon (2018)	20 min y 5 min	RT-PCR	Fisher, p<0,05	COLA1 ALPL RUNX2 FGF2 P13K, RANK NAFATCI	<ul style="list-style-type: none"> Ambos dispositivos aumentaron p<0.05 la proliferación celular de osteoblastos y fibroblastos, siendo VPro5 mayor (p<0.05) Aumento de osteoclasto moderado COLA1, ALPL y Runx2 se elevaron p<0.05 por parte de VPro5, FGF2 Y CTGF aumentaron un 30% y 40%. P13K, RANK Y NAFATCI sin cambios
García <i>et al.</i> (2020)	20 min	Citometría de flujo Ensayo de caspasa 3/7	U de Mann-Whitney, p<0,05	IL-4, IL-13, IL-17, OPG, RANKL y TGF- β	<ul style="list-style-type: none"> La síntesis de IL- 4,13,17, OPG y TGF- β se observó aumento y mostró disminución de sRANKL PNCA incremento significativamente Caspasa 3/7 mostró un alza positiva.

11 DISCUSIÓN

El presente estudio, tuvo como objetivo una revisión sistemática para dilucidar los efectos que ejerce la LMHFV sobre las células óseas, en particular en los osteocitos; considerando que esta altera la expresión de factores solubles, la cual contribuye en la proliferación y diferenciación celular, y por otro lado determinar los mecanismos celulares y moleculares que participa en la inhibición de la actividad y síntesis osteoclástica mediada por la micro-vibración y como esta respuesta influye en la actividad de los osteocitos, ya que la micro-vibración también estimula la actividad osteoblástica. La mayoría de los estudios se sometieron a diferentes intensidades de micro-vibración y horarios diferentes, siempre y cuando estuvieron en el rango de 20 a 90 Hz.

Entre las señales que expresan los osteocitos en respuesta a la estimulación mecánica, se encuentran el RANKL y su decodificador natural la OPG, tales citocinas también son secretadas por células osteoblásticas, la OPG es una molécula específica en la regulación de la actividad osteoclástica, ya que bloqueando la interacción entre RANKL-RANK la cual inhibe la formación y activación de osteoclastos^{67,68,69}.

Ha sido demostrado que las células madre mesenquimales tienen la capacidad de diferenciarse en varios tipos de linajes, como células osteogénicas, condrogénicas, adipogénicas y miogénicas³. En un estudio de Lau *et al.*, con células madre mesenquimales (MSC) demostró que la micro-vibración no mejoró la diferenciación osteogénica ya que la actividad y expresión de marcadores asociados a osteoblastos como la fosfata alcalina (ALP), el gen Runx2, Osterix (Osx), colágeno tipo I alfa 1 (COLA1), sialoproteína ósea, osteopontina (OPN) y osteocalcina (OC) necesarios para la osteogénesis, no presentaron alguna diferencia significativa⁶⁹, sin embargo, Marędziak *et al.*, realizaron una investigación con células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano (hASC), a diferencia de Lau *et al.*, observaron un aumento en la proliferación y diferenciación osteogénica a 25Hz, las células generaron cantidades 3 veces mayores de calcio (Ca²) y 6 veces

mayores de fósforo (P) además de estructuras similares a la hidroxiapatita en comparación con el grupo control⁵⁸. Con estos hallazgos se demuestra que en células MCS la micro-vibración altera el compromiso del linaje al inhibir la adipogénesis⁷⁰ y tiene un efecto positivo sobre la diferenciación osteogénica, pero esto podría deberse al tiempo de micro-vibración en cada uno de los estudios *in vitro*.

La formación del hueso está mediada por osteoblastos y en su estado de maduración pasan a ser osteocitos incrustados en la matriz ósea, estos son muy sensibles a los estímulos mecánicos contribuyendo a la osteogénesis⁷¹, un estudio con medios de cultivo condicionados con células parecidas a osteoblastos MC3T3-E1 y estimuladas por medio de ultrasonido pulsado de baja intensidad (LIPUS), que induce micro movimientos y produce estimulación mecánica mostraron una inhibición en la proliferación de osteoblastos *in vitro*, por otra parte, al añadir medios de cultivo de osteocitos (MLO-Y4) hubo un aumento en la actividad de la ALP y de factores solubles expresados como PGE₂ y óxido nítrico NO, un mediador soluble liberado por los osteocitos ya que se han implicado en la respuesta anabólica del hueso a la carga mecánica, lo cual sugiere que los osteocitos estimulados con LIPUS potencian a la diferenciación de los osteoblastos en un modelo *in vitro*^{72,73}. Por otro lado, están las prostaglandinas de la serie E₂ (PGE₂) cuya síntesis es catalizada por la enzima ciclooxygenasa-2 (COX-2), la cual es una molécula de señalización que los osteocitos expresan en respuesta a los estímulos mecánicos, contribuye y actúan sobre los osteoblastos y osteoclasto con efectos estimulantes e inhibidores, al ser sometidos por 1 hora de micro-vibración a diferentes intensidades⁴⁵. Por lo tanto, la micro-vibración parece mejorar la diferenciación de osteoblastos, genes de expresión y proteínas para inducir osteogénesis.

En un estudio realizado por Wu y col., determinaron que la micro-vibración afectó las funciones de los osteoclastos, ya que se presentó una reducción significativa para la formación de células multinucleadas (MNC) positivas a la fosfatasa ácida resistente al tartrato (+TRAP) inducidas por RANKL, además disminuyeron los anillos de actina y hubo una sobre regulación de la expresión de catepsina K (CatK),

MMP-9 enzimas responsables de la degradación del mineral óseo y las matrices de colágeno, por los osteoclastos^{43,74} por el contrario, Sakamoto en 2019 presentó un aumento en la proliferación de una línea celular de pre-osteoclastos RAW246.7 al estimularlas con micro-vibración por 1min a 48.3Hz y por otra parte en las células de la línea celular de osteocitos MLO-Y4 aumentó la expresión de RANKL, pero no afectó la relación de ARNm de osteoprotegerina (OPG). No obstante, en el modelo *in vivo* mostraron que los osteocitos del lado compresivo del hueso alveolar aumentaron la expresión de RANKL y en el lado de tensión, no presentó alguna diferencia de expresión de RANKL⁷⁵. En los dos estudios mencionados la micro-vibración sobre los osteoclastos pareció tener un efecto anti-resortivo, por lo que inhibió la formación de osteoclastos en los modelos *in vitro*.

Esto demuestra que los osteocitos son mecanosensibles capaces de enviar señalamientos en las células vecinas como osteoblastos osteoclastos y fibroblastos en forma paracrina y autocrina, ya que la comunicación intercelular de unión de brecha (GJIC) es importante durante la mecanotransducción, celular, la cual aumenta la GJIC entre células óseas. Los osteocitos que se encuentran dentro de la matriz ósea utilizan el GJIC de manera efectiva para inducir respuestas derivadas de la estimulación mecánica, por lo que la micro-vibración incrementó significativamente los GJIC⁷⁶. Por otro lado, se ha señalado que la micro-vibración puede tener diferentes efectos sobre los osteocitos a diferentes intensidades, en otro estudio al aplicar estimulación mecánica; no se observaron cambios significativos en la membrana celular y núcleo de los osteocitos, sin embargo la secreción de algunos marcadores de los osteocitos se vieron alteradas como fue el NO que incrementó a 30Hz, mientras que el Ca^{2+} no se vio alterado en esa intensidad pero si a 90Hz, para PGE₂ el aumento si fue notable en todas las frecuencias, de igual manera para la expresión de los genes de osteoblastos como osteopontina (OPN), osteocalcina (OC) y propeptido de procolágeno tipo 1 (PINP), por lo cual se deduce que el efecto de los osteocitos con micro-vibración podría tener un efecto sobre los osteoblastos dependiendo de la frecuencia, ya que podría inhibir o inducir la osteogénesis⁷⁷.

La remodelación del citoesqueleto podría ser crucial en la mecanotransducción ya que micro-vibración regula positivamente los genes de actina en osteocitos y un acoplamiento entre el núcleo y el citoesqueleto es indispensable para amplificar la mecanorespuesta y promover aún más la señalización celular⁷¹.

La supresión de la osteoclastogénesis por citocinas, funciona como un sistema de inhibición que limita la resorción ósea y el daño tisular. Estos factores pueden suprimir la diferenciación de los precursores de osteoclastos inhibiéndolos o indirectamente regulando la diferenciación y expresión de RANKL y OPG²⁵.

Por otro lado, indican que la interleucina IL-6 es una citocina sensible a la estimulación por la carga mecánica la cual regula la formación y resorción óseas. Los osteocitos regulan la respuesta osteogénica y la actividad de los osteoclastos bajo carga mecánica mediada por la producción de IL-6 a través de las vías de señalización STAT3 y ERK⁶. Además se ha demostrado que la IL-4 regula la homeostasis ósea al inhibir la función de los osteoclastos maduros interfiriendo con la señalización NF- κ B y Ca²⁺, la cual suprime la expresión de RANK en células precursoras osteoclásticas, sin embargo la IL-13 aumenta la expresión de OPG en osteoblastos en conjunto con la IL-4, el antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) mejora la proliferación celular en respuesta a estímulos externos, TGF- β puede inhibir la apoptosis de los osteoblastos manteniendo su supervivencia durante la transdiferenciación en osteocitos y la IL-17 regula el alza de la expresión de catepsina K y MMP-9 García y col., mostraron un aumento en la síntesis de IL-4, IL-13, IL-17, OPG, TGF- β , PCNA y caspasa 3/7 y una disminución de sRANKL en cultivos de osteoblastos y osteoclastos estimulados con micro-vibración a 30Hz².

En otro estudio en el que se compararon 2 dispositivos de ortodoncia que generan micro-vibraciones a diferentes intensidades (VPro5 120Hz y AcceleDent 30 Hz), con el propósito de acelerar el movimiento de los dientes durante el tratamiento de ortodoncia, mostró que en cultivos de osteoblastos, fibroblastos y osteoclastos humanos se presentó una mayor proliferación celular y expresión génica de marcadores COLA1, fosfatasa alcalina biomineralizada asociada (ALPL), Runx2, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF2) y factor de crecimiento del tejido

conectivo (CTGF) con el dispositivo VPro5. Estos datos sugieren que las micro-vibraciones promueven la proliferación y diferenciación celular mejorando el recambio tisular y quizá podría acelerar el movimiento dental⁷⁸, ya que a la fecha no se ha podido demostrar a nivel celular y molecular. Por tanto, la estimulación por micro-vibración podría ser una terapia innovadora que podría tener efectos positivos en el desarrollo y formación del tejido óseo.

12 CONCLUSIÓN

La micro-vibración parece influir en la remodelación y regeneración ósea, la capacidad de mecanotransducción y mecanosensora de los osteocitos para responder a los estímulos mecánicos parece regular factores solubles teniendo un efecto sobre las demás células óseas en la diferenciación y proliferación osteogénica e inhibición de la osteoclastogénesis, sin embargo, hasta la fecha no se ha podido demostrar a nivel celular y molecular como la micro-vibración actúa sobre las células. Esta podría ser una terapia prometedora e innovadora, no invasiva y no farmacológica.

13 REFERENCIAS

1. Mizokami A, Kawakubo-Yasukochi T, Hirata M. Osteocalcin, and its endocrine functions. *Biochem Pharm.* 2017; 132:1-8. DOI: 10.1016/j.bcp.2017.02.001
2. Garcia-Lopez S, Villanueva-Arriaga RE, Masso-Rojas F, et al. Microvibrations at 30Hz on bone cells cultivated in vitro produce soluble factors for osteoclast inhibition and osteoblast activity. *Arch Oral Biol.* 2020; 110:1-9. DOI: 10.1016/j.archoralbio.2019.104594
3. Bianco P, Robey PG. Skeletal stem cells. *Development.* 2015;142(6):1-5. DOI: 10.1242/dev.102210
4. Fernandez-Tresguerres Hernandez-GI, Alobera-Gracia MA, Del Canto-Pingarrón M, et al. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):47-51.
5. Capulli M, Paone R, Rucci N. Osteoblast, and osteocyte: games without frontiers. *Arch Biochem Biophys.* 2014; 561:1-10. DOI: 10.1016/j.abb.2014.05.003.
6. Hao Z, Ma Y, Wu J, Li X, Chen H, Shen J, et al. Osteocytes regulate osteoblast differentiation and osteoclast activity through Interleukin-6 under mechanical loading. *RSC Adv.* 2017;7(79):1-10. DOI: 10.1039/C7RA09308J
7. Franz-Odenaal TA, Hall BK, Witten PE. Buried alive: how osteoblasts become osteocytes. *Dev Dyn.* 2006;235(1):1-15. DOI: 10.1002/dvdy.20603
8. Florencio-Silva R, Sasso GRdS, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int.* 2015; 1-18. DOI: 10.1155/2015/421746
9. Bonewald LF. The amazing osteocyte. *J Bone Miner Res.* 2011;26(2):229-38. DOI:10.1002/jbmr.320
10. Taranta A, Migliaccio S, Recchia I, Caniglia M, Luciani M, De Rossi G, et al. Genotype-phenotype relationship in human ATP6i-dependent autosomal recessive

osteopetrosis. *Am J Pathol.* 2003;162(1):57-68. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63798-4

11. Mikán V JF, Oliveros A WD. Osteoclastogenesis and Bone Diseases. *Rev Med.* 2007;15(2):261-70.

12. Chen X, Wang Z, Duan N, Zhu G, Schwarz EM, Xie C. Osteoblast-osteoclast interactions. *Connect Tissue Res.* 2018;59(2):99-107. DOI:10.1080/03008207.2017.1290085

13. Feng W, Guo J, Li M. RANKL-independent modulation of osteoclastogenesis. *J Oral Biosci.* 2019;61(1):16-21. DOI: 10.1016/j.job.2019.01.001

14. Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W. Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res.* 2018; 6(16):1-11. DOI.10.1038/s41413-018-0019-6

15. Dallas SL, Prideaux M, Bonewald LF. The osteocyte: an endocrine cell ... and more. *Endocr Rev.* 2013;34(5):658-90. DOI:10.1210/er.2012-1026

16. Wei J, Karsenty G. An overview of the metabolic functions of osteocalcin. *Rev Endocr Metab Transtorno.* 2015;16(2):93-8. DOI: 10.1007/s11154-014-9307-7

17. Walsh MC, Choi Y. Biology of the RANKL-RANK-OPG System in Immunity, Bone, and Beyond. *Front Immunol.* 2014; 5:1-12. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00511

18. Kenkre JS, Bassett J. The bone remodelling cycle. *Ann Clin Biochem.* 2018;55(3):308-27. DOI: 10.1177/0004563218759371

19. Koide M, Kobayashi Y, Yamashita T, et al. Bone Formation Is Coupled to Resorption Via Suppression of Sclerostin Expression by Osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2017;32(10):1-37. DOI: 10.1002/jbmr.3175.

20. Haffner-Luntzer M, Liedert A, Ignatius A. Mechanobiology of bone remodeling and fracture healing in the aged organism. *Innov Surg Sci.* 2016;1(2):57-63. DOI: 10.1515/iss-2016-0021

21. Siddiqui JA, Partridge NC. Physiological Bone Remodeling: Systemic Regulation and Growth Factor Involvement. *Physiology (Bethesda)*. 2016;31(3):233-45. DOI:10.1152/physiol.00061.2014
22. Zhang Q, Chen B, Yan F, et al. Interleukin-10 inhibits bone resorption: a potential therapeutic strategy in periodontitis and other bone loss diseases. *Biomed Res Int*. 2014;1-6. DOI: 10.1155/2014/284836
23. Brylka LJ, Schinke T. Chemokines in Physiological and Pathological Bone Remodeling. *Front Immunol*. 2019; 10:1-19. DOI:10.3389/fimmu.2019.02182
24. Sharaf-Eldin WE, Abu-Shahba N, Mahmoud M, El-Badri N. The Modulatory Effects of Mesenchymal Stem Cells on Osteoclastogenesis. *Stem Cell Int*. 2016:1-14. DOI: 10.1155/2016/1908365
25. Zhao B, Ivashkiv LB. Negative regulation of osteoclastogenesis and bone resorption by cytokines and transcriptional repressors. *Arthritis Res Ther*. 2011;13(4):1-10. DOI: 10.1186/ar3379
26. Fujii T, Kitaura H, Kimura K, Hakami ZW, Takano-Yamamoto T. IL-4 inhibits TNF- α -mediated osteoclast formation by inhibition of RANKL expression in TNF- α -activated stromal cells and direct inhibition of TNF- α -activated osteoclast precursors via a T-cell-independent mechanism in vivo. *Bone*. 2012;51(4):771-80. DOI: 10.1016/j.bone.2012.06.024
27. Onoe Y, Miyaura C, Kaminakayashiki T, Nagai Y, Noguchi K, Chen QR, Seo H, Ohta H, Nozawa S, Kudo I, Suda T. IL-13 and IL-4 inhibit bone resorption by suppressing cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin synthesis in osteoblasts. *J Immunol*. 1996;156(2):758-64.
28. Sims NA, Green JR, Glatt M, Schlicht S, Martin TJ, Gillespie MT, Romas E. Targeting osteoclasts with zoledronic acid prevents bone destruction in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2004;50(7): 1-9. DOI: 10.1002/art.20382.
29. Gao Y, Grassi F, Ryan MR, Terauchi M, Page K, Yang X, Weitzmann MN, Pacifici R. IFN-gamma stimulates osteoclast formation and bone loss in vivo via

antigen-driven T cell activation. *J Clin Invest.* 2007;117(1):122-32. DOI: 10.1172/JCI30074.

30. Tang M, Tian L, Luo G, Yu X. Interferon-Gamma-Mediated Osteoimmunology. *Front Immunol.* 2018; 9:1-14. DOI:10.3389/fimmu.2018.01508

31. Zupan J, Jeras M, Marc J. Osteoimmunology and the influence of pro-inflammatory cytokines on osteoclasts. *Biochem Med.* 2013;23(1):43-63. DOI: 10.11613/bm.2013.007

32. García-López S, Villanueva R, Meikle MC. Alterations in the Synthesis of IL-1 β , TNF- α , IL-6, and Their Downstream Targets RANKL and OPG by Mouse Calvarial Osteoblasts In vitro: Inhibition of Bone Resorption by Cyclic Mechanical Strain. *Front Endocrinol.* 2013; 4:1-8. DOI:10.3389/fendo.2013.00160

33. Huynh NC, Everts V, Pavasant P, Ampornaramveth RS. Interleukin-1beta induces human cementoblasts to support osteoclastogenesis. *Int J Oral Sci.* 2017;9(12):1-9. DOI: 10.1038/ijos.2017.45

34. Osta B, Benedetti G, Miossec P. Classical and Paradoxical Effects of TNF-alpha on Bone Homeostasis. *Front Immunol.* 2014;13(5):1-10. DOI: 10.3389/fimmu.2014.00048

35. Kitaura H, Zhou P, Kim HJ, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest.* 2005;115(12):1-10. DOI: 10.1172/JCI26132

36. Lubberts E, Koenders MI, van den Berg WB. The role of T-cell interleukin-17 in conducting destructive arthritis: lessons from animal models. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(1):29-37. DOI: 10.1186/ar1478

37. Quinn JM, Sims NA, Saleh H, Miroso D, Thompson K, Bouralexis S, et al. IL-23 inhibits osteoclastogenesis indirectly through lymphocytes and is required for the maintenance of bone mass in mice. *J Immunol.* 2008;181(8):1-11. DOI: 10.4049/jimmunol.181.8.5720

38. Tokuhara CK, Santesso MR, Oliveira GSN, et al. Updating the role of matrix metalloproteinases in mineralized tissue and related diseases. *J Appl Oral Sci.* 2019;9(27):1-14. DOI: 10.1590/1678-7757-2018-0596
39. Frost HM. Bone "mass" and the "mechanostat": a proposal. *Anat Rec.* 1987; 219(1):1-9. DOI: 10.1002/ar.1092190104
40. Chen JH, Liu C, You L, Simmons CA. Boning up on Wolff's Law: mechanical regulation of the cells that make and maintain bone. *J Biomech.* 2010;43(1):108-18. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.016
41. Judex S, Lei X, Han D, Rubin C. Low-magnitude mechanical signals that stimulate bone formation in the ovariectomized rat are dependent on the applied frequency but not on the strain magnitude. *J Biomech.* 2007;40(6):1-7. DOI: 10.1016/j.jbiomech.2006.05.014
42. Bin Z, Ruixin L, Shihuan C, Xin D, Lei T, Yuying C, et al. Intermittent low-magnitude high-frequency vibration promotes osteogenic protein expression and inhibits osteoclastogenic cytokine secretion in osteoblasts. *Biomedical Research.* 2018;29(5):988-94.
43. Wu SH, Zhong ZM, Chen JT. Low-magnitude high-frequency vibration inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation of RAW264.7 cells. *Int J Med Sci.* 2012;9(9):801-7. DOI: 10.7150/ijms.4838
44. Chan E, Uzer G, Rubin CT. The potential benefits and inherent risks of vibration as a non-drug therapy for the prevention and treatment of osteoporosis. *Curr Osteoporos Rep.* 2013;11(1):36-44. DOI: 10.1007/s11914-012-0132-1
45. 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(6):1-8. DOI: 10.1016/j.bone.2010.02.031
46. Rochefort GY, Pallu S, Benhamou CL. Osteocyte: the unrecognized side of bone tissue. *Osteoporos Int.* 2010;21(9):1-13. DOI: 10.1007/s00198-010-1194-5

47. Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, et al. Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidyl inositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;391(1):364-9. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.11.064
48. Zhang Y, Paul EM, Sathyendra V, Davison A, Sharkey N, et al. Enhanced osteoclastic resorption and responsiveness to mechanical load in gap junction deficient bone. *Plos One.* 2011;6(8):1-12. DOI: 10.1371/journal.pone.0023516
49. Klein-Nulend J, Bacabac RG, Bakker AD. Mechanical loading and how it affects bone cells: the role of the osteocyte cytoskeleton in maintaining our skeleton. *Eur Cell Mater.* 2012; 24:278-91. DOI: 10.22203/ecm.v024a20
50. Thompson R, Yen S, Rubin J. Vibration therapy: clinical applications in bone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2014;21(6):447-53. DOI: 10.1097/MED.000000000000111
51. Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH. The production of nitric oxide and prostaglandin E (2) by primary bone cells is shear stress dependent. *J Biomech.* 2001;34(5):671-7. DOI: 10.1016/s0021-9290(00)00231-1.
52. Tan SD, Bakker AD, Semeins CM, Kuijpers-Jagtman AM, Klein-Nulend J. Inhibition of osteocyte apoptosis by fluid flow is mediated by nitric oxide. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008; 16;369(4):1-5. DOI: 10.1016/j.bbrc.2008.03.007.
53. Stains JP, Watkins MP, Grimston SK, Hebert C, Civitelli R. Molecular mechanisms of osteoblast/osteocyte regulation by connexin43. *Calcif Tissue Int.* 2014;94(1):55-67. DOI:10.1007/s00223-013-9742-6
54. Katchooi M, Cohanim B, Tai S, Bayirli B, Spiekerman C, Huang G. Effect of supplemental vibration on orthodontic treatment with aligners. *Am J Orthod Dentofacial Orthop.* 2018;153(3):336-46. DOI: 10.1016/j.ajodo.2017.10.017
55. Pavlin D, Anthony R, Raj V, Gakunga P. Cyclic Loading (Vibration) Accelerates Tooth Movement in Orthodontic Patients: A Double-Blind, Randomized

Controlled Trial. *Seminars in Orthodontics*. 2015;21(3):187-94. DOI: 10.1053/j.sodo.2015.06.005

56. Takano-Yamamoto T. Osteocyte function under compressive mechanical force. *Jpn Dent Sci Rev*. 2014;50(2):29-39. DOI: 10.1016/j.jdsr.2013.10.004

57. Kasturi G, Adler RA. Mechanical means to improve bone strength: ultrasound and vibration. *Curr Rheumatol Rep*. 2011;13(3):251-6. DOI:10.1007/s11926-011-0177-7

58. Marędziak M, Lewandowski D, Tomaszewski KA, Kubiak K, Marycz K. The Effect of Low-Magnitude Low-Frequency Vibrations (LMLF) on Osteogenic Differentiation Potential of Human Adipose Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cell Mol Bioeng*. 2017;10(6):549-62. DOI: 10.1007/s12195-017-0501-z

59. Feng X, McDonald JM. Disorders of bone remodeling. *Annu Rev Pathol*. 2011; 6:121-45. DOI: 10.1146/annurev-pathol-011110-130203

60. Kalajzic Z, Peluso EB, Utreja A, Dymont N, et al. Effect of cyclical forces on the periodontal ligament and alveolar bone remodeling during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod*. 2014;84(2):297-303. DOI: 10.2319/032213-234.1

61. Nishimura M, Chiba M, Ohashi T, Sato M, et al. Periodontal tissue activation by vibration: intermittent stimulation by resonance vibration accelerates experimental tooth movement in rats. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 2008;133(4):572-83. DOI: 10.1016/j.ajodo.2006.01.046

62. Woodhouse NR, DiBiase AT, Johnson N, et al. Supplemental vibrational force during orthodontic alignment: a randomized trial. *J Dent Res*. 2015;94(5):682-9. DOI: 10.1177/0022034515576195

63. Santos CMC, Pimenta CAM, Nobre MRC. The PICO strategy for the research question construction and evidence searches. *Rev Lat Am Enfermagem* 2007;15(3):508-11. DOI: 10.1590/s0104-11692007000300023

64. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, Shamseer L, Tetzlaff JM, Akl EA, Brennan SE, Chou R, Glanville J, Grimshaw JM,

Hróbjartsson A, Lalu MM, Li T, Loder EW, Mayo-Wilson E, McDonald S, McGuinness LA, Stewart LA, Thomas J, Tricco AC, Welch VA, Whiting P, Moher D. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021. DOI: 10.1136/bmj. n71.

65. Jadad AR, Moore RA, Carroll D, Jenkinson C, et al. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: ¿Is blinding necessary? *Contr ClinTrials*. 1996;17(1):1-12. DOI: 10.1016/0197-2456(95)00134-4

66. Higgins JPT, Thomas J., Chandler J., Cumpston M., Li T., Page M., Welch V. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions Version 6.0*. 2019. <https://training.cochrane.org/handbook/current>.

67. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, et al. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci*. 1998; 95(7): 1-6. DOI:10.1073/pnas.95.7.3597.

68. Lacey DL, Timms E, Tan H. et al. Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine that Regulates Osteoclast Differentiation and Activation. *Cell*. 1998; 93(2):165-76. DOI: 10.1016/s0092-8674(00)81569-x

69. Lau E, Lee WD, Li J, et al. Effect of low-magnitude, high-frequency vibration on osteogenic differentiation of rat mesenchymal stromal cells. *J Orthop Res*. 2011;29(7):1-14. DOI: 10.1002/jor.21334

70. Marycz K, Lewandowski D, Tomaszewski KA, Henry BM, Golec EB, Marędziak M. Low-frequency, low-magnitude vibrations (LFLM) enhance chondrogenic differentiation potential of human adipose derived mesenchymal stromal stem cells (hASCs). *PeerJ*. 2016; 4:1-25. DOI:10.7717/peerj.1637

71. Steppe L, Liedert A, Ignatius A, Haffner-Luntzer M. Influence of Low-Magnitude High-Frequency Vibration on Bone Cells and Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020; 8:1-14. DOI:10.3389/fbioe.2020.595139

72. Li L, Yang Z, Zhang H, Chen W, Chen M, Zhu Z. Low-intensity pulsed ultrasound regulates proliferation and differentiation of osteoblasts through osteocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418(2):296-300. DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.01.014
73. Spadaro JA, Albanese SA. Application of low-intensity ultrasound to growing bone in rats. *Ultrasound Med Biol.* 1998; 24(4):567-73. DOI: 10.1016/s0301-5629(98)00006-4.
74. Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL. Osteoclast differentiation and activation. *Nature.* 2003; 423(6937):337-42. DOI: 10.1038/nature01658.
75. Sakamoto M, Fukunaga T, Sasaki K, et al. Vibration enhances osteoclastogenesis by inducing RANKL expression via NF- κ B signaling in osteocytes. *Bone.* 2019; 123:56-66. DOI: 10.1016/j.bone.2019.03.024
76. Uzer G, Pongkitwitoon S, Ian C, et al. Gap junctional communication in osteocytes is amplified by low intensity vibrations in vitro. *Plos One.* 2014;9(3): 1-9. DOI: 10.1371/journal.pone.0090840
77. Wu XT, Sun LW, Qi HY, Shi H, Fan YB. The bio-response of osteocytes and its regulation on osteoblasts under vibration. *Cell Biol Int.* 2016;40(4):397-406. DOI: 10.1002/cbin.10575
78. Judex S, Pongkitwitoon S. Differential Efficacy of 2 Vibrating Orthodontic Devices to Alter the Cellular Response in Osteoblasts, Fibroblasts, and Osteoclasts. *Dose Response.* 2018;16(3):1-8. DOI: 10.1177/1559325818792112

14 ANEXOS

Cronograma de actividades

Actividad	Septiembre-diciembre 2019	Enero-diciembre 2020	Enero-agosto 2021	Septiembre 2021	Octubre 2021	Noviembre 2021	Diciembre 2021
Proceso salud enfermedad bucal I	*						
Proceso salud enfermedad bucal II	*						
Diseño de la investigación y recolección de datos.		*					
Sistematización y análisis de resultados.		*					
Discusión de resultados.			*				
Elaboración del informe final			*				
Envío de manuscrito a revista científica indexada.			*				
Estructuración y seguimiento de formato institucional de la Idónea Comunicación de Resultados (ICR).			*	*			
Desarrollo y formato de introducción y antecedentes.				*			
Desarrollo y formato de planteamiento del problema, justificación, hipótesis y objetivos.				*			
Desarrollo y formato de metodología y análisis de resultados.				*	*	*	
Desarrollo y formato de discusión, conclusión						*	*
Presentación de la Idónea Comunicación de Resultados							*

 **La Sociedad Nacional de Investigadores en Odontología A.C.**
y la Universidad Autónoma de Yucatán



A través de la
Facultad de Odontología

OTORGA EL PRESENTE

RECONOCIMIENTO

Luis Jonathan Sebastian González Rosina Villanueva Arriaga, Nelly Molina Frechero, Elizabeth Hernández Pérez.

A:

Por su participación con el trabajo de investigación
EFFECTOS DE LA MICRO-VIBRACIÓN DE BAJA INTENSIDAD-ALTA FRECUENCIA EN OSTEOCITOS CULTIVADOS IN VITRO
EN LA SÍNTESIS DE FACTORES SOLUBLES

Durante el marco del **XXIX Encuentro Nacional y XX Iberoamericano de Investigación en Odontología.**
Celebrado los días 17, 18, y 19 de noviembre del 2021.


Dr. Fernando Javier Aguilar Ayala
Director de la Facultad de Odontología de la Universidad Autónoma de Yucatán


Dr. Amaury de Jesús Pozos Guillen
Presidente de la Sociedad Mexicana de Investigadores en Odontología