

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Estomatología

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado

MAESTRÍA EN ESTOMATOLOGÍA CON OPCIÓN TERMINAL EN ORTODONCIA

“Elaboración de protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos; caracterización de dispositivos de vibración Vpro5®”

TESIS

Presentada para obtener el grado de:

Maestría en Estomatología Opción Terminal Ortodoncia

PRESENTA:

Julio César Villegas Aguilar Matrícula: 221450009

DIRECTOR DE TESIS

M.O. Laura Mónica López Pérez Franco ID 100527897

ASESOR DISCIPLINARIO:

E.O. Alejandro Andrade Torres ID 100426177

ASESOR METODOLÓGICO:

D.C. Miguel Ángel Casillas Santana ID 100526485

LECTOR:

M.O. Yareli Hernández Ávila ID: 100426099

Puebla de Zaragoza, Puebla, mayo 2023



BUAP

Oficio No. FESIEP/CIFE/047/2023

C. Julio César Villegas Aguilar
Alumno de la Maestría en Estomatología
con opción en Terminal en Ortodoncia
Matrícula No.: 221450009
Facultad de Estomatología
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, el que suscribe MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; por este medio me permito informar a Usted, que, está Secretaría de Posgrado aprueba la impresión de la Tesis titulada:

"Elaboración de protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos: caracterización de dispositivos de vibración VPro5".

misma que presentará para realizar su examen profesional y obtener el grado de Maestro en Estomatología con opción en Terminal en Ortodoncia; para su conocimiento y atención correspondiente.

Sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., 24 de mayo de 2023

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA
SOLICITUD DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN DE TESIS RECEPCIONAL

Para obtener el Grado de: Maestro(a) en Estomatología con opción terminal Ortodoncia.

Registro CIFE: 2022175 **Fecha:** jueves 25 de mayo del 2023.

Título de la Tesis: "Elaboración de protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos: caracterización de dispositivos de vibración Vpro5".

Nombre del alumno: Julio César Villegas Aguilar

Matrícula: 221450009

Domicilio: 13 Sur no.2510, Dep 11ª, col. Los Volcanes CP: 72410

Tel: 6141 90 59 12

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 04 de enero del 2021.

Firma: _____

Director de tesis: MO. Laura Mónica López Pérez Franco

Grado académico: Maestría en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100527897

Tel: 22*25 18 03 20

Firma: _____

Director disciplinario: EO. Alejandro Andrade Torres Grado **Grado Académico:** Especialidad en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100426177

Tel: 22*24 71 96 76

Firma: _____

Director metodológico: Dr. Miguel Ángel Casillas Santana Grado académico: Doctorado en ciencias estomatológicas

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100526485

Tel: 44*48 46 76 45

Firma: _____

Lector: M.O. Yareli Hernández Ávila

Grado académico: Maestría en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología

ID: 100426099

Tel: 22*21 99 20 62

Firma: _____

Nombre y firma de aprobación del Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Ortodoncia.

MO. Laura Mónica López Pérez Franco

Firma: _____

La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología,
autoriza la impresión de la Tesis.

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez

Fecha: jueves 25 de mayo del 2023.





Oficio No. FESIEP/CIFE/016/2022

ASUNTO: Dictamen

**A quien corresponda
P R E S E N T E:**

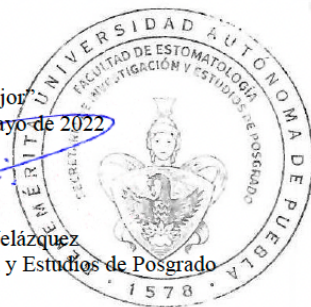
*La Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado con base a lo estipulado por el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, por este medio hace **CONSTAR** que:*

El Proyecto de Investigación (Colectivo) “EXPRESIÓN DE IL-1B, OSTEOPONTINA Y MMP-8 EN OSTEÓBLASTOS EXPUESTOS A LIPOPOLISACÁRIDOS, VIBRACIONES DE ALTA FRECUENCIA Y CARGA MECÁNICA. IN VITRO” presentado por el Responsable del proyecto: M.O. Laura Mónica López Pérez, Franco ID 100527897; teniendo como Director Metodológico del proyecto: DC. Miguel Ángel Casillas Santana ID 100526485; teniendo como Director Disciplinario: E.O Alejandro Andrade Torres 100426177; teniendo como alumno al C. Julio César Villegas Aguilar con número de matrícula 221450009; ha sido ACEPTADO y queda registrado en esta secretaría en el libro de registros 07 en la hoja 01 con No. de registro 2022175.

Se extiende la presente constancia en la Heroica Puebla de Zaragoza a los tres días del mes de mayo del año dos mil veintidós.

Atentamente
“Pensar bien, para vivir mejor”
H. Puebla de Z., a 04 de mayo de 2022

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez
Secretario de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



c.c.p. minutario

Facultad
de Estomatología

31 Poniente 1304, Col. Volcanes,
Puebla, Pue. C. P. 72410
01 (222) 229 55 00 Ext. 6400

Agradecimientos

El trabajo que presento el día de hoy es el fruto de la colaboración de muchos maestros, colegas y amigos que, sin su ayuda, este proceso sería una tarea inconmensurable, la cual admito que, si lo fue, pero con la guía correcta y la gran labor que ejercieron mis docentes durante mi formación se logró el objetivo. Quiero agradecer a mis padres Julio y Margarita por siempre estar presentes en todos los aspectos de mi vida apoyando incondicionalmente, a mi hermana Yolanda que sus palabras de aliento y motivación sirvieron de alimento a mi espíritu para continuar con paso firme este largo camino. Quiero hacer un agradecimiento especial al Dr. José Everardo Avelino Cruz y al Dr. Toledo Solano Miller quienes nos apoyaron en este proyecto, otorgándome valiosos conocimientos y me ayudaron a crecer tanto profesional como personalmente, admiro ampliamente su calidad humana y docente. De igual forma me gustaría agradecer a mi comité tutorial, a la Dra. Mónica López, el Dr. Miguel Casillas y el Dr. Alejandro Andrade por seguir luchando y siempre darme su valioso consejo para poder solucionar las adversidades que se fueron presentando en el camino. Ya, por último, pero el más importante de mis agradecimientos es al amor de mi vida Fernanda, quien llegó a mi vida a la mitad de este proceso y estuvo siempre a mi lado apoyándome con sus conocimientos, comprensión y amor, quien con su cariño me levantaba cada vez que me veía frustrado y derrotado, quien me dio siempre palabras de aliento para poder cruzar cada reto que se interponía en mi camino, a ella mi mayor admiración y cariño por siempre.

Índice

1. Resumen y palabras clave	9
2. Introducción	10
3. Antecedentes	11
3.1. Antecedentes generales	11
3.2. Antecedentes específicos	27
4. Planteamiento del problema y pregunta de investigación	33
5. Justificación	34
6. Hipótesis	35
7. Objetivos.....	36
7.1. Objetivo general	36
7.2. Objetivo específico.....	36
8. Material y métodos	36
8.1. Diseño del estudio.....	36
8.2. Población y muestra	37
8.3. Criterios de selección	37
8.3.1. Inclusión.....	37
8.3.2. Exclusión.....	37
8.4. Variables.....	38
8.5. Concordancia y Fiabilidad.....	38
8.6. Ubicación espaciotemporal.....	39
8.7. Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección	39
8.8. Recursos materiales	47
8.9. Recursos financieros	48
8.10. Recursos humanos	48
8.11. Ética y Bioseguridad del estudio	48
8.12. Análisis estadístico	49
9. Resultados.....	50
10. Discusión	57
11. Conclusión	61

12.	Bibliografía.....	62
13.	Anexos.....	71
13.1.	Anexo 1.....	71
13.2.	Anexo 2.....	72

1. Resumen y palabras clave

Introducción: las vibraciones en el contexto de la ortodoncia se han empleado para dos propósitos, uno de ellos consiste en fomentar la señalización del remodelado óseo para aumentar el índice del movimiento dental cuando existe una carga de por medio, por otra parte, el otro propósito se fundamenta en el aumento de la densidad y tejido óseo alveolar con el fin de reducir el índice de recidiva post-movimiento dental. Todas estas aplicaciones de las vibraciones en la ortodoncia presentan poca evidencia a nivel celular. **Objetivo:** el propósito de este proyecto de investigación consiste en realizar una pesquisa a nivel celular de los efectos de las vibraciones de alta frecuencia sobre los osteoblastos, además de establecer un protocolo de cultivo celular y mantenimiento de este, que pueda ser sustentable dentro de las instalaciones de la Facultad de Estomatología (FEBUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. **Resultados:** Se logró elaborar un protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos, el cual puede ser implementado en los laboratorios de la FEBUAP, sin embargo, los osteoblastos no sobrevivieron al proceso de criopreservación y descongelamiento, por otra parte, los fibroblastos lograron proliferar después de la descongelación; además se estableció que los dispositivos de vibración adquiridos por la FEBUAP para la línea de investigación de vibraciones transmiten frecuencias en un rango de 115 a 145Hz. **Discusión:** la manipulación de osteoblastos criopreservados requiere de un mayor control del origen y preservación de las células, por otra parte, el protocolo creado para la FEBUAP es apto para el manejo de los fibroblastos y sus subcultivos. Solo tres de los dispositivos de vibración transmiten vibraciones estables en 115 Hz. **Conclusión:** el laboratorio de la FEBUAP está equipado correctamente para el manejo de cultivos celulares, sin embargo, hay que obtener líneas celulares osteoblásticas más estables, los aparatos vibratorios que manejen frecuencias estables cerca de los 120Hz ± 5 son aptos para usar en el experimento.

2. Introducción

La Asociación Americana de Ortodoncia (AAO) define a la ortodoncia como la especialidad de la odontología encargada de la supervisión, guía y corrección del crecimiento o maduración de las estructuras dentoalveolares; englobando aquellas condiciones que requieren del movimiento dental, o la corrección de malformaciones de las estructuras relacionadas por medio de la aplicación de fuerzas, o la estimulación y redirección dentro del complejo craneofacial.

El presente protocolo pretende enfatizar la importancia de un aspecto notable que existen en la ortodoncia, de los cual dependerá el plan de tratamiento que deberá desarrollar el clínico, como lo es la atención en pacientes con compromiso periodontal, que a su vez recae en el primer aspecto pues dicha situación clínica puede llegar a prolongar el uso de la aparatología, al requerir de constante atención interdisciplinaria.

En los últimos años el uso de vibraciones de alta frecuencia mediante la creación de dispositivos que se pueden encontrar de manera comercial se ha enfocado en la aceleración del movimiento dental y el aumento de la densidad ósea, pese a esto, ambos aspectos presentan información poco contundente respecto a la fisiología del efecto y carecen de sustento científico que justifique ampliamente su uso como coadyuvante en la ortodoncia.

Con base en lo anterior, surge el propósito de realizar un estudio que cuantifique la expresión de osteopontina (OPN), en osteoblastos expuestos a lipopolisacáridos, aplicando vibraciones de alta frecuencia, para con ello obtener resultados que sustenten el uso de estos dispositivos en tratamientos interdisciplinarios de ortodoncia-periodoncia, lo cual beneficiaría a pacientes con compromiso periodontal y facilitaría no solo el tratamiento ortodóntico, pues al mejorar la densidad y calidad ósea se disminuyen los riesgos de pérdida de órganos dentales durante y después del tratamiento de ortodoncia.

3. Antecedentes

3.1. Antecedentes generales

La ortodoncia se considera en gran medida un tratamiento ideal para mejorar la estética y función dento-esquelética, a su vez beneficiar la salud bucodental, y por ende mejorar la calidad de vida del paciente, puesto que todos estos factores repercuten a favorecer el bienestar psicosocial del mismo (1).

La maloclusión se define según la NOM-013-SSA2-2015 (para la prevención y control de enfermedades bucales), como variaciones morfológicas dento-faciales capaces de afectar el estado de salud óptimo del aparato estomatognático en sus vertientes morfológicas, funcional o estética y que en función de su grado de desarrollo podrán o no estar asociadas a condiciones patológicas (2); Por su parte la OMS define a la maloclusión como una anomalía dento-facial incapacitante, que puede afectar estética, función, y bienestar psicosocial (3).

En cuanto al tiempo promedio del tratamiento ortodóntico varía de entre 14 a 33 meses, con un promedio de 19.9 meses, no obstante la American Board of Orthodontics (ABO) estipula un tiempo promedio de 24.6 meses (4); de modo que, el tiempo del tratamiento se verá influenciado por las características propias de cada paciente, dentro de las cuales destacan, la severidad del apiñamiento, etiología de la maloclusión, hábitos parafuncionales, y más enfocado a los intereses de esta investigación el estado periodontal del paciente, de manera que esto conllevara a la selección del plan de tratamiento adecuados (4).

Por consiguiente, en los últimos años se ha indagado en métodos de aceleración del movimiento dental mediante distintas técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas, buscando con ello realizar movimientos fisiológicos y de menor grado de afecciones. De este modo las técnicas quirúrgicas incluyen decorticación alveolar, corticotomía, distracción del ligamento periodontal y distracción dento-alveolar, las cuales se basan en la reducción quirúrgica selectiva que induce un incremento localizado en el recambio del hueso alveolar, sugiriendo un mecanismo oculto en lo observado de

aceleración del movimiento dental (4,5). Mientras que otro mecanismo sugiere que con estas técnicas se remueven las zonas hialinizadas formadas después de la aplicación de la fuerza, lo cual permite una resorción ósea de mayor rapidez que será proporcional a la cantidad de movimiento dental. Por otra parte, las técnicas no quirúrgicas incluyen irradiación con láser de baja intensidad, campos de impulso electromagnético, corrientes eléctricas, uso de fármacos y vibraciones (5); estas por su parte se basan en la estimulación de la proliferación de osteoblastos y osteoclastos, optimizar el movimiento dental, induciendo una remodelación ósea acelerada por el sistema de RANK/RANKL/OPG (5).

Es en este sentido que en los últimos años la odontología se ha centrado en la mínima invasión, la cual a su vez aplicada a la ortodoncia pretende desarrollar métodos más conservadores para el paciente en comparación con las corticotomías. Se ha reportado que las vibraciones fomentan el movimiento y la formación ósea, sin embargo, los estudios muestran un bajo nivel de evidencia o presentan conflictos de intereses por parte de los autores (6).

FISIOLOGÍA DEL MOVIMIENTO DENTAL

El movimiento dental es un proceso fisiológico que combina la adaptación del hueso alveolar, junto con una lesión reversible del periodonto, donde el movimiento está dado por la coordinación y eficiencia del remodelado óseo. En la literatura se pueden encontrar dos teorías acerca del movimiento dental; la primera basada en la bioelectricidad (BE) y la segunda referente a la tensión-presión (TP) (7).

Siendo la segunda la más aceptada hasta el momento, la cual describe que al hacer presión sobre el diente, este cambiará de posición dentro del ligamento periodontal resultando en la compresión del mismo, creando dos áreas, una de tensión y otra de compresión; Es en la zona de compresión donde se lleva a cabo un incremento de la Ciclooxygenasa 2 (Cox-2) que producirá una liberación de prostaglandinas E2 (PGE2), estas a su vez regularán la expresión del ligando receptor activador para factor nuclear κ B (RANKL) y el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF), a su vez, en el mismo sitio se libera el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Sintasa de óxido nítrico endotelial (e-NOS), la Interleucina 1 beta (IL-1 β) y

metaloproteinasas (MMPs), con el fin de favorecer la diferenciación osteoclástica y obtener una resorción ósea (8). Asimismo, se ha reportado que la osteopontina (OPN) también se libera ayudando a la degradación de material osteoide y fijación de osteoclastos en la zona (9).

Por el contrario, en la zona de tensión para inducir la formación ósea, existe una disminución de RANKL, y osteoclastos, que conlleva al aumento de interleucina 10 (IL-10) el cual promueve la expresión de osteoprotegerina (OPG), factor de crecimiento tumoral beta ($TGF-\beta$), inhibidores tisulares de metaloproteinasas (TIMPs), Sintasa de óxido nítrico inducible (iNOS) y de OPN (8)(10).

La teoría de BE estipula que al deformarse el hueso los cristales de hidroxiapatita liberan una señal eléctrica que se consideraba una señal de tipo piezoeléctrica, caracterizada por presentar una decadencia rápida de la carga, ya que comienza de manera inmediata al ejercer una fuerza y desaparece luego de retirar el estímulo, además de generar una señal equivalente hacia el lado opuesto cuando se libera del estímulo (7); se ha observado que en el hueso se originan breves voltajes denominados potencial de transmisión, que se diferencian de la carga de tipo piezoeléctrica y que puede estar influenciado por campos eléctricos externos que son capaces de modificar la actividad celular, demostrando que existe otro tipo de señal eléctrica, la cual no se activa bajo estrés y que está presente en el hueso, a estos breves voltajes se les designa potencial bioeléctrico (7,11).

De la misma forma se apoya en la detección de cargas negativas, que se presentan en el metabolismo activo del hueso cuando este se encuentra en una fase de remodelación ósea (11). El potencial bioeléctrico se lleva a cabo al despolarizarse la membrana ante un impulso nervioso, el cual es acompañado de otras respuestas celulares (11).

La deflexión del hueso alveolar a causa de las fuerzas ortodónticas da lugar a la deformación en la estructura dental, la cual produce una señal eléctrica que altera el metabolismo óseo, transformándose de una carga negativa a una positiva, lo cual estimula a su vez la diferenciación celular, que resulta en el movimiento dental (7).

Por otro lado las fibras periodontales generan estrés sobre el hueso durante las fuerzas ortodónticas las cuales tienen una relación electroquímica, las áreas con carga negativa se caracterizan por niveles elevados de actividad osteoclástica y las áreas con carga positiva se caracterizan por niveles elevados de actividad osteoblástica; por ende se sugiere que la señal piezoeléctrica generada por la deformación ósea puede funcionar como un primer mensajero celular (7,12).

La estimulación con micro pulsos eléctricos cambia el ambiente electrolítico de la membrana celular, modificando el tipo y la velocidad de iones que la atraviesan (11). Estos impulsos también pueden alcanzar a los osteoblastos de forma no invasiva, provocando un aumento en el adenosín monofosfato cíclico (cAMP) y guanosín monofosfato cíclico (cGMP) que actúan como segundos mensajeros en la eficacia del remodelado del hueso alveolar e inducen un movimiento dental (11).

HUESO ALVEOLAR

El hueso alveolar también conocido como hueso dental está constituido por hueso trabecular que contiene una placa de hueso compacto yuxtapuesto al ligamento periodontal denominado lámina dura, el ligamento periodontal atraviesa la lámina dura y se articula al hueso alveolar (13).

El hueso alveolar es un tejido conectivo formado por minerales, matriz orgánica y agua, el 23% representa el tejido mineralizado; el 37 % corresponde a matriz orgánica, que en su mayoría es colágeno y el 40% consta de agua (13).

El hueso alveolar se origina a partir del primer arco branquial el cual contiene el cartílago de Meckel's, y de las células que migran de la cresta neural las cuales forman el tejido ectomesenquimal necesario para la evolución craneofacial. A partir del día 37 de desarrollo aparecen dos bandas de epitelio gruesas y continuas en el lugar de las futuras arcadas dentales, esta banda de epitelio se subdivide en lámina vestibular y lámina dental. La lámina vestibular contiene una capa de ectomesénquima subyacente el cual crea un espacio libre que es el vestíbulo oral; por otra parte, la lámina dental tiene diferentes zonas de actividad proliferativa que

se localizan en las regiones de los futuros procesos alveolares (13). El tipo de osificación que presenta el hueso alveolar es de tipo intramembranoso (14).

Las células que principalmente componen al hueso alveolar son osteoblastos, osteocitos y osteoclastos; sin embargo, también lo acompañan células como adipocitos, células endoteliales y células de defensa como macrófagos. Los osteoblastos son las células encargadas de la aposición del hueso, se caracterizan por ser mononucleadas y especializadas, además comparten cierta función con fibroblastos ya que ambos sintetizan matriz de colágeno tipo I; una característica propia de los osteoblastos es que expresa el gen Runx2, el cual es el encargado de la diferenciación de las células madre progenitoras a osteoblastos. Es de importancia entender que el hueso alveolar es un tejido dinámico y está en constante remodelación por medio de osteoblastos y osteoclastos, los cuales poseen una comunicación cruzada. El número de osteoblastos disminuye con la edad lo que puede ocasionar un desequilibrio entre formación y resorción ósea lo cual origina osteoporosis. Los osteocitos se encuentran dentro del hueso alveolar maduro, estos se derivan de los osteoblastos y el espacio que ocupa es denominado laguna, alrededor de los osteocitos se depositan hidroxapatita, carbonato y fosfato cálcico (13).

La inervación del hueso alveolar se origina del nervio trigémino y se dividen en nervio alveolar superior y nervio alveolar inferior, por su parte el nervio alveolar superior se divide en tres, anterior, medio y posterior. El nervio alveolar anterior superior da sensibilidad a premolares, caninos, incisivos el seno maxilar y el meato inferior, el nervio alveolar medio superior es responsable de dar inervación sensorial a los senos paranasales y premolares superiores, por último, el nervio alveolar superior posterior da sensibilidad a mejillas, seno maxilar y las encías. Todas las ramas del nervio alveolar superior proporcionan sensibilidad al hueso alveolar y encías (13,15).

Por otro lado el hueso alveolar inferior esta innervado por la rama mandibular del nervio trigémino llamada nervio alveolar inferior, este entra por el conducto

mandibular hasta alcanzar el agujero mentoniano, le da sensibilidad a las encías y hueso alveolar de toda la mandíbula (15).

La irrigación sanguínea que acompañan el nervio maxilar y nervio mandibular se encuentra en la región de la protuberancia que proceden de las arterias cerebelosas anteroinferiores, la parte distal proceden de la arteria carótida externa, mientras que el aporte sanguíneo del nervio trigémino procede de la arteria basilar, arterias cerebelosas y arterias vertebrales. El drenaje linfático de los nervios alveolares y zona del hueso alveolar se dirige hacia los ganglios linfáticos submentonianos, submandibulares y periauriculares (15).

Dentro de las funciones principales del hueso alveolar se encuentran servir como tejido de soporte, proporcionando resistencia mecánica, ser un reservorio de iones de calcio, brindar un lugar de protección a la médula ósea, además de albergar las raíces de los dientes, amortiguar las fuerzas de oclusión. El hueso alveolar se puede dividir en dos tipos: el hueso alveolar propiamente dicho y hueso alveolar de soporte. El hueso alveolar propiamente dicho está compuesta por una placa de cortical y es la que se encuentra íntimamente relacionada con la articulación del diente junto con las inserciones de las fibras del ligamento periodontal; el hueso alveolar de soporte se conforma por placas de cortical y hueso trabecular, las placas corticales se localizan en la superficie vestibular y lingual del hueso alveolar, mientras que el hueso trabecular llamado también esponjoso o canceloso se encuentra entre el hueso alveolar propiamente dicho y las placas corticales (16).

HOMEOSTASIS DEL HUESO ALVEOLAR

La homeostasis del hueso alveolar se lleva a cabo por el proceso de remodelación óseo y la reparación de hueso dañado, se tiene un estimado que en adultos el 10% del hueso es reemplazado cada año. El remodelado óseo es un proceso que involucra la coordinación de los tres tipos de células, osteoclastos, osteoblastos y osteocitos. La cantidad de hueso reabsorbida por osteoclastos es la misma cantidad de hueso que es formada por osteoblastos, de esta forma, se mantiene el equilibrio de la masa ósea. Este sistema se conoce como sistema de acoplamiento, consiste en que los productos que secretan los osteoclastos durante la actividad de la

resorción ósea mejoran la formación ósea a través de aumentar el reclutamiento de preosteoblastos o estimulan de forma directa la formación ósea osteoblástica (16). Se ha demostrado que el recambio de hueso alveolar es más rápido en comparación con otros huesos del esqueleto, la razón de esto no está muy clara aún, sin embargo, es posible que una de las razones por el cual la remodelación sea más constante y rápida se el estímulo mecánico durante la masticación; en este sentido se afirma que la masa del hueso y los cambios en su arquitectura son el resultado de la adaptación de las fuerzas mecánicas. Por ejemplo una carga dinámica, pero no estática, aumenta la formación ósea, lo que se traduce en un aumento de la masa ósea, a través de la disminución del RANKL y supresión de la osteoclastogénesis (16).

OSTEOPONTINA

La OPN es una sialoproteína glicosilada altamente fosforilada que se expresa en varios tipos de células tanto en osteoblastos, osteoclastos, osteocitos y odontoblastos, la cual representa un papel importante durante el movimiento ortodóntico al expresarse en el lado de tensión y favorecer la formación ósea. En el sitio de compresión colabora con la diferenciación osteoclástica para contribuir con la resorción ósea (10).

OSTEOBLASTOS

Es menester enfatizar que, los osteoblastos, se consideran células constructoras de hueso, que derivaban de células progenitoras mesenquimales y están presentes en el ligamento periodontal, específicamente en la superficie de la lámina dura y endostio del hueso alveolar; estas células reaccionan en respuesta a la alteración de la formación de la matriz, causada por el cambio de corriente de fluidos en las células de revestimiento óseo, que funcionan como mecanorreceptores en el periodonto (13). Como resultado de la aplicación de una fuerza compresiva sobre el hueso, se producirá la flexión del mismo, la cual es capaz de contribuir en la regulación de la remodelación y formación ósea mediante los osteoblastos (17)(18). Como consecuencia los osteoblastos juegan un papel principal en la formación y remodelación ósea, existe evidencia que su concentración es extensa en el

ligamento periodontal, así lo demuestran Loo-Kirana et al. que compararon la capacidad de osteogénesis entre células tomadas del ligamento periodontal y hueso alveolar, cuantificando fosfatasa alcalina, la capacidad de depósito de calcio y tinción de rojo de alizarina, encontrando que las células del ligamento periodontal demostraron mayor actividad en estos parámetros, con ello se puede concluir que el ligamento periodontal alberga células con mayor actividad osteogénica que las del mismo hueso alveolar (19).

En estudios *in vitro*, la aplicación de fuerzas compresivas en osteoblastos ha evidenciado regular la liberación de IL-1 β e IL-6, mientras que, la aplicación de vibraciones en modelos *in vitro* demuestra que en los osteoblastos se produce un aumento de la liberación de osteoprotegerina (marcador osteogénico) mientras que disminuye el RANKL (17).

Por consiguiente la búsqueda de aceleración del tratamiento dental ha llevado a explorar el uso de vibraciones de alta frecuencia no solo con el fin de estimular una diferenciación celular basada en la teoría TP del movimiento para una remodelación ósea más rápida, si no que se ha propuesto la posibilidad de aumentar la densidad ósea, y con ello mejorar la fase final del tratamiento ortodóntico, es decir la etapa de retención, que a su vez proyecta este efecto benéfico en tratamientos interdisciplinarios como lo es la fase periodontal, es en este sentido que se debe profundizar sobre el cómo actúan las vibraciones y su aplicación en el área de la salud bucodental.

FIBROBLASTOS

El fibroblasto es uno de los tipos celulares más abundantes presentes en el estroma, se conocen generalmente como células que crean y mantienen un grupo diverso de tejidos conjuntivos ricos en matriz extracelular (MEC). Desempeña diversas funciones y constituye la estructura básica de tejidos y órganos, en condiciones de homeostasis, esta célula es responsable del mantenimiento de la MEC. Durante el estrés, los fibroblastos se adaptan a su entorno y tienen la capacidad de responder y enviar señales locales(20,21). Morfológicamente presentan proyecciones citoplasmáticas, que tienen forma de huso alargado o estrellado y proceden de la

mesénquima, son numerosas(21). Dentro de sus funciones principales se puede destacar la síntesis de MEC para la creación de tejido conectivo depositando diversos tipos de colágeno que a su vez forman fibras y laminas(20).

Los fibroblastos poseen una proteína denominada factor de crecimiento de fibroblastos (FCF) que se derivan en 23 familias de las cuales la FCF21 tiene una fuerte conexión fisiopatológica con la regulación de la homeostasis ósea(22). Durante un mecanismo de protección el FCF21 regula la caspasa 3 a través del factor de crecimiento de hepatocitos, protege a las célula madre mesenquimal de médula ósea de la apoptosis e inhibe la apoptosis de los condrocitos mediante la activación de la vía de señalización SIRT1/mTOR al promover aún más el crecimiento óseo y protegiendo los huesos(22).

¿QUÉ SON LAS VIBRACIONES?

Las vibraciones son oscilaciones que ocurren alrededor de un punto en equilibrio y se propagan en cierto medio como el aire, agua o sustrato, las cuales presentan tres características (23):

- **Frecuencia:** Medida en Hertz (Hz) el número de Hz indica la cantidad de ciclos completos de movimientos ascendente y descendente por segundo.
- **Amplitud:** Representa la extensión del movimiento oscilatorio y es medida en milímetros.
- **Dirección:** En la que se distribuye el movimiento vibratorio (23)(24).

Las vibraciones forman parte del ambiente cotidiano, para su detección los humanos poseen una alta cantidad de mecanorreceptores, los cuales se pueden encontrar en piel, ligamentos, articulaciones, vasos y órganos, estos se proyectan a través de la espina dorsal y el tálamo hasta la corteza somatosensorial, varias regiones corticales del cerebro están involucradas en el procesamiento de información vibracional dando lugar a diferentes respuestas físicas y fisiológicas (24).

Existen dos tipos de mecanorreceptores principales, corpúsculos de Pacini o receptores de presión, se localizan en estratos profundos de la piel, y detectan

vibraciones en un rango de 20 a 1000 Hz, con una sensibilidad máxima alrededor de 250 Hz, a su vez son responsables de las sensaciones de vibraciones o cosquilleo y detección de texturas. Por otro lado, los corpúsculos de Meissner o receptores del tacto se encuentran más superficiales, mientras se palpa una textura, la piel la percibe por medio de deformación, y este corpúsculo envía una señal a la corteza somatosensorial, dichos mecanorreceptores tienen un rango de sensibilidad de 5 a 150 Hz con una máxima alrededor de 10-65 Hz. En condiciones normales la estimulación vibracional en la piel activa ambos mecanorreceptores debido a que el rango de frecuencia de la fuente es amplio (24); sin embargo, en el ambiente oral los mecanorreceptores encargados de movimiento dental se encuentran en el periodonto denominados mecanorreceptores de Ruffini tipo I, los cuales se caracterizan por poseer los dos tipos de respuesta, tanto como los de respuesta de adaptación rápida, localizados cerca del centro de resistencia del diente, como los de respuesta de adaptación lenta, que se encuentran cerca del ápice (25); los de adaptación rápida se activan solo cuando hay una carga mecánica de presión, y los de la unidad de adaptación lenta dependientes de la frecuencia y magnitud de carga para la transmisión del impulso (25).

ANTECEDENTES DE VIBRACIONES EN LA MEDICINA

El medioambiente biomecánico influye en las células óseas durante la homeostasis, remodelación y regeneración (26), por lo tanto en el campo de la medicina se han investigado las aplicaciones de las vibraciones de alta frecuencia de magnitud baja (VAF) cuyo rango es de 20 a 90 Hz en promedio, la terapia de VAF en todo el cuerpo es un procedimiento no invasivo y no farmacológico, para la osteoporosis, cicatrización y regeneración ósea, así como para la osteointegración de implantes y prevención del riesgo de fractura (26)(27); esto gracias a las propiedades de las VAF que consisten en mejorar la diferenciación osteogénica de osteoblastos, al aumentar tanto las vías de señalización para la osteoblastogénesis como las citocinas y proteínas que favorecen la formación ósea tales como IL-4, IL-13, IL-17, factor de transcripción 2 relacionado con run (RUNX-2), BMP2 (proteína

morfogénica ósea) y Osteoprotegerina; además, reducen la actividad y diferenciación de osteoclastos disminuyendo los niveles de RANKL (26).

ANTECEDENTES DE VIBRACIONES EN ORTODONCIA

Las vibraciones se introdujeron en el área de la ortodoncia con dos dispositivos que se comercializaron con el objetivo de acelerar el movimiento dental, el AceceleDent® y el Vpro5® que siguiendo las especificaciones del fabricante producen 30Hz y 120 Hz de frecuencia respectivamente (28), sin embargo, la evidencia que existe sobre el efecto de acelerar el movimiento dental es un poco ambigua y los estudios publicados presentan un alto riesgo de sesgo, por lo que la aceleración del movimiento dental aplicando un protocolo de vibraciones queda en controversia (29,30). Por otro lado, se ha reportado que el uso de un estímulo vibratorio producen el efecto anabólico sobre el hueso alveolar (31,32).

En este sentido las Vibraciones de baja frecuencia (VBF) que son aquellas que vibran $\leq 45\text{Hz}$ o Vibraciones de alta frecuencia (VAF) que son frecuencias $\geq 90\text{Hz}$ producen un efecto paradójico sobre el hueso alveolar, creando diferentes reacciones que dependen del contexto en el que se apliquen las vibraciones. Por una parte cuando hay una fuerza ortodóntica creando un movimiento dental el efecto que se consigue es catabólico, sin embargo, en hueso alveolar sano, en proceso de cicatrización post-extracción, e inclusive con osteoporosis las VAF estimulan el crecimiento, aumentan la densidad tisular, volumen óseo, promoviendo un proceso de osteogénesis (32–37). Esto es posible debido a que el hueso alveolar es un tejido mecanosensible que reacciona a diferentes estímulos mecánicos externos, adaptando la masa y estructura ósea en un proceso de remodelación continuo (26,38). Aunado a esto, en el ambiente oral el ligamento periodontal posee mecanorreceptores que dan respuesta a estímulos mecánicos externos denominados Ruffini tipo I, los cuales se caracterizan por poseer los dos tipos de respuesta, tanto como los de respuesta de adaptación rápida, localizados cerca del centro de resistencia del diente, como los de adaptación lenta, que se encuentran cerca del ápice; los de adaptación rápida se activan solo cuando hay una carga mecánica de presión, mientras que los de la unidad de adaptación lenta

dependientes de la frecuencia y magnitud de carga para la transmisión del impulso (39). Al mismo tiempo el estímulo vibratorio se propaga a través de los tejidos, al observar que los efectos anabólicos no solo se vieron aumentados en la zona de aplicación si no también en las áreas adyacentes a este, sin embargo, el efecto se va atenuando cuanto más lejos este del área de aplicación (31,37).

Es importante señalar que el efecto anabólico sobre el hueso alveolar de las VBF o VAF es resultado de la activación de la vía de señalización Wnt canónica (26,38,40). La vía de señalización Wnt canónica actúa a través de los ligandos de Wnt como el Wnt10B, en un inicio las proteínas de la Wnt se une al receptor Frizzled y al co-receptor Lrp5/6 que se encuentran sobre la membrana celular, lo que causa una concentración de β -catenina dentro de los osteoblastos, inhibiendo la degradación de β -catenina fosforilada a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma; la concentración de β -catenina dentro del citoplasma de los osteoblastos produce un desplazamiento de esta enzima dentro del núcleo, donde se une a los factores de transcripción TCF/LEF y regula la expresión de RUNX2. Por lo que cabe señalar que el efecto anabólico de las vibraciones se produce de mayor manera con VAF al promover la proliferación y diferenciación osteoblástica junto con la mineralización de la matriz a través de la activación de la vía de señalización Wnt canónica que induce la liberación de ALP, Runx2, y BMP2 que a su vez median el efecto de las vibraciones de alta frecuencia en los osteoblastos, creando un ciclo (26,38,40,41).

Se tiene reportado que la vía señalización Wnt causa la activación de la osificación tanto intramembranosa como endocondral (41), sin embargo Alikhani et al. mostró en sus resultados que la aplicación de las vibraciones de alta frecuencia en un alveolo en proceso de cicatrización post-extracción ayuda a mejorar este proceso de reparación con base a la proliferación y diferenciación de osteoblastos, así mismo como fomentar la mineralización de la matriz, por otro lado no se observó ninguna formación de cartílago, a lo se sugiere que las vibraciones de alta frecuencia inducen la formación de hueso intramembranoso principalmente y no el crecimiento endocondral (32).

Cabe destacar que existen otros factores que favorecen este efecto anabólico cuando se usan los estímulos vibratorios, como la reducción de la actividad y cantidad de osteoclastos (32,35,42). Del mismo modo el estímulo vibratorio disminuye la expresión del gen SOST y por consiguiente la esclerostina (31,35), El gen SOST codifica la proteína esclerostina y principalmente es secretada por osteocitos y células del ligamento periodontal la cual tiene como función la inhibición de la formación ósea al unirse de forma competitiva al coreceptor Wnt, LRP5/6, la esclerostina provoca la fosforilación y degradación de la beta-catenina y dificulta la activación de los osteoblastos (43,44), en este sentido una disminución del gen SOST representa una inhibición al proceso de resorción ósea.

Se debe resaltar la capacidad de respuesta anabólica que tiene el hueso al aplicar un estímulo vibratorio depende de la frecuencia, el tiempo de exposición y el tipo de hueso que recibe las vibraciones, referente al último punto, los huesos largos y los huesos del faciales no tienen el mismo tipo de formación, estructura y composición celular (45). Los huesos faciales se desarrollan a partir de células de la cresta neural, mientras que los huesos del esqueleto axial se derivan de células del mesodermo, de igual forma tienen un tipo de osificación diferente, los huesos largos poseen una osificación endocondral, mientras que la mandíbula tiene se osifica por un proceso intramembranoso (40). Se ha reportado que los huesos largos y craneales responden de manera diferente a distintas frecuencias de vibraciones, las frecuencias que estimulan la formación ósea en huesos largos van de los 30-90Hz, por lo contrario las frecuencias de 60-120Hz estimulan de mejor manera el efecto osteogénico a los huesos de la mandíbula (40).

El efecto anabólico sobre el hueso alveolar que se consigue con las vibraciones tiene diversas aplicaciones clínicas, como podría ser una regeneración de hueso como parte del tratamiento de una periodontitis el cual se caracteriza por la pérdida de tejido óseo alveolar, o aumentar la densidad tisular con el fin de prevenir la recidiva después de un tratamiento de ortodoncia (33). Cabe destacar que la fase de retención de un tratamiento de ortodoncia se define como el mantenimiento de la posición de los órganos dentales después del tratamiento de ortodoncia con el

objetivo de que puedan cumplir su propósito estético y funcional a lo largo del tiempo que ya no se tienen los Brackets, es la fase final del tratamiento y forma parte importante del seguimiento del tratamiento (46).

En la actualidad existen pocos estudios que exploran la posibilidad de utilizar las vibraciones como parte de un protocolo de retención, unos autores sostienen que no hay diferencia significativa entre usar o no vibraciones (35,42), por otra parte, se ha demostrado que un protocolo de estimulación de incremento acumulativo de VMBF, que consiste en aumentar cada tercer día la frecuencia a la que se expone el hueso alveolar pueden reducir la cantidad de recidiva en dientes que fueron traccionados con fuerzas ortodónticas (33).

Al mismo tiempo las terapias de aplicación local de vibraciones mecánicas se emplean para regular el tono y aliviar el dolor muscular, e incrementar el flujo sanguíneo y circulación linfática, normalmente se emplean en tratamientos de patologías crónicas que afectan articulaciones, tendones o músculos, recientemente las VAF han demostrado ser útiles en la terapias para tratar desordenes de músculos relacionados con la articulación temporomandibular(ATM), a través de disminuir la tensión y dolor muscular de la zona de la ATM (47).

Las estructuras que conforman el periodonto contribuyen a la articulación del diente sobre el alveolo, el cual se compone de hueso, cemento y ligamento; así mismo el hueso alveolar se encuentra en constante remodelación a consecuencia de la adaptación de cargas mecánicas asociadas a la función del aparato estomatognático. La periodontitis provoca un deterioro irreversible de los tejidos de soporte, hasta finalizar en la pérdida de órganos dentarios dando lugar a problemas funcionales y estéticos (48,49). Por ende la periodontitis se va a caracterizar por la liberación de mediadores inflamatorios o enzimas como las metaloproteinasas, las cuales poseen funciones de remodelación y degradación patológica tisular; dentro de la familia de las metaloproteinasas, la MMP-8 es la que tiene mayor actividad durante la periodontitis, ya que al activarse destruye las fibras de colágeno tipo 1, evidenciada mediante su elevación en saliva o líquido crevicular (50). Para mejorar la calidad de vida de pacientes afectados por la periodontitis, es importante

concentrarse en prevenir la pérdida de hueso alveolar, y a su vez favorecer la formación de este (50).

Por lo que se refiere a los beneficios potenciales del tratamiento ortodóntico realizado en pacientes con antecedentes periodontales, destacan la reducción de la migración patológica, el control de la placa bacteriana y el establecimiento de una oclusión ideal que promueva la regeneración de los tejidos periodontales, sin embargo es importante enfatizar que deben ser utilizadas fuerzas ligeras durante las mecánicas ortodónticas para reducir el daño tisular (51). Zhang et al. en el 2017 demostraron que la aplicación de un tratamiento combinado entre ortodoncia y periodoncia puede ser benéfica para el control de niveles de citocinas inflamatorias en pacientes adultos con periodontitis, y con ello contribuir a la regeneración del tejido dañado, incrementar la fijación dental, y restaurar la función tanto masticatoria como estética (51).

LIPOPOLISACÁRIDOS

Los lipopolisacáridos (LPS) son polímeros compuestos de lípidos y azúcares que son segregados por la pared celular de bacterias Gram negativas después de la eliminación de la bacteria patógena, existe evidencia de que los LPS activan procesos celulares a través de los receptores transmembrana tipo Toll 4 (TLR4) e inician el proceso inflamatorio (52). Para el propósito de este estudio, es fundamental recrear un ambiente inflamatorio *in vitro* que mimetice las condiciones a las cuales son expuestas las células durante la enfermedad periodontal, en previos estudios se han utilizado los LPS en distintas concentraciones sobre los cultivos celulares, al crear un ambiente de inflamación que ayude a estimular la liberación de marcadores inflamatorios en cultivos celulares (53).

CORRELACIÓN ORTODONCIA, VIBRACIONES Y PROBLEMAS PERIODONTALES

El uso de vibraciones en ortodoncia se centra en acelerar el movimiento dental, sin embargo, existen otras posibles aplicaciones tales como: reducir las zonas

hialinizadas durante el movimiento dental lo cual disminuye la agresión al periodonto y en ausencia de compresión estimula la formación ósea que a su vez aumenta la densidad (36). Lo descrito anteriormente representa gran utilidad si se relaciona a pacientes con antecedentes de enfermedad periodontal, los cuales requieran de un tratamiento combinado con ortodoncia. El uso de vibraciones se puede aplicar en diferentes tiempos, primero, antes de iniciar el tratamiento para mejorar la densidad ósea del paciente previo a la ortodoncia, segundo, durante el tratamiento con el propósito de favorecer el remodelado óseo, y a su vez reducir la cantidad de fuerzas aplicadas al periodonto, y finalmente, postratamiento, al aumentar la densidad ósea y contribuir la fase de retención.

Para evaluar la posible influencia de las VAF, es necesario observar un ambiente clínico que combine el tratamiento ortodóntico junto con el estado de afectación periodontal del paciente, lo cual resulta imposible éticamente, es por ello que se requiere diseñar un modelo *in vitro* que simule dicho proceso mediante la compresión mecánica y la generación del proceso periodontal durante los diferentes momentos del tratamiento, a su vez, logre cuantificar el perfil de biomarcadores expresados en células expuestas a dichos estímulos, para ello existen pruebas de laboratorio que permiten cuantificar el ARN o DNA y obtener un perfil molecular. Una de las pruebas que se debe utilizar para cuantificar de manera objetiva las expresiones genéticas es la PCR en tiempo real.

PCR TIEMPO REAL

La reacción en cadena de la polimerasa es una técnica inventada por Kary Mullis en 1985 (54), ampliamente utilizada en la biología molecular, dado que permite reproducir *in vitro* millones de copias de ADN, amplificando de manera exponencial la expresión genética por cada ciclo, empleando una muestra de ADN (55). Por ello, es usado de manera rutinaria para detectar secuencias de ADN o ARN de material celular, fluidos corporales y bacterias(54). Dicha técnica se optimizó de manera notable al momento de cuantificar la amplificación de ADN en tiempo real, por medio de la cuantificación de la fluorescencia, para ser denominada PCR en tiempo real

(RT-PCR) (56). Está es una de las variantes que se usa para detectar y cuantificar perfiles de expresión de genes específicos midiendo la fluorescencia en cada ciclo, la intensidad de la fluorescencia es la señal que refleja la cantidad de ADN en una muestra en un tiempo determinado (56)(57); la alta especificidad de la RT-PCR propicia a que sea la primera elección en pruebas de laboratorio donde el interés sea detectar las dinámicas de expresiones genéticas en microambientes *in vitro* (57). Aplicada a nuestra investigación esta prueba resulta de gran utilidad para cuantificar la actividad de la OPN, de una forma rápida y confiable, en un modelo *in vitro*.

3.2. Antecedentes específicos

Con el fin de investigar la relación entre las vibraciones de alta frecuencia y el hueso alveolar, se han realizado diversos estudios con diferentes marcadores y modelos.

Como resultado de lo anterior Nettelhoff et al. en un cultivo de osteoblastos aplicó compresión mecánica la cual fue generada en una atmosfera humificada de CO₂ y 95% de aire a 37°C usando un Flexcell Compression Plus System a una magnitud definitiva de 5 % generando 2 c/Nmm² y 10% generando 4 c/Nmm² por 12 horas aplicada a las células para simular fuerzas ortodónticas moderadas, se analizaron los marcadores de fosfatasa alcalina, osteocalcina, OPN y RANKL con una PCR de transición reversa, además aplicaron la prueba ELISA que cuantificó la OPN; como resultado reportan que la mayor expresión de fosfatasa alcalina se obtiene al aplicar 4 c/Nmm² de presión $p < 0.05$, así como el RANKL y la OPN alcanzan su pico de expresión a los 2 c/Nmm² $p < 0.05$, los autores concluyen que la OPN juega un rol crucial en el proceso de remodelación y se debe realizar una mayor cantidad de estudios para determinar el rol de la OPN durante los movimientos ortodónticos (58).

Se puede señalar también que Li et al. dentro de su trabajo para observar el efecto que tienen las vibraciones sobre los osteoblastos, estimularon células osteoblásticas con un esquema de vibraciones de 35 Hz por 20 minutos al día durante 5 días, cuantificaron la OPN como regulador de la mineralización de la

matriz extracelular, en sus resultados reportan que los niveles de OPN fueron mayores en osteoblastos que recibieron el estímulo vibratorio $p < 0.01$ (59).

Algo semejante ocurre en el trabajo de Choi et al. en el cual investigaron el efecto de las vibraciones sobre la proliferación y diferenciación de osteoblastos, para lo cual expusieron a los osteoblastos a frecuencias de 0 Hz, 30Hz y 300Hz durante 30 minutos por un día, usaron la PCR en tiempo real y cuantificaron la OPN como biomarcador de formación ósea. Como resultado se obtuvo que la OPN se sobre expresó en el grupo que recibió 30Hz, y los grupos con 0Hz y 300Hz no tuvieron diferencia estadísticamente significativa (60).

La osteopontina ha sido usada como marcador genético para confirmar actividad osteogénica, como lo muestra el trabajo de Marędziak et al., quienes por 21 días cultivaron células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo humano en un medio de cultivo osteogénico y las estimularon con vibraciones de 25 Hz, 35Hz y 45 Hz durante 10 min al día por 21 días que duró el cultivo; cuantificaron OPN para observar la actividad osteogénica. Sus resultados dictaminan que los niveles de OPN se aumentaron respecto al grupo control cuando fueron expuestos a vibraciones de 25 Hz y 35 Hz, teniendo mayor expresión el grupo de 25 Hz, por otra parte el grupo que fue estimulado con 45 Hz no tuvo diferencia estadística significativa (61).

Por su parte Judex et al. cuantificaron el perfil de aceleración a nivel celular entre los dos únicos dispositivos de vibraciones enfocados al movimiento ortodóncico, el AcceleDent® y el VPro5® al estimular osteoblastos, aplicando por 20 min al día vibraciones de 30 Hz (AcceleDent®) y 5 minutos al día de 120 Hz (Vpro5®) comparándolos con un grupo control, al tercer día se evaluaron marcadores moleculares de colágeno tipo 1 alfa (COL1A1), Fosfatasa alcalina y el RUNX-2 como indicadores de proliferación osteoblástica y osteogénesis, posteriormente fueron realizadas pruebas de PCR en tiempo real. En sus resultados observaron una mayor expresión de estos tres marcadores sobre el grupo control $p < 0.05$, así como los osteoblastos estimulados a 120 Hz mostraron una mayor expresión que los de 30 Hz $p < 0.05$ (28).

Ru-Lin Huang et al. investigó la influencia de un ambiente inflamatorio in vitro con lipopolisacáridos sobre la proteína-2 morfogenética de hueso (BMP-2) para ello utilizó células madre mesenquimales de medula ósea primaria, tratadas con diferentes concentraciones de lipopolisacáridos para así conseguir un ambiente inflamatorio ideal, a su vez se cuantificó la expresión TNF- α , IL1B, IL-6, al conseguir mimetizar un ambiente inflamatorio permanente y efectivo mediante una concentración entre 0.25 a 2.5 ug/mL por más de 48 horas, dando como resultado la elevación de las expresiones TNF- α , IL-6 e IL-1B, con este ambiente inflamatorio se midió la actividad de BMP-2, así como concluir que el ambiente inflamatorio con lipopolisacáridos ideal es a la concentración 2.5 ug/mL $p < 0.05$ la cual inhibe la diferenciación osteogénica inducidas por las BMP-2 (52).

Así mismo Morinobu et al. investigó el rol de la OPN durante la osteogénesis inducida por un estrés mecánico al someter a las suturas sagitales de ratones a una tensión mecánica mediante la colocación de resortes ortodónticos, y examinó la expresión de OPN durante la formación ósea, reportando que la OPN era abundante en la matriz de hueso recién formado $p < 0.05$, además los osteoblastos que formaban hueso dentro de la sutura mostraron altos niveles de OPN $p < 0.05$. con esto concluyen que la OPN se produce en osteoblastos formadores de hueso que están bajo un estrés mecánico (62).

A la par de los estudios mencionados se encuentran los realizados por el doctor Alikhani et al. quienes en la búsqueda de la aplicación de las vibraciones de alta frecuencia en el hueso alveolar han publicado estudios con modelos de ratas y humanos, en los cuales muestran los diferentes efectos de las vibraciones dependientes del ambiente biológico en el cual se aplique (32,36,63).

Es con base en lo anterior que Alikhani et al. dentro de sus primeros estudios, evalúan el efecto de las vibraciones de alta frecuencia en la cicatrización alveolar mediante un ensayo en 85 ratas a las cuales se les extrajo el tercer molar superior derecho y se dividieron en 3 grupos, un grupo control y dos experimentales, el primero recibió vibraciones de alta frecuencia de 120 Hz, 0.3g y el segundo recibió 4 μ ε (microesfuerzo) de fuerza estática, en los resultados reportan que el alveolo

cicatrizó 62% y 16% $p<0.05$ respectivamente al día 56 en los grupos de vibraciones y fuerza estática; en el grupo de vibraciones, la densidad ósea fue un 28% mayor $p<0.05$, junto con la cantidad de hueso, el marcador de RUNX-2 se expresó en mayor cantidad en el grupo de vibraciones, para concluir que la aplicación de las vibraciones mejoró la cicatrización ósea en el alveolo de extracción (32).

Alikhani et al. en el 2017 demostraron que las vibraciones de alta frecuencia ayudan a la regeneración del hueso alveolar al llevar a cabo un estudio en ratas donde aplicaron vibraciones de alta frecuencia en la cara oclusal del primer molar superior derecho por 5 min al día durante 28 días, al final las ratas fueron sacrificadas y se evaluó la respuesta del hueso alveolar empleando tomografía computarizada, microscopia fluorescente, expresión genética por PCR de transcripción reversa e histología, al cuantificar marcadores genéticos de RUNX2 y BMP2, los resultados reportan que las frecuencias entre 60 Hz y 100Hz poseen mayor actividad osteogénica en ausencia de cualquier carga adicional $p<0.05$, al presentar un incremento en el volumen óseo, densidad de mineralización ósea y aumento en marcadores osteogénicos como Runx2, BMP2 (63).

Es en base en lo anterior que el doctor Alikhani llegó a descubrir que las VAF aplicadas al hueso alveolar poseen dos efectos sujetos al ambiente en el cual sean aplicadas, primero al emplear VAF en hueso alveolar en condiciones fisiológicas, se da como resultado un efecto anabólico donde se observa el aumento en la densidad y formación ósea, el segundo efecto, es el catabólico llevado a cabo en condiciones inflamatorias y dependiente de las cargas mecánicas sobre el ligamento que propicien la inflamación para obtener un aumento en la reabsorción ósea (36).

Para corroborar lo anterior, Alikhani et al. en el 2018 elaboraron un estudio en ratas con diferentes grupos, uno que no recibió ningún estímulo(control), y otro de referencia al cual se le colocó un resorte de cierre en adición a una fuerza de 10 cN o 25 cN por 1 mm de activación, los grupos experimentales recibieron fuerzas ortodónticas en el primer molar superior derecho mediante un resorte de cierre con una fuerza de 10 cN o 25 cN por 1 mm de activación, los cuales fueron expuestos a diferentes vibraciones de 30 Hz, 60 Hz y 120 Hz con diferentes aceleraciones de

0.01 g, 0.05 g y 0.1 g y tiempos de 5 o 10 minutos, luego de ello se midieron varios marcadores de los cuales se puede resaltar la quimiocina motivo C-C ligando2 (CCL2), IL- β , TNF- α y RANKL; en sus resultados reportan que la frecuencia de 120 Hz por 10 minutos tuvo la mayor cantidad de movimiento dental; a su vez destacan que usando vibraciones de 120Hz 0.05 g de magnitud junto con fuerzas ortodónticas encontraron una mayor expresión en la cantidad de citocinas y quimiocinas proinflamatorias como CCL2, IL- β , TNF- α , y RANKL $p < 0.05$ (36); De igual forma en sus resultados observaron un incremento en la cantidad de osteoclastos en el grupo experimental aplicando vibraciones y fuerzas ortodónticas $p < 0.05$. Evidenciando el efecto paradójico, ya que por un lado la aplicación de vibraciones más una fuerza ortodóntica genera inflamación, seguido del remodelado óseo; mientras que por otro lado en ausencia de fuerzas ortodónticas y de inflamación los marcadores proinflamatorios no se elevan y aumenta la densidad ósea, concluyendo que las vibraciones de alta frecuencia sumadas a la aplicación de fuerzas ortodónticas producen un efecto catabólico que tiene un impacto clínico y que en ausencia de fuerzas ortodónticas tiene un efecto anabólico (36).

Es este efecto anabólico descrito por el Alikhani et al. que puede ser aplicado para favorecer el aumento de densidad ósea.

Recientemente Öztürk et al. evaluaron la capacidad de las VAF sobre un modelo de estudio de retención ortodóntica, para lo cual usaron ratas a las cuales se colocó un resorte de cierre con 50 cN de fuerza entre el incisivo y el molar por 10 días, posteriormente al remover el resorte aplicaron vibraciones de alta frecuencia por 10 minutos cada día durante 15 días en el primer grupo, mientras que en el segundo por 7 días, posteriormente se usó tomografía computarizada y PCR en tiempo real para valorar el espesor óseo junto con marcadores de remodelación tales como COX-2 y RANKL; por lo consiguiente descubrieron que el uso de las VAF redujeron los marcadores de reabsorción ósea e inflamación, además de incrementar el trabeculado óseo, con ello concretaron que el uso de VAF en fases posteriores al movimiento de ortodoncia reducen la reabsorción ósea e incrementan la calidad del hueso, disminuyendo la cantidad de recidiva del movimiento dental (33).

Por una parte uno de los estudios más recientes a cargo de Mehment et al. tuvo el objetivo de comprender los posibles cambios en las suturas craneales y la parte de la calvaria ósea al ser expuestas a vibraciones, cuantificando parámetros microestructurales óseos tales como grosor de las suturas craneales, densidad mineral ósea (DMO), el volumen óseo/volumen tisular (VB/VT), el índice de modelo estructural (IME), el grosor trabecular (G.Tb), el número trabecular (N.Tb) y la separación trabecular (S.Tb), para lo cual aplicaron vibraciones de 30 Hz por 20 minutos diarios durante 30 y 60 días en la zona de la articulación temporomandibular. Como resultado reportan que la exposición a vibraciones aumentó significativamente la altura y la anchura craneales, así como las suturas parietotemporal y sagital ($P = 0,021$). El número y la separación trabecular aumentaron, pero el grosor trabecular se redujo en los grupos con vibraciones en comparación con los grupos de control, según el análisis estructural $p = 0,048$. Aunque la densidad mineral ósea de los grupos que recibieron vibraciones disminuyó, sus densidades de volumen/tejido óseo no se alteraron (64).

Como parte importante de nuestra investigación es relevante enfatizar la relación multidisciplinaria entre ortodoncia y periodoncia con tratamientos basados en evidencia con el objetivo de alcanzar mejores resultados y pronósticos más favorables para el paciente afectado por maloclusiones y enfermedad periodontal.

Con objeto de profundizar en la importancia de la combinación entre el tratamiento de ortodoncia junto con el periodontal, Zhang et al. diseñaron una pesquisa para evaluar los niveles de citocinas proinflamatorias en pacientes con periodontitis, con una muestra poblacional de 117 pacientes con enfermedad periodontal que fueron asignados aleatoriamente hacia un grupo base el cual recibió el tratamiento periodontal pertinente o un grupo combinado quien recibe el tratamiento periodontal junto con tratamiento de ortodoncia, además, 52 pacientes sanos como grupo control, en cada grupo se monitorea los siguientes parámetros: profundidad de bolsa, movilidad dental, índice de placa, niveles de inserción clínica, índice de sangrado al sondeo, aparte de tomar muestras del líquido crevicular que fue sometido a una prueba ELISA para cuantificar los niveles de citocinas

proinflamatorias tales como: proteína C reactiva de alta sensibilidad, IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-8, TNF- α y PGE2. Dando como resultado que a los primeros 6 meses de tratamiento el grupo combinado entre ortodoncia-periodoncia muestran una mayor reducción en los parámetros periodontales junto con las citocinas proinflamatorias en comparación el grupo base $p < 0.05$, después de 18 meses los parámetros periodontales y citocinas proinflamatorias del grupo combinado continuaban por debajo del grupo base $p < 0.05$ (51).

Así mismo Hye-Young et al. encontró resultados similares, a lo anterior mencionado, al investigar la asociación entre el tratamiento ortodóntico y la periodontitis con una muestra de 14,693 sujetos mayores de 19 años, divididos en 2 grupos, con tratamiento ortodóntico y otro grupo control, los cuales se sub dividieron en dos, un grupo con enfermedad periodontal y otro sin enfermedad periodontal; fueron evaluados con el índice periodontal comunitario de la OMS, como resultado se obtuvo que el porcentaje de prevalencia de periodontitis en pacientes que tuvieron tratamiento de ortodoncia fue menor con un $p < 0.05$ (65).

Es por lo anterior que se evidencia la estrecha relación que existe entre Orto-Perio, si bien por una parte mejora el estado de los tejidos de soporte, reduce citocinas patológicas y mejora el acceso a la higiene, por otra parte, si no se tiene un estricto control de higiene o no lleva a cabo un correcto diagnóstico y tratamiento, la propia aparatología de ortodoncia puede agravar el estado clínico del paciente. Por ello es fundamental iniciar un tratamiento libre de factores perjudiciales y realizar procedimientos que favorezcan y fortalezcan el estado periodontal previo, durante y post tratamiento.

4. Planteamiento del problema y pregunta de investigación

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En la actualidad el manejo interdisciplinario nos ha llevado a trabajar con un mayor número de pacientes que tienen o tuvieron afección periodontal y requieren de una rehabilitación oral, sustentado en los antecedentes presentados se destaca la

estrecha relación que existe entre la ortodoncia y la periodoncia. Dado que la ortodoncia trabaja a través del hueso y ligamento periodontal, por consiguiente los pacientes que tuvieron enfermedad periodontal precisan procedimientos de mayor complejidad, ya que se trabaja sobre tejidos de soporte dental afectados y que no están totalmente regenerados, estos procedimientos incluyen biomecánicas con fuerzas ligeras, para evitar agravar o aumentar el daño al tejido de sostén, coadyuvantes para aumentar la calidad y cantidad del hueso alveolar como lo son las vibraciones de alta frecuencia. Enfatizando la problemática actual, es que los dispositivos de vibraciones ya están en el comercio y los estudios que reportan el aumento de hueso alveolar usando vibraciones de alta frecuencia son a nivel clínico en animales, no existen suficientes estudios a nivel *in vitro* que demuestre y justifique el uso de las vibraciones para aumentar los marcadores de formación ósea como lo es la OPN en un modelo de células osteogénicas simulando una enfermedad periodontal tratada junto con el tratamiento ortodóntico, aunado a esto en la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (FEBUAP) carece de un protocolo para la elaboración y mantenimiento de cultivos celulares, el cual es indispensable para realizar investigación *in vitro*.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos, es adecuado y viable para desarrollar una línea celular en la FEBUAP?

¿Los dispositivos vibratorios son adecuados para la estimulación vibratoria de células?

5. Justificación

La aplicación de vibraciones de alta frecuencia como coadyuvante en el tratamiento de ortodoncia se ha concentrado en la aceleración del movimiento dental al implicar un aumento de la diferenciación celular, que a su vez lleva a disminuir los tiempos del tratamiento, fenómeno que carece de sustento científico a nivel *in vitro*, no obstante las vibraciones de alta frecuencia tienen como efecto el inducir el

incremento en la densidad y la formación ósea en ausencia de una carga mecánica como lo son las fuerzas ortodónticas, hasta el momento no existe evidencia suficiente que sustente todos los beneficios que ofrecen los dispositivos vibratorios encontrados de manera comercial, por consiguiente es necesario dilucidar este fenómeno anabólico; esta investigación plantea evaluar si el uso de las vibraciones de alta frecuencia resultan útiles para fomentar la osteogénesis estableciendo una alternativa en la atención a pacientes periodontalmente comprometidos, ya que esto implicaría la posibilidad de aumentar la calidad y cantidad de hueso previo al tratamiento y post tratamiento como parte de la fase retentiva. A su vez los resultados del proyecto darían pauta a nuevas investigaciones que se enfoquen al efecto de formación de tejido óseo a nivel in vivo con poblaciones animales o humanos.

Es necesario destacar que la presente investigación creará un protocolo para poder realizar cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos, lo cual será necesario para realizar experimento *in vitro* en células que colaboran en la osteogénesis y remodelado óseo, mediante el cual se simulará la enfermedad y tratamiento periodontal, al agredir las células con lipopolisacáridos, y posteriormente removerlos, continuando con el uso de vibraciones de alta frecuencia (120hz) como factor mecánico osteogénico, obteniendo así como resultado la cuantificación de la expresión de la OPN como marcador osteogénico. Al mismo tiempo es indispensable calibrar los dispositivos vibratorios Vpro5® con la finalidad de cerciorarse de aplicar un estímulo correcto en los futuros protocolos de investigación.

6. Hipótesis

HIPÓTESIS EXPERIMENTAL:

El protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos es adecuado y viable para desarrollar una línea celular en la FEBUAP

Los dispositivos vibratorios son adecuados para la estimulación vibratoria de células

HIPÓTESIS NULA:

El protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos NO es adecuado y viable para desarrollar una línea celular en la FEBUAP

Los dispositivos vibratorios NO son adecuados para la estimulación vibratoria de células

7. Objetivos

7.1. Objetivo general

Creación de un protocolo para cultivo celular de osteoblastos y fibroblastos viable dentro de las instalaciones de la Facultad de Estomatología de la BUAP.

Valorar la fiabilidad de los dispositivos de vibración Vpro5®

7.2. Objetivo específico

ESPECÍFICOS

1. Elaborar un protocolo paso a paso con imágenes ilustrativas para el correcto manejo y creación de cultivos celulares a partir de células crio-preservadas.
2. Calibrar los dispositivos de vibración Vpro5®

8. Material y métodos

8.1. Diseño del estudio

- Observacional
- Analítico
- Longitudinal
- Prospectivo
- *In vitro*

8.2.Población y muestra

POBLACIÓN

Osteoblastos y fibroblastos en criopreservación donadas por la Dra. Lía Hoz Rodríguez del del laboratorio de biología periodontal en la facultad de odontología división de estudios de posgrado e investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Dispositivos vibratorios Vpro5[®] adquiridos por la Facultad de Estomatología de la BUAP.

MUESTREO

Dos crioviales que contienen osteoblastos y otro con fibroblastos con un volumen de muestra de 100 a 250 µL, preservadas a -80°C.

8 dispositivos vibratorios Vpro5[®] adquiridos por la Facultad de Estomatología de la BUAP.

8.3.Criterios de selección

8.3.1. Inclusión

- Células en criopreservación a -80°C.
- Células adheridas.
- Células sin contaminación.
- Dispositivos en buen estado
- Dispositivos con 100% de carga
- Dispositivos con partes con piezas originales

8.3.2. Exclusión.

- Mal manejo de la muestra, al no presentar las condiciones de incubación antes mencionadas.
- Presencia de turbidez del medio.
- Presencia de gránulos en el sobrenadante.
- Presencia de bacterias en el medio.
- Dispositivos que hayan sido reparados
- Dispositivos con falla en duración de la vibración

8.4. Variables

Variables independientes			
Variable	Definición conceptual	Escala	Definición operacional
Tiempo	Período determinado durante el que se realiza una acción	Cuantitativa Razón discreta	Horas 0, 12, 24 horas
Vibraciones	Oscilaciones que ocurren alrededor de un punto en equilibrio	Cuantitativa Razón Discreta	Hertz (Hz) 120Hz
Variables dependientes			
Osteoblastos	Células formadoras de hueso que surgen de células precursoras mesenquimales	Cuantitativa	Concentración por volumen 1x10 ⁻⁴ ml
Fibroblastos	Células de origen mesenquimal que participa en la homeostasis de los tejidos, crean y mantienen un conjunto de tejidos conectivos.	Cuantitativa	Concentración por volumen 1x10 ⁻⁴ ml

8.5. Concordancia y Fiabilidad

Previa estandarización intra e inter operacional mediante el coeficiente de correlación intraclass en técnicas de cultivo celular y aplicación de vibraciones, con un coeficiente de correlación intraclass para obtener concordancia de los investigadores mayor a 0.80.

La manipulación de los crioviales fueron supervisados por el Dr. José Everardo Avelino Cruz del Instituto de Fisiología de la BUAP, quien es experto en manejo de cultivo celular. La calibración de los dispositivos de vibración fue en supervisión con el doctor Miller de la facultad de Físico Matemáticas de la BUAP.

Se aplicó un sistema de aleatorización simple para seleccionar el dispositivo que se calibró con el plato de cultivo y plato de cultivo junto con agua. El total de los resultados serán reportados, así como todos los datos completos de la investigación.

8.6.Ubicación espaciotemporal

Los resultados preliminares de este estudio se realizaron en las instalaciones de Instituto de Fisiología, Facultad de Físico matemático y la Facultad de Estomatología (FEBUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

8.7.Procedimientos, técnicas y fuentes de recolección

FUENTE DE RECOLECCIÓN

Primarias:

Osteoblastos y fibroblastos que fueron donadas por la Dra. Lía Hoz Rodríguez del laboratorio de biología periodontal en la facultad de odontología división de estudios de posgrado e investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México. Cuantificando la expresión osteopontina en osteoblastos fetales tratados con lipopolisacáridos, aplicando vibraciones de alta frecuencia.

Dispositivos vibratorios Vpro5® adquiridos por la Facultad de Estomatología de la BUAP.

PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

PROTOCOLO PARA LA CREACIÓN DE CULTIVO CELULAR A PARTIR DE UN CULTIVO CONGELADO.

Cultivo celular

El cultivo celular se creó a partir de osteoblastos y fibroblastos donados por la Dra. Lía Hoz Rodríguez del del laboratorio de biología periodontal en la facultad de odontología división de estudios de posgrado e investigación de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Los osteoblastos fueron preservados en un vial criogénico a una temperatura de -80°C , el proceso para la creación del cultivo celular consistió en:

Descongelación del crioval

1. Se descongelaron los crioviales en baño maría a 37°C durante 2 min.
2. En la campana de cultivo se agregó 1ml de DMEM-FBS 10% al crioval. Se resuspendió 3 veces.
3. Se sembró el contenido del crioval en una caja Petri de 35 mm, previamente marcada con el tipo de célula.
4. Se agregó 1 ml más de medio a la caja Petri y se incubó a 37°C , 5% CO_2 durante 4 horas.
 - 4.1. Nota: este ml. pasó primero al crioval para lavar por dentro todas las paredes para remover todo lo que haya quedado.
5. Pasado el tiempo se realizó el recambio de medio con DMEM-FBS 10%.
6. Se observaron al microscopio y se anotaron las observaciones.
7. Se cambió el medio en 24h.

Mantenimiento del cultivo celular

Cambio de medio cada 2 a 3 días

Proceso:

1. Se sacó la caja de Petri de la incubadora.
 - a. Se trabajó en cajas de 35mm con 2ml de volumen de trabajo.
2. Se observaron las células al microscopio.
 - a. Se observó que no esté contaminado el medio, que existan células vivas y calcular la confluencia por campo visual en 40x y 20x.
3. Se pasó la caja Petri a la campana de flujo laminar.
4. Se retiró el volumen de trabajo (2ml) de medio de cultivo.
5. Se agregó 2ml de medio DMEM-FBS 10%.
6. Se regresaron a la incubadora a 37°C , 5% CO_2 .

Lavado celular

Proceso:

1. Se sacó la caja de Petri de la incubadora.
 - a. Se trabajó en cajas de 35mm con 2ml de volumen de trabajo.
2. Se observó el cultivo de células al microscopio.
 - a. Se observó que no esté contaminado el medio, que existan células vivas y calcular la confluencia por campo visual en 40x y 20x.
3. Se pasó a la caja Petri a la campana de flujo laminar.
4. Se retiró el volumen de trabajo (2ml) de medio de cultivo.
5. Se agregó 1 ml de solución salina buffer de fosfato (PBS).
 - a. Para la elaboración del PBS consultar la tabla 1.
6. Se giró la solución PBS alrededor de la caja Petri con movimientos circulares y movimientos hacia adelante y hacia atrás durante 1 min.
7. Se retiró 1 ml de PBS.
8. Se repitió el paso 6 y 7 por dos ocasiones más.
9. Se agregó 2 ml de medio DMEM-FBS 10%.
10. Se regresó a la incubadora a 37°C, 5% CO₂.

Tabla1. Formula y cantidades para la elaboración de salina buffer de fosfato.

Reactivo	Cantidad para añadir (para solución 1X)	Concentración final (1X)	Cantidad para añadir (para solución 10X)	Concentración final (10X)
NaCl	8g	137mM	80g	1.37M
KCL	0.2g	2.7mM	2g	27mM
Na ₂ HPO ₄	1.44g	10mM	14.4g	100mM
KH ₂ PO ₄	0.24g	1.8mM	1.8g	18mM
Si es necesario, el PBS se puede suplementar con lo siguiente:				
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.133g	1mM	1.33g	10mM
MGCl ₂ 6H ₂ O	0.10g	0.5mM	1.0g	5mM

El PBS puede prepararse como solución 1X o como solución 10X. Para preparar 1 litro de PBS 1x o 10X, disuelva los reactivos mencionados anteriormente en 800 ml de H₂O. Ajuste el pH a 7,4 (o 7,2, si es necesario) con HCL y, a continuación, añada H₂O a 1L. Dispensar la solución en alícuotas y esterilizarlas en autoclave durante 20 min a 15 psi (1,05 kg/cm²) en ciclo líquido o mediante esterilización por filtro. Almacenar el PBD a temperatura ambiente.

Cold Spring Harb Protoc; 2006; doi:10.1101/pdb.rec8247

Resembrado

Tripsinización

1. Se sacó la caja de Petri de la incubadora.
 - a. Se trabajó en cajas de 35mm con 2ml de volumen de trabajo.
2. Se observó las células al microscopio.
 - a. Se observó que no esté contaminado el medio, que existan células vivas y calcular la confluencia por campo visual en 40x y 20x.
3. Se pasó la caja Petri a la campana de flujo laminar.
4. Se retiró el volumen de trabajo (2ml) de medio de cultivo.
5. Se agregó 1 ml de solución salina buffer de fosfato (PBS).
6. Se giró la solución PBS alrededor de la caja Petri con movimientos circulares y movimientos hacia adelante y hacia atrás durante 1 min.
7. Se retiró 1 ml de PBS.
8. Se repitió el paso del 5 al 7.
9. Se agregó 1m de Tripsina 1x al 0.25%.
10. Se inició un cronómetro por 7 min.
 - a. Del minuto 1 al 4 se dejó reposar la tripsina.
 - b. Del minuto 4 al 7 se resuspendió el contenido.

Proceso de resuspensión

- i. Se tomaron 800ml del contenido celular en una micropipeta.
- ii. Se fue vertiendo el contenido dentro de la caja de Petri de abajo hacia arriba y en sentido a favor de las manecillas del reloj y por todas las orillas de la caja de Petri.
- iii. Se giró la caja para repetir el proceso en otras zonas.

iv. Ver figura 1.

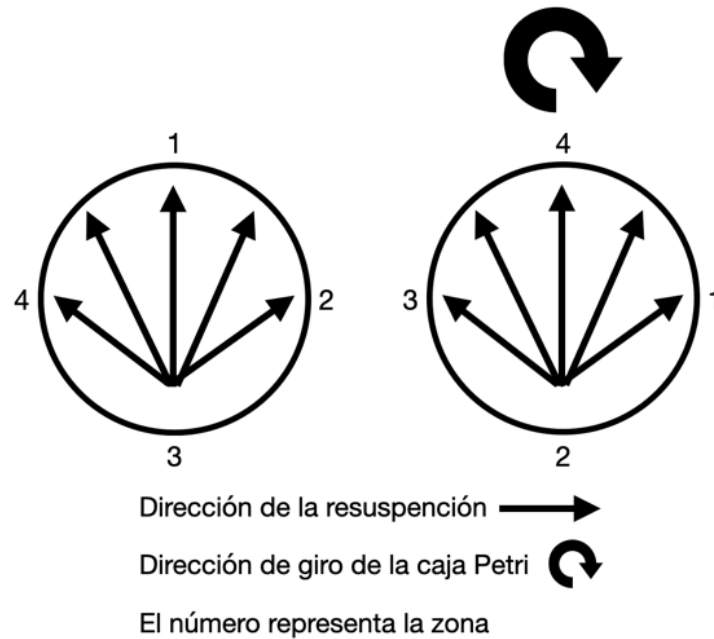


Figura 1. Diagrama del movimiento de la resuspensión. Fuente propia.

11. Se Agregó 1 ml de DMEM-FBS 10%, esto inactiva la acción de la tripsina.

12. Se resuspendió 30 veces.

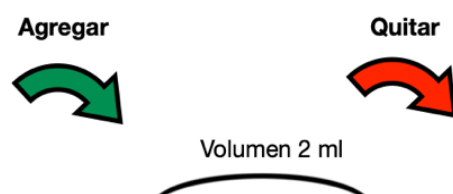
- a. Nota: en este paso la resuspensión se puede hacer tomando 800ml con la micropipeta y soltando poco menos de esa cantidad en la misma zona que se tomó, se debe girar la caja de igual forma.

13. Se observó al microscopio

- a. Se observó que no haya contaminación y que las células estén desprendidas del fondo de la caja de Petri.

14. Está listo para resembrar.

15. El diagrama didáctico de este proceso se puede observar en la figura 2.



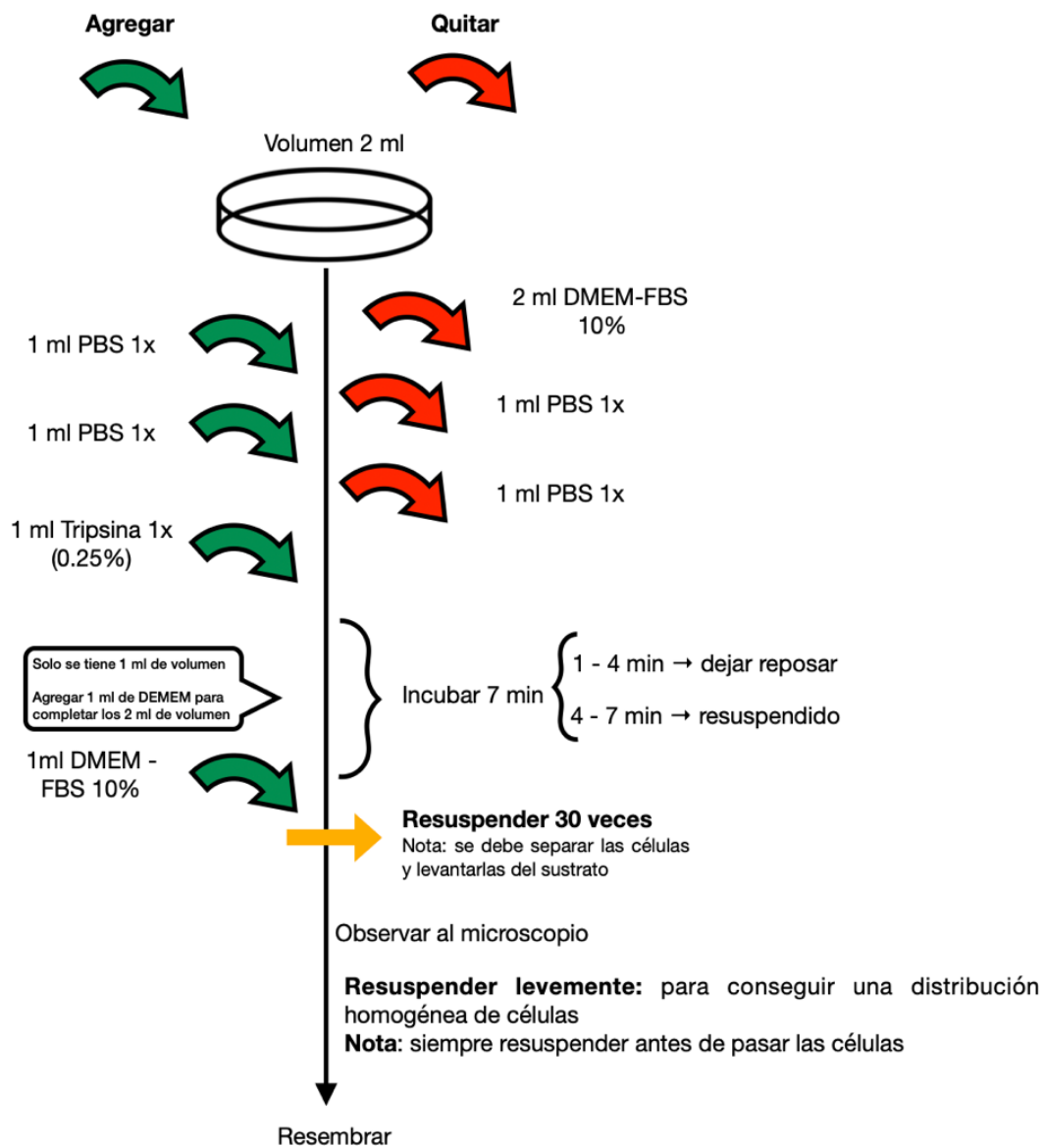


Figura 2. Diagrama del proceso de tripzinización. Fuente propia.

Resembrado

Para resembrado la confluencia dentro de la caja de Petri fue de 100%

Se calculó la disolución de células que quieres resembrar, ej.

1: 10 → 1 parte de células + 9 partes de medio

1: 4 → 1 parte de células + 3 partes de medio

Para este protocolo se decidió trabajar con diluciones de **1:10** por el volumen celular con el que se trabajó

Proceso:

Confluencia celular: 100%

Volumen de trabajo 2ml (2000µL)

Dilución de resembrado: 1: 10 = 200µL de células + 1800µL de DMEM-FBS10%

1. Se trabajó dentro de la campana de flujo tomas tu caja de Petri con las células previamente tripsinizadas.
2. Se resuspendió 3 veces para crear una mezcla homogénea de células.
 - a. Nota: en este paso la resuspensión se puede hacer tomando 800ml con la micropipeta y soltando poco menos de esa cantidad en la misma zona que se tomó, se debe girar la caja de igual forma.
3. Se tomó 200µL de las células y pasarlas a una caja de Petri nueva previamente marcada.
 - a. La caja de Petri nueva fue marcada con: Tipo celular, pasaje, densidad a la cual se sembró, fecha, número de caja, experimentador.
4. Se agregó 1800µL de DMEM-FBS 10% fresco en la caja donde se resembró
5. Se observó al microscopio.
 - a. Se observó que no haya contaminación y que las células no hayan cambiado de forma o estén ponchadas.
6. Se incubó a 37°C, 5% CO₂.
7. Se mantuvo en observación constantemente y cambiar de medio a las 24 horas.

Elaboración de 500ml de medio de cultivo DMEM-FBS 10%

1. Se vertió 450 ml de medio esencial de cultivo en un frasco de cristal estéril graduado para medio de cultivo.
2. Se agregó 50 ml de suero fetal bovino estéril.

3. Se agregó 5ml de antibiótico combinado con antimicótico calculando una concentración de 100u/ml de penicilina.
 - a. Antibiótico combinado contiene:
 - i. Penicilina 10,000 u/ml
 - ii. Estreptomicina 10 µg/ml
 - iii. Anfotericina B 25 µg/ml.

Formula para calcular las unidades de penicilina

Concentración: 100 u → 1 ml

100 u → 1ml

x → 1000ml

x = 100,000 u para un litro

Nuestro antibiotico tiene 10,000u por 1ml

10,000 → 1ml

100,000 → x

x = 10ml

Se necesitan 10 ml de antibiotico para 1 litro para obtener la concentración de 100u/ml

En 500 ml se necesitan 5ml de antibiótico

Caracterización de los dispositivos de vibración

Se calibraron 8 dispositivos de vibración Vpro5 de la casa comercial PROPEL usando un Vibrómetro láser Doppler OMS LaserPoint LP01. Las pruebas consistieron en cargar la batería del dispositivo al 100% de todos los dispositivos y medir diferentes puntos y en diferentes escenarios (figuras 3-5), esto se realizó en 3 etapas:



Etapa 1: Medir 9 puntos del dispositivo

Fig 3. Fuente propia



Etapa 2: Medir 5 puntos del dispositivo con una caja de Petri encima

Fig 4. Fuente propia



Etapa 3: Medir 5 puntos del dispositivo con una caja de Petri encima agregando agua

Fig 5. Fuente propia

8.8. Recursos materiales

Material – Instrumental	
• Campana de flujo laminar	• Frascos o placas de cultivo
• Incubador	• Pipeteador
• Centrífuga	• Puntas de pipeta 1000μL y 200μL
• Microscopio Invertido	• Medio de cultivo
• Refrigerador	• Suero fetal bobino
• Congelador	• Solución salina buffer de fosfato (PBS)
• Cámara de Neubauer	• Suplementos (antibióticos)
• Nitrógeno líquido	• Tripsina 0.25%
• Baño maría	• Jeringas
• Esterilizador	• Agujas
• Bomba de vacío	• Bote para desechos
• Dispositivo Vpro5	• Células
• Vibrómetro laser Vibrómetro láser Doppler OMS LaserPoint LP01	• Dispositivo vibratorio Vpro5
	• Cajas Petri 35mmx10mm

8.9. Recursos financieros

- Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
- Estudiante de posgrado por medio de la beca otorgada por CONACYT

8.10. Recursos humanos

- Tesista: Julio César Villegas Aguilar
- Director de tesis: M.O. Laura Mónica López Pérez Franco
- Asesor disciplinario: E.O. Alejandro Andrade Torres.
- Director metodológico: Dr. Miguel Ángel Casillas Santana.

8.11. Ética y Bioseguridad del estudio

Esta investigación se regirá por los principios de bioética que sigue el Comité de Ética en Investigación de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla los cuales son:

1. Los Principios del Personalismo Ontológico.

- 1.1. Principio de defensa de la vida física (ONU, Declaración Universal de Bioética y Derechos Humanos, UNESCO, 2005) (66).
- 1.2. Seguimiento de los principios de libertad y responsabilidad (la libertad y la responsabilidad están dados por la defensa de la vida ajena y propia)(67).
- 1.3. Totalidad (el principio de totalidad se fundamenta en el principio de la corporeidad humana que es un todo unitario, y debe ir acompañado por el principio de la proporcionalidad terapéutica)(67).

2. Los Principios del Principialismo (68).

- 2.1. Autonomía
- 2.2. La beneficencia
- 2.3. La no maleficencia
- 2.4. Principio de Justicia

BIOSEGURIDAD.

1. Lavado de manos previo y después de terminar
2. Uso de barreras personales, guantes, bata, cubrebocas, lentes y gorro
3. Uso de uniforme completo que consta de zapato tipo médico, quirúrgico, bata de laboratorio
4. El instrumental contaminando se deberá colocar en una bolsa de polietileno antes de ser retirado del área de trabajo
5. Los instrumentos, área y material utilizados deberán ser desinfectados con hipoclorito de sodio al 10% durante 10 minutos previo al lavado
6. No introducir comida ni bebida al área de laboratorio
7. Los residuos biológico-infecciosos se tratarán según la NOM-087 del 2002 para la protección ambiental-salud, ambiental-residuos peligrosos biológico-infecciosos, clasificación y especificaciones de manejo(69).
8. Seguir los lineamientos establecidos en el reglamento de seguridad para los usuarios de instalaciones universitarias que contemplan laboratorios y talleres de la BUAP.

8.12. Análisis estadístico

Se realizará una estadística descriptiva simple con los datos obtenidos en las tablas de recolección de los resultados de la calibración de los dispositivos de vibración Vpro5®, los datos serán vaciados en una tabla de Microsoft Excel 365°.

9. Resultados

RESULTADOS DEL CULTIVO

El cultivo celular se llevó a cabo según el protocolo creado y mencionado previamente en la metodología, el proceso se puede observar en la figura 6.

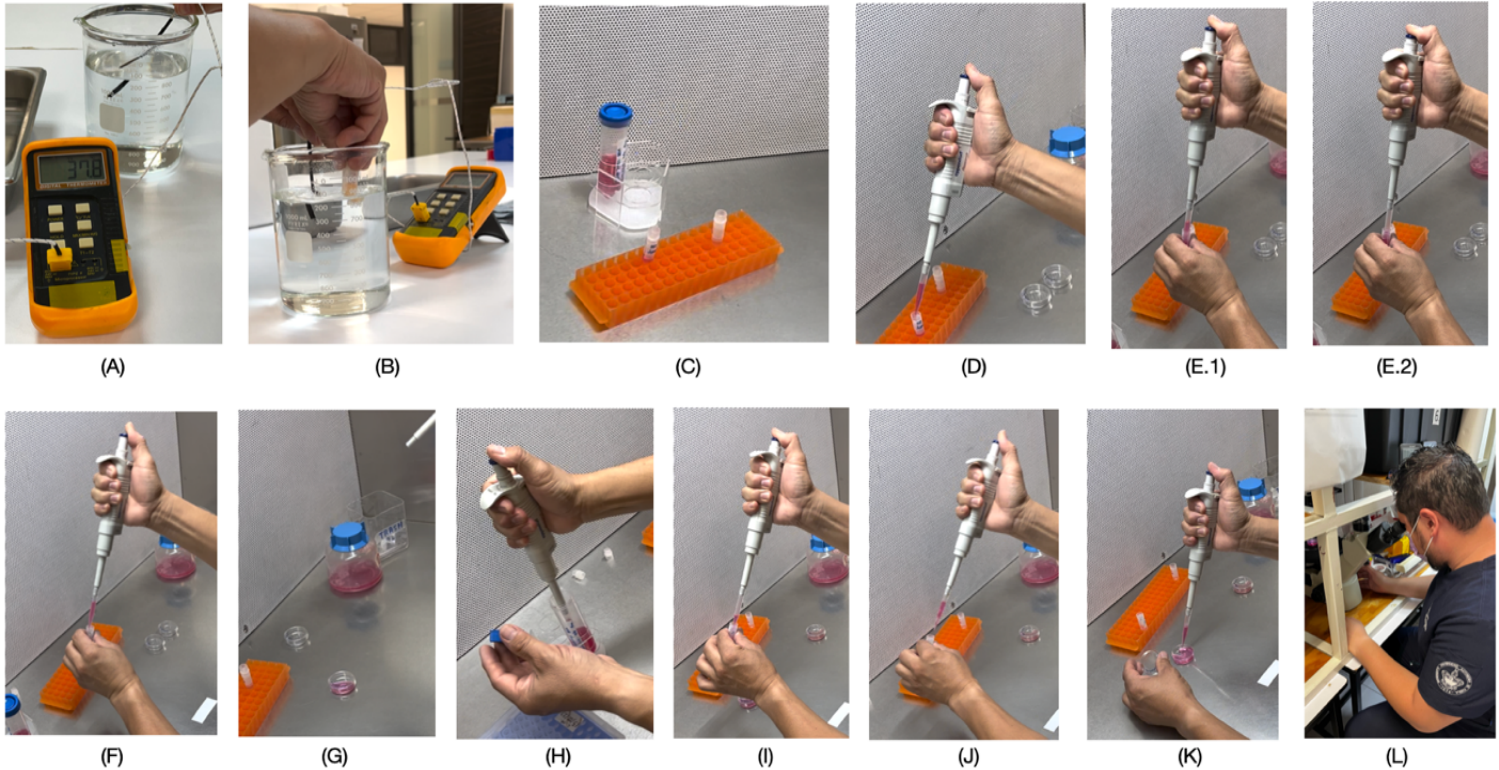
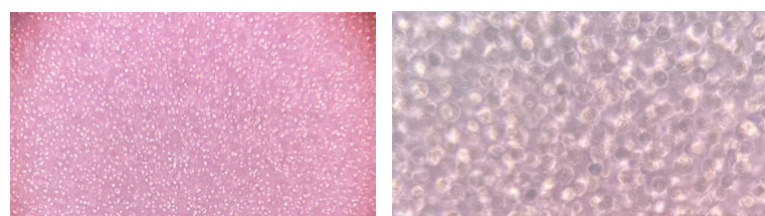


Figura 6. Calentar agua entre 37°C y 38°C (A), Ingresar los crioviales y moverlos en forma circular sin parar por 2 min (B), Meterlos a la campana de flujo laminar (C), Agregar 1 ml de DMEM-FBS10% (D), Se toma <1000µL, se devuelve el medio tomado y se repite el proceso 3 veces (E.1, E.2). Se sembró el contenido del crioval en una caja Petri de 35 mm, previamente marcada con el tipo de célula (F, G). Se toma 1 ml de DMEM-FBS10% (H). Se vierte en el crioval y se lavan todas las paredes (I). Se toma 1 ml del crioval (J). Se vierte el ml en la caja de cultivo (K). Se observan al microscopio (J).

Se tomó un crioval de osteoblastos y otro de fibroblastos para el este proceso. Después de ser descongeladas y sembradas se observan al microscopio a un aumento de x40 y x20, en ambos aumentos y en los osteoblastos se observaron con una confluencia del 100%, por otro lado, en los fibroblastos una confluencia del 85%; respecto a su morfología se puede observar células redondas y sin adherencia en varios puntos focales figura 7 (A, B) y figura 8 (A, B). Los osteoblastos se lavaron con PBS a las 4 horas y las células que quedaron presentan forma redonda la cual se interpreta como falta de adherencia, el medio se observó contaminado por

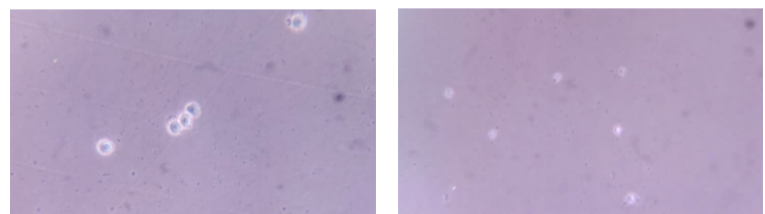
organismos que por el tamaño se infieren que son bacterias, además de quedar pocas células por campo visual figura 7 (C). Después de 24 horas se realizó un cambio de medio por uno fresco de DMEM-FBS 10%, se puede observar bajo microscopio que se encuentran células aún con forma redonda que advierte que siguen sin adherirse, en un aumento x20 se observan confluencia de 4 células por campo visual y otras zonas llegan a verse entre 8 y 10 células figura 7 (D). Después de 72 horas del descongelamiento los osteoblastos se encuentran en una confluencia <10%, no se encuentran adheridos, el medio se encuentra contaminado y turbio, se determina que los osteoblastos no sobrevivieron al proceso de congelamiento-descongelamiento figura 7 (E, F).

Los Fibroblasto se les hace un lavado con PBS a las 4 horas de ser descongeladas y en el microscopio x20 se observa que empiezan a adherirse menos de la mitad las cuales presentan un cuerpo células estrellado y la otra parte sigue con morfología redonda que indica falta de adhesión figura 8 (C). Después de 24 horas se hace un cambio de medio por uno fresco de DMEM-FBS10% y al microscopio se puede observar que en algunas regiones presenta confluencia del 80% y en otras del 30%, ya se encuentran adheridas, se identifican claramente que unas ya presentan un cuerpo celular fusiforme o de estrella, con sus prolongaciones citoplasmáticas figuras 8 (D). A las 72 horas de ser descongeladas los fibroblastos alcanzan la confluencia del 100% en el centro del cultivo, todas se encuentran adheridas, además todas ya presentan un cuerpo celular fusiforme y una largas prolongaciones citoplasmáticas figuras 8 (E), con esta confluencia se pudo realizar un resembrado en tres nuevos cultivos, y después de 5 días de cultivo se observan fibroblastos con una confluencia del 20%, adheridos, con cuerpo celular fusiforme, prolongaciones citoplasmáticas alargadas, núcleos ovales y alargados figura 8 (F), Al sexto día de hacer el subcultivo los fibroblastos alcanzan una confluencia aproximadamente del 40% conservando la adherencia, su cuerpo celular fusiforme, prolongaciones citoplasmáticas alargadas, núcleos ovales y alargados Figura 8 (G).



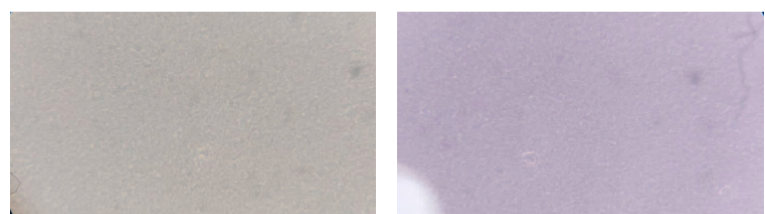
(A)

(B)



(C)

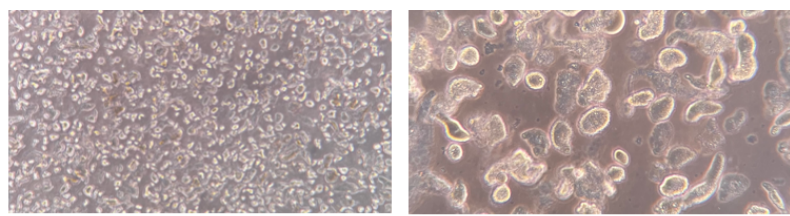
(D)



(E)

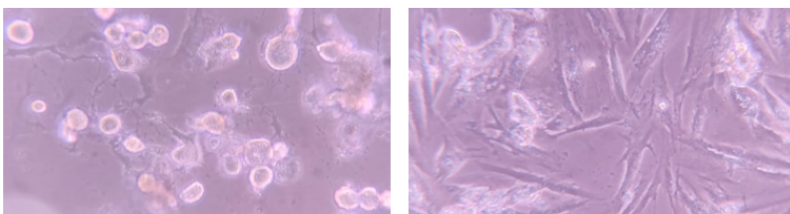
(F)

Figura 7. La concentración de osteoblastos es del 100% por campo visión x40 (A) y x20 (B). Osteoblastos con forma redonda y cerca de un 80% de células visibles flotando, se observa contaminación (C). Osteoblastos con forma redonda 8 a 10 células por campo visual en aumento x20, se observan contaminadas (D). Osteoblastos después de 72h ningún osteoblasto se ve adherido y se observa el medio contaminado en aumento x40 (E) y x20 (F).



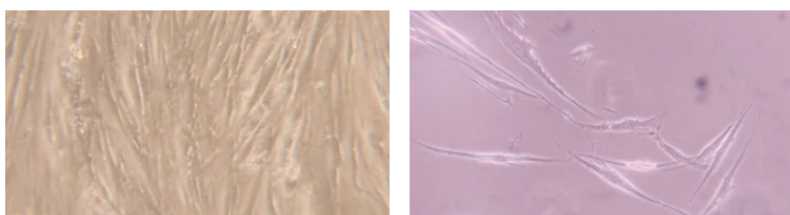
(A)

(B)



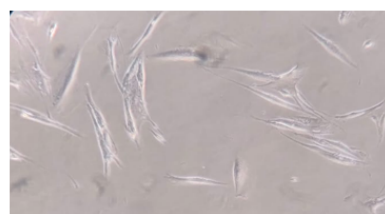
(C)

(D)



(E)

(F)



(G)

Figura 8. Confluencia de fibroblastos del 100 % en aumento x40 (A) y x20 (B). Aumento x20 fibroblastos se comienzan a adherir (C). La confluencia de fibroblastos alcanza el 80% en unas zonas (D). Fibroblastos con confluencia del 100% (E). Fibroblastos del subcultivo a 1 semana después de ser descongelados, confluencia del 20% (F). Fibroblastos del subcultivo en confluencia de 40% (G).

RESULTADOS DE LA CALIBRACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS DE VIBRACIÓN.

Los 8 dispositivos disponibles en la Facultad de Estomatología de la BUAP fueron sometidos a una calibración con el vibrómetro de alta precisión de la marca Americana Optical Measurement System(OMS) modelo LaserPoint LP01, la tabla 2 muestra las diferentes frecuencias que presentan los dispositivos en los 9 puntos de calibración.

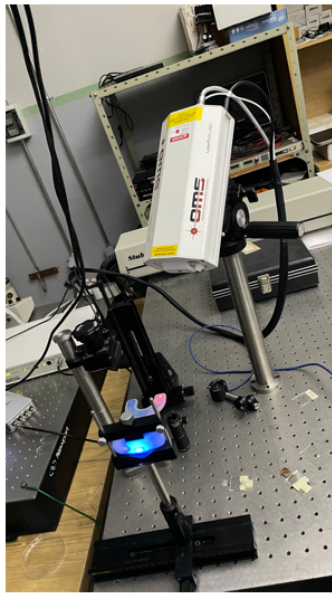
Tabla 2. Resultado de la calibración del dispositivo

Frecuencia (Hz)										
Puntos		1	2	3	4	5	6	7	8	9
Equipo	1	138 Hz	138 Hz	139 Hz	139 Hz	138 Hz	135 Hz	135 Hz	138 Hz	139 Hz
	2	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	118 Hz
	3	140 Hz	140 Hz	140 Hz	139 Hz	139 Hz	139 Hz	139 Hz	139 Hz	139 Hz
	4	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz
	5	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz
	6	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz	115 Hz
	7	142 Hz	143 Hz	143 Hz	143 Hz	142 Hz	142 Hz	140 Hz	143 Hz	142 Hz
	8	134 Hz	138 Hz	136 Hz	134 Hz	135 Hz	133 Hz	134 Hz	135 Hz	135 Hz

Tabla 2. Muestra la frecuencia en Hz de cada dispositivo en los 8 puntos de evaluación

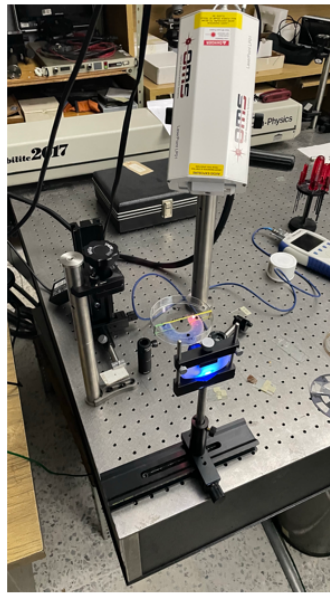
Hz (hertz)

El proceso de calibración de los dispositivos Vpro5 se llevó a cabo dentro de las instalaciones de la Facultad de Físico Matemáticas de la BUAP, supervisado por el Dr. Miller en la primera etapa solo se calibró el dispositivo en los 8 puntos mencionados en la metodología figura 9 (A), en la segunda etapa se calibro un dispositivo con la caja de Petri encima para observar si la distribución de las vibraciones seguía constante figura 9 (B), ya por último se colocó agua dentro de la caja de Petri para evaluar si los líquidos influían en la distribución de las vibraciones figura 9 (C).



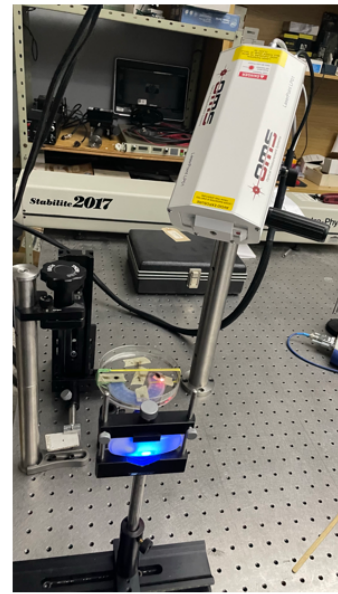
Solo vibrador

(A)



Vibrador con caja de cultivo

(B)



Vibrador con caja de cultivo + Agua

(C)

Fig 9. Proceso de calibración de los dispositivos Vpro5. Calibrando el dispositivo por si solo (A). Calibrando el dispositivo con una caja de cultivo Petri (B), Calibrando el dispositivo con una caja de cultivo Petri y agua en su interior (C). Fuente propia.

En 4 de los dispositivos presentan una variación de vibraciones a lo largo de los puntos de calibración que van fluctuando con frecuencias desde 138 Hz hasta los 143 Hz figura 10 (A, C, G y H). El dispositivo 2 presento una frecuencia constante a lo largo del dispositivo de 115 Hz sin embargo en el último punto el 9 que representa el motor trasmite 118 Hz figura 10 (B). Los dispositivos 4, 5 y 6 mostraron una frecuencia constante de 115Hz a lo largo de todo el dispositivo figura 10 (D, E, F).

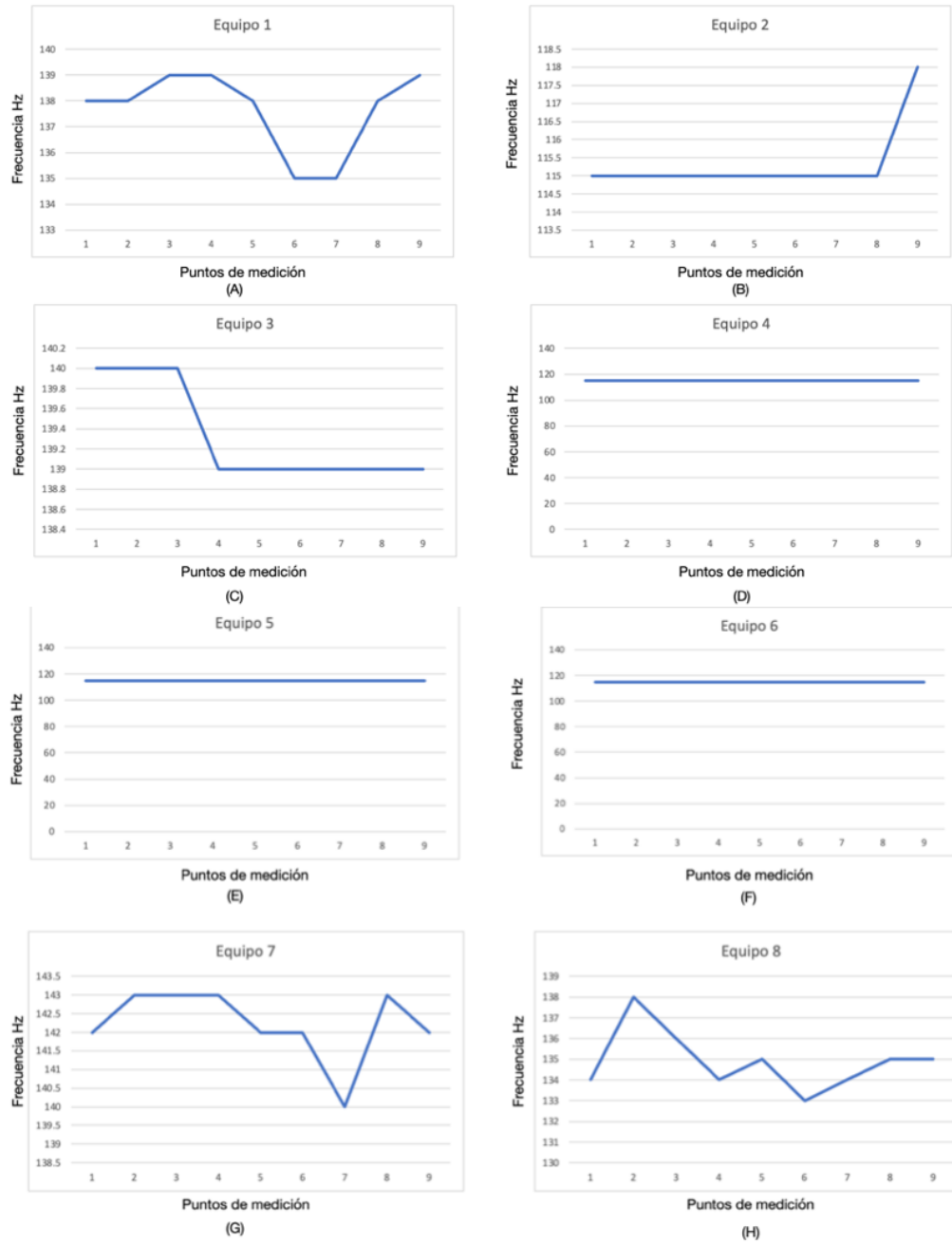


Fig 10. Equipo 1 (A), equipo 2 (B), equipo 3 (C), equipo 4 (D), equipo 5 (E), equipo 6 (F), equipo 7 (G), equipo 8 (H).

Después se realizó una selección al azar de un equipo para la calibración con un pocillo de cultivo encima y un plato de cultivo encima junto con agua los valores obtenidos se pueden observar en la tabla 3. La gráfica de dichos valores se puede observar en la figura 11.

Tabla 3. Frecuencia vibratoria usando un pocillo de cultivo

Puntos	1	2	3	4	5
Sin agua	142 Hz	141 Hz	140 Hz	139 Hz	140 Hz
Con agua	141 Hz	141 Hz	142 Hz	142 Hz	141 Hz

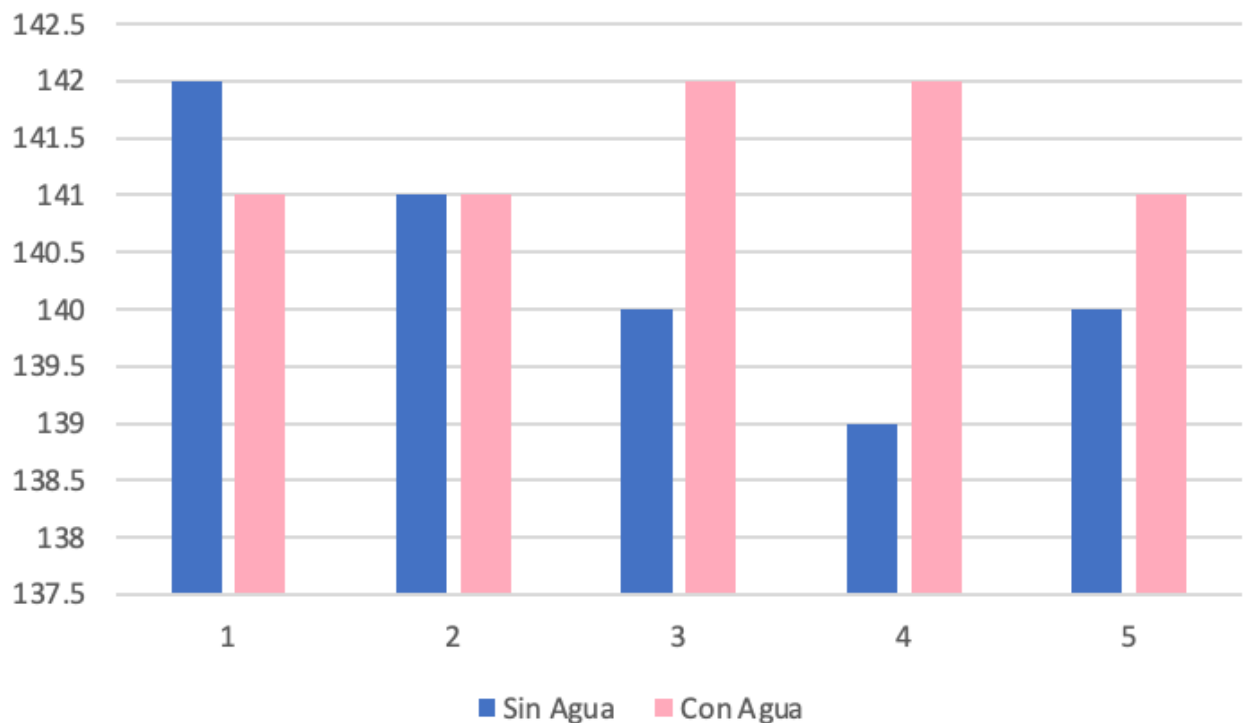


Figura 11. Graficas de los resultados de la calibración del dispositivo con un plato de cultivo sin agua y con agua.

10. Discusión

Esta investigación presentó resultados preliminares del proyecto de investigación registrado ante el CIFE y que lleva como título original “Expresión De Il-1 β , Osteopontina Y Mmp-8 En Osteoblastos Expuestos A Lipopolisacáridos, Vibraciones de Alta Frecuencia Y Carga Mecánica. *In Vitro*”, y que además notificó cambios dentro de su metodología para solo hacer la medición de la OPN y eliminar la parte de la compresión mecánica. Estos cambios se suscitaron debido a la situación tan particular que provocó la pandemia ocasionada por el SARS-CoV-2, la cual limitó el tiempo efectivo en laboratorio y retrasó la llegada e instalación de equipo necesario para la ejecución de la fase experimental. Los detalles se pueden leer en la carta dirigida al C.I.F.E. en el anexo 1.

La preservación y creación del protocolo de la descongelación y creación y mantenimiento de cultivo celular de osteoblastos se estableció con base a lo estipulado en la literatura (70–72). La manipulación y proceso de descongelación y sembrado de cultivo estuvo asesorado por el Dr. José Everardo Avelino Cruz quien es experto en cultivo celular, sin embargo, nuestros resultados reportan que no hubo adherencia de osteoblastos y posteriormente su muerte, esto pudo ser provocado por múltiples factores tales como: el proceso de criopreservación ya que el porcentaje de viabilidad de los osteoblastos se reduce después de la descongelación (73), la actividad metabólica previa a ser criopreservados (70) debido a que si esta se ve reducida previamente a ser congeladas afectara a la hora de la descongelación, la formación de hielo dentro el medio por un proceso de congelación muy rápido (70,73,74), deshidratación de la célula por falta de protector crioprotector (73,74). Baust et al. de igual forma reportan que un factor importante para la correcta criopreservación de las células, es la velocidad de congelación a la cual es sometido el crioval, ya que al congelarse el agua del medio de cultivo y el que se encuentra dentro de las células, se desplaza a través de la membrana plasmática para establecer un equilibrio osmótico en el espacio extracelular, si las células se congelan a alta velocidad el agua tarda más en salir de la célula llegando a formar cristales dentro de ella, esto provoca daños permanentes(75). Por otra parte, si las células se congelan a una velocidad muy lenta sale más agua de la

necesaria y la célula se deshidrata. La mejor forma para la criopreservación es un proceso de congelación con velocidad intermedio, que sería 1° C por minuto hasta llegar la conservación -80°C, aunque la literatura no es clara con ese periodo (70). Otra preocupación a la hora de descongelar las células, es que el crioprotector como el dimetilsulfóxido (DMSO) no se remueva de forma adecuada ya que el DMSO no se desplaza tan fácilmente a través de la membrana a la hora de descongelarse, este puede producir un desequilibrio, al provocar una absorción de agua más rápida de lo que sale el DMSO de la célula, y como consecuencia se produce un hinchazón intracelular que causa daños irreversibles (70). En relación con lo anterior mencionado, en nuestro protocolo las condiciones de cultivo previas a ser donadas no fueron reportadas, la forma de congelación y la criopreservación son indeterminadas ya que no se otorgó ninguna información a la hora de ser donadas y transportadas, esto pudo contribuir al resultado de la viabilidad de nuestras células. En nuestros resultados la densidad celular que se observó a la hora de la descongelación fue del 100%, eran demasiadas células por campo visual, esto también pudo afectar la viabilidad celular a la hora de la criopreservación y al momento de subcultivar, ya que una gran concentración de células dentro de un volumen limitado como lo son los crioviales puede afectar la viabilidad, produciendo un efecto denominado “empaquetamiento”, que consiste en las células empaquetadas con poco espacio (en alta densidad) pueden llegar a sufrir tensiones mecánicas, esto se evita empaquetando en concentraciones más bajas para que puedan alcanzar un equilibrio que permita la concentración celular con un volumen que pueda crioconservarse (74). Cabe destacar que el tiempo de criopreservación de las células donadas para nuestro proyecto de investigación es indeterminado, este podría ser de igual forma una de las causas por las cuales los osteoblastos no hayan sobrevivido, existen estudios en los cuales se conservan células congeladas por un término largo y la viabilidad celular se sigue conservando, como lo reporta Kumr et. al. donde demostró que la criopreservación de células provenientes de la pulpa dental pueden conservarse bajo congelación un término de 1 año sin afectar su viabilidad ni su capacidad de diferenciación en células parecidas a osteoblastos (76). Al mismo tiempo, Woods et al. han demostrado que las células madre que

proviene de la pulpa dental pueden conservarse hasta seis meses sin perder su función (77). De igual forma un tiempo adecuado para preservación de los osteoblastos en congelación puede ser de 3 meses como lo demostró Wang et al. en su estudio, en el cual se sometió a criopreservación osteoblastos por un periodo de 3 meses, reportaron como resultado que la conservación en -196°C no afectó las capacidades de mineralización y depósito óseo (78). Por otra parte, una criopreservación celular en un término largo afecta la viabilidad celular, como lo demostró Badowski et al. donde muestran que la viabilidad de un cultivo de células del estroma mesenquimal criopreservadas por 5 años fue del menos del 20% (79). Respecto a nuestros resultados los osteoblastos no sobrevivieron al proceso de criopreservación y descongelación posiblemente por las razones antes mencionadas, además de que encontrarse contaminadas con bacterias al momento de hacer el sembrado. Por otro lado, los fibroblastos si consiguieron sobrevivir este proceso, puede estar relacionado a la ausencia de contaminación lo cual permitió que se crearan dos subcultivos a partir del cultivo descongelado, además se tiene reportado que los fibroblastos después de pasar por el proceso congelación-descongelación conservan su capacidad proliferativa (80). Esto es consistente con lo determinado por Baust et al. donde en su protocolo de criopreservación afirma que la congelación y preservación de células es un método de almacenamiento a largo plazo de cultivos celulares, proporcionando una copia de seguridad de los cultivos que se encuentran activos, sin embargo, este proceso de criopreservación en múltiples tipos de células es de manera sencilla pero en contra parte hay tipos celulares que son más difíciles de criopreservar y pueden requerir un manejo más específico con condiciones de criopreservación alternativas (70).

RECOMENDACIONES Y SUGERENCIAS PARA LOGRAR UN CULTIVO DE OSTEObLASTOS.

Conforme a lo anterior realizado y el aprendizaje que se generó en este proceso, es importante establecer recomendaciones para el desarrollo adecuado de futuros experimentos con el cultivo celular de osteoblastos.

Se recomienda que el proceso de congelación de dichos osteoblastos donados se por medio de una congelación lenta (3 horas de trabajo), con un volumen de muestra de 100 a 250 μ L, una concentración baja de agente crioprotector (75), ya que esto permite que exista bajo riesgo de contaminación por el crioprotector, el riesgo de contaminación es bajo y las habilidades manuales para manipular no son de alto requerimiento (75). El crioprotector más usado y que mejor da resultados es el dimetilsulfóxido en una concentración de 10% (75,80), por lo que es el recomendado para usarse. Las células que se reciban por donación deberán estar en criopreservación máximo por 1 año, ya que esto afecta a la viabilidad celular de los osteoblastos (76). De igual forma es necesario mencionar que el protocolo de descongelación que usamos en este proyecto es el recomendado (70,81,82). Al mismo tiempo se recomienda el uso de medio de crecimiento específico para osteoblastos para aumentar la posibilidad de proliferación y viabilidad (83).

FIABILIDAD DE LOS DISPOSITIVOS DE VIBRACIÓN

Los dispositivos de vibraciones que se evaluaron no transmiten la frecuencia que viene predeterminada por el fabricante (figura 11), los dispositivos Vpro5 de la marca comercial PROPEL deben transmitir 120Hz según el fabricante, sin embargo, no mencionan que puedan tener una variación de frecuencia, al mismo tiempo solo existe un solo artículo en el cual se use este dispositivo como método para estimular células (28), dentro del trabajo del Judex et al. mencionan que el dispositivo vibran a 120 Hz y se distribuye homogéneamente, pero cabe destacar que este artículo presenta conflictos de interés ya que el profesor Judex es titular de la patente de este dispositivo de vibración (28). En nuestros resultados la frecuencia varia de 115-145 Hz, solo los dispositivos 4, 5 y 6 mostraron tener un comportamiento estable representada por una frecuencia de 115Hz en todos los puntos de evaluación (figura11), por lo que son los seleccionados para ser los encargados de estimular a los osteoblastos durante la fase experimental. No obstante, esta variación de -5 Hz de la frecuencia indicada por el fabricante no representa una diferencia significativa sobre el efecto osteogénico de los osteoblastos el cual es el objetivo en este protocolo de investigación, debido a que el rango de frecuencia que causa un efecto

osteogénico sobre osteoblastos es de 60-120hz, como lo reporta Pravitharangul et al. en su estudio (40). Cabe destacar que la distribución homogénea de las vibraciones hacia las células es importante para obtener resultados que no tengan alguna alteración, todos los diseños en los cuales se estimulan células con vibraciones usan dispositivos los cuales aseguran una distribución homogénea (28,60,61,84).

Como parte complementaria de esta investigación se realizó una revisión sistemática siguiendo los lineamientos de PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) y con registro en INPLASY la cual es una Plataforma Internacional de Protocolos Registrados de Revisiones Sistemáticas y Metaanálisis (INPLASY) con el número de ID: 202280103.

11. Conclusión

El laboratorio cuenta con todos los materiales, instrumentos e instalaciones para recrear el protocolo de cultivo celular que se desarrolló en esta investigación, además la capacitación tomada para este trabajo permitió que se pudiera crear con éxito el protocolo de creación y manejo de cultivo celular, el cual no existía previamente. Los osteoblastos son células que requieren un cuidado más especial por lo que es necesario tener mayor conocimiento del origen de las células y sus requerimientos especiales para poder subcultivarlas de manera adecuada, u otra opción es realizar un protocolo de cultivo de osteoblastos primarios, esto aseguraría que los osteoblastos no pasen por el proceso de criopreservación. Al mismo tiempo el protocolo de cultivo celular es adecuado para los fibroblastos en criopreservación, ya que si lograron adherencia y proliferación. Los experimentos relacionados a la exposición de osteoblastos a vibraciones mecánicas se pueden llevar a cabo con los dispositivos 4, 5, y 6, ahora bien, lo ideal sería adquirir un dispositivo nuevo y que este calibrado a 120Hz, que a pesar de no existir una variación significativa con una desviación estándar de ± 5 Hz sobre el efecto osteogénico que se espera, es imprescindible trabajar con equipos calibrados. Es importante resaltar que este protocolo de investigación será heredado por los alumnos de la línea de investigación de vibraciones de la terminal de Ortodoncia de la FEBUAP.

12. Bibliografía

1. Imani MM, Jalali A, Ezzati E, Heirani Z, Dinmohammadi M. A decision-making process to undergo orthodontic treatment: A qualitative study. *Patient Prefer Adherence*. 2018;12:2243–51.
2. Salud S de. NORMA Oficial Mexicana NOM-013-SSA2-2015, Para la prevención y control de enfermedades bucales. D Of la Fed. 2015;
3. Zou J, Meng M, Law CS, Rao Y, Zhou X. Common dental diseases in children and malocclusion. *Int J Oral Sci [Internet]*. 2018;10(1):1–7.
4. Moresca R. Orthodontic treatment time: Can it be shortened? *Dental Press J Orthod*. 2018;23(6):90–105.
5. Gkantidis N, Mistakidis I, Kouskoura T, Pandis N. Effectiveness of non-conventional methods for accelerated orthodontic tooth movement: A systematic review and meta-analysis. *J Dent*. 2014;42(10):1300–19.
6. Miles P. Accelerated orthodontic treatment - what's the evidence? *Aust Dent J*. 2017;62:63–70.
7. Asiry MA. Biological aspects of orthodontic tooth movement: A review of literature. *Saudi J Biol Sci [Internet]*. 2018;25(6):1027–32.
8. Li Y, Jacox LA, Little SH, Ko CC. Orthodontic tooth movement: The biology and clinical implications. *Kaohsiung J Med Sci*. 2018;34(4):207–14.
9. Vansant L, Cadenas De Llano-Pérula M, Verdonck A, Willems G. Expression of biological mediators during orthodontic tooth movement: A systematic review. *Arch Oral Biol [Internet]*. 2018;95:170–86.
10. Singh A, Gill G, Kaur H, Amhmed M, Jakhu H. Role of osteopontin in bone remodeling and orthodontic tooth movement: a review. *Prog Orthod*. 2018;19(1).
11. Karanth HSD, Shetty KS. Orthodontic tooth movement and the bioelectricity. *Indian J Dent Res*. 2001;12(4):212–21.
12. Proffit WR, Fields HW, Larson BE, Sarver DM. Contemporary orthodontics

6th edition William proffit. 2019. 278, 311 p.

13. Jiang N, Guo W, Chen M, Zheng Y, Zhou J, Kim SG, et al. Periodontal Ligament and Alveolar Bone in Health and Adaptation: Tooth Movement. *Front Oral Biol*. 2016;18:1–8.
14. Minaříková M, Oralová V, Veselá B, Radlanski RJ, Matalová E. Osteogenic Profile of Mesenchymal Cell Populations Contributing to Alveolar Bone Formation. *Cells Tissues Organs*. 2015;200(5):339–48.
15. Nguyen JD, Duong H. Anatomy, Head and Neck, Alveolar Nerve. *StatPearls [Internet]*. 2021;1–5.
16. Omi M, Mishina Y. Roles of osteoclasts in alveolar bone remodeling. *Genesis*. 2022;60(8–9):1–18.
17. Chatmahamongkol C, Pravitharangul A, Suttapreyasri S, Leethanakul C. The effect of compressive force combined with mechanical vibration on human alveolar bone osteoblasts. *J Oral Biol Craniofacial Res*. 2019;9(1):81–5.
18. Holland R, Bain C, Utreja A. Osteoblast differentiation during orthodontic tooth movement. *Orthod Craniofacial Res*. 2019;22(3):177–82.
19. Loo-Kirana R, Gilijamse M, Hogervorst J, Schoenmaker T, de Vries TJ. Although Anatomically Micrometers Apart: Human Periodontal Ligament Cells Are Slightly More Active in Bone Remodeling Than Alveolar Bone Derived Cells. *Front Cell Dev Biol*. 2021;9(September).
20. Plikus M V., Wang X, Sinha S, Forte E, Thompson SM, Herzog EL, et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell [Internet]*. 2021;184(15):3852–72.
21. Dick MK, Miao JH, Limaïem F. Histology, Fibroblast. *StatPearls [Internet]*. 2022 May 8 [cited 2023 May 21];
22. Tang Y, Zhang M. Fibroblast growth factor 21 and bone homeostasis. *Biomed J*. 2022 Jul 16;
23. Shah A. Use of Vibration in Orthodontics A Review. *Int J Adv Res Dev*.

2017;2:26–30.

24. van der Zee EA, Oroszi T, van Heuvelen MJG, Nyakas C. Vibration detection: Its function and recent advances in medical applications. *F1000Research*. 2020;9.
25. Piancino MG, Isola G, Cannavale R, Cutroneo G, Vermiglio G, Bracco P, et al. From periodontal mechanoreceptors to chewing motor control: A systematic review. *Arch Oral Biol* [Internet]. 2017;78:109–21.
26. 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(October).
27. Haffner-Luntzer M, Lackner I, Liedert A, Fischer V, Ignatius A. Effects of low-magnitude high-frequency vibration on osteoblasts are dependent on estrogen receptor α signaling and cytoskeletal remodeling. *Biochem Biophys Res Commun* [Internet]. 2018;503(4):2678–84.
28. 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.
29. Ghadirian H, Yazarloo S, Heidari S, Gholamrezayi E. Mechanical vibration as an adjunct to clear aligner treatment for accelerating tooth movement : A review. *Dent Res J (Isfahan)*. 2022;19(75):1–9.
30. Vega MFG, Pérez-Franco LML, Kanán AD, Méndez CDR, Sainz JES, Cervantes ER, et al. Are mechanical vibrations an effective alternative to accelerate orthodontic tooth movement in humans? A systematic review. *Appl Sci*. 2021;11(22).
31. Alikhani M, Alikhani M, Alansari S, Almansour A, Hamidaddin MA, Khoo E, et al. Therapeutic effect of localized vibration on alveolar bone of osteoporotic rats. *PLoS One*. 2019;14(1):1–23.
32. Alikhani M, Lopez JA, Alabdullah H, Vongthongleur T, Sangsuwon C, Alikhani M, et al. High-Frequency Acceleration: Therapeutic Tool to Preserve

Bone following Tooth Extractions. *J Dent Res*. 2016;95(3):311–8.

33. Öztürk T, Gül Amuk N. Three-dimensional imaging and molecular analysis of the effects of photobiomodulation and mechanical vibration on orthodontic retention treatment in rats: Effects of photobiomodulation and mechanical vibration on orthodontic retention treatment. *J Orofac Orthop*. 2022;
34. Mao JJ, Wang X, Mooney MP, Kopher RA NJ. Strain Induced Osteogenesis of the Craniofacial Suture Upon Controlled Delivery Of Low-Frequency Cyclic Forces. *Front Biosci*. 2003;8:1–10.
35. Yadav S, Assefnia A, Gupta H, Vishwanath M, Kalajzic Z, Allareddy V, et al. The effect of low-frequency mechanical vibration on retention in an orthodontic relapse model. *Eur J Orthod*. 2015;38(1):44–50.
36. Alikhani M, Alansari S, Hamidaddin MA, Sangsuwon C, Alyami B, Thirumoorthy SN, et al. Vibration paradox in orthodontics: Anabolic and catabolic effects. *PLoS One [Internet]*. 2018;13(5):1–18.
37. Alikhani M, Khoo E, Alyami B, Raptis M, Salgueiro JM, Oliveira SM, et al. Osteogenic effect of high-frequency acceleration on alveolar bone. *J Dent Res*. 2012;91(4):413–9.
38. Gao H, Zhai M, Wang P, Zhang X, Cai J, Chen X, et al. Low-level mechanical vibration enhances osteoblastogenesis via a canonical Wnt signaling-associated mechanism. *Mol Med Rep*. 2017;16(1):317–24.
39. Piancino MG, Isola G, Cannavale R, Cutroneo G, Vermiglio G, Bracco P, et al. From periodontal mechanoreceptors to chewing motor control: A systematic review. *Arch Oral Biol [Internet]*. 2017;78:109–21.
40. Pravitharangul A, Suttapreyasri S, Leethanakul C. Mandible and iliac osteoblasts exhibit different Wnt signaling responses to LMHF vibration. *J Oral Biol Craniofacial Res [Internet]*. 2019;9(4):355–9.
41. Houschyar KS, Tapking C, Borrelli MR, Popp D, Duscher D, Maan ZN, et al. Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far. *Front Cell Dev Biol*. 2019;6(January):1–13.

42. Kalajzic Z, Peluso EB, Utreja A, Dymment N, Nihara J, Xu M, 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.
43. Ueda M, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Ikeda E, Kawamoto T. Expression of SOST/sclerostin in compressed periodontal ligament cells. *J Dent Sci [Internet]*. 2016;11(3):272–8.
44. Shu R, Bai D, Sheu T, He Y, Yang X, Xue C, et al. Sclerostin promotes bone remodeling in the process of tooth movement. *PLoS One.* 2017;12(1):1–16.
45. Pravitharangul A, Suttapreyasri S, Leethanakul C. Iliac and mandible osteoblasts exhibit varied responses to LMHF vibration. *Cell Biol Int.* 2018;42(10):1349–57.
46. Kartal Y, Kaya B. Fixed orthodontic retainers: A review. *Turkish J Orthod.* 2019;32(2):110–4.
47. Serritella E, Scialanca G, Di Giacomo P, Di Paolo C. Local Vibratory Stimulation for Temporomandibular Disorder Myofascial Pain Treatment: A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled Preliminary Study. *Pain Res Manag.* 2020;2020.
48. Lori M. Millner, Mark W. Linder and RVJ. Osteopontin regulates dentin and alveolar bone development and mineralization. *Physiol Behav.* 2019;176(3):139–48.
49. Liu J, Ruan J, Weir MD, Ren K, Schneider A, Wang P, et al. Periodontal Bone-Ligament-Cementum Regeneration via Scaffoldolds and Stem Cells. 2019;
50. Keles Yucel ZP, Afacan B, Emingil G, Tervahartiala T, Kose T, Sorsa T. Local and systemic levels of aMMP-8 in gingivitis and stage 3 grade C periodontitis. *J Periodontal Res.* 2020;55(6):887–94.
51. Zhang J, Zhang AM, Zhang ZM, Jia JL, Sui XX, Yu LR, et al. Efficacy of combined orthodontic-periodontic treatment for patients with periodontitis and its effect on inflammatory cytokines: A comparative study. *Am J Orthod*

Dentofac Orthop [Internet]. 2017;152(4):494–500.

52. Huang RL, Yuan Y, Zou GM, Liu G, Tu J, Li Q. LPS-stimulated inflammatory environment inhibits BMP-2-induced osteoblastic differentiation through crosstalk between TLR4/MyD88/NF- κ B and BMP/Smad signaling. *Stem Cells Dev.* 2014;23(3):277–89.
53. de Faria Morandini AC, Sipert CR, Ramos-Junior ES, Brozoski DT, Santos CF. Periodontal ligament and gingival fibroblasts participate in the production of TGF- β , interleukin (IL)-8 and IL-10. *Braz Oral Res.* 2011;25(2):157–62.
54. Harbison AM, Nguyen JNT. PCR: Identification of genetic polymorphisms. *Methods Mol Biol.* 2017;1606:193–203.
55. Larrachea E. Reaccion en cadena de la Polimerasa. *Rev Chil Neuropsiquiatr.* 1997;35(2):247–9.
56. Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: Definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol.* 2017;8(FEB):1–9.
57. S.A. Deepak, K.R. Kottapalli, R. Rakwal, G. Oros, K.S. Rangappa, H. Iwahashi, et al. Real-Time PCR: Revolutionizing Detection and Expression Analysis of Genes. *Curr Genomics.* 2007;8(4):234–51.
58. Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst AM, Goldschmitt J, et al. Influence of mechanical compression on human periodontal ligament fibroblasts and osteoblasts. *Clin Oral Investig.* 2016;20(3):621–9.
59. Li YH, Zhu D, Cao Z, Liu Y, Sun J, Tan L. Primary cilia respond to intermittent low-magnitude, high-frequency vibration and mediate vibration-induced effects in osteoblasts. *Am J Physiol - Cell Physiol.* 2020;318(1):C73–82.
60. Choi D, Ishii T, Ishikawa M, Ootake T, Kamei H, Nagai K, et al. Vertical Vibration of Mouse Osteoblasts Promotes Cellular Differentiation and Cell Cycle Progression and Induces Aging In Vitro. *Biomedicines.* 2023;11(2).
61. 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.

62. Morinobu M, Ishijima M, Rittling SR, Tsuji K, Yamamoto H, Nifuji A, et al. Osteopontin expression in osteoblasts and osteocytes during bone formation under mechanical stress in the calvarial suture in vivo. *J Bone Miner Res*. 2003;18(9):1706–15.
63. Alikhani M, Sangsuwon C, Alansari S, Nervina JM, Teixeira CC. High Frequency Acceleration: A New Tool for Alveolar Bone Regeneration. *JSM Dent Surg [Internet]*. 2017;2(4).
64. Mehment Amuk, Nisa Gül Amuk ZH. Effects of orofacial applications of low-magnitude, high-frequency mechanical vibration on cranial sutures and calvarial bones_ A micro-computed tomography study in rats. *Am J Orthod Dentofac Orthop*. 2022;162(4):459–68.
65. Sim HY, Kim HS, Jung DU, Lee H, Lee JW, Han K, et al. Association between orthodontic treatment and periodontal diseases: Results from a national survey. *Angle Orthod*. 2017;87(5):651–7.
66. Declaración Universal sobre Bioética y Derechos Humanos. 2006 [cited 2023 May 10];
67. Juan García Bioética Personalista Bioética PrinciPialista PersPectivas J, Juan García J, clave P. BIOÉTICA PERSONALISTA Y BIOÉTICA PRINCIPIALISTA. PERSPECTIVAS PRINCIPIALISTIC AND PERSONALISTIC BIOETHICS. SOME PERSPECTIVES. 2013;(1ª).
68. Octavio Rivero Serrano, Raymundo Paredes Sierra, Irene Durante Montiel, Paulina Rlvero Weber AL. Ética en el Ejercicio de la Medicina [Internet]. 1a edición. Ética en el Ejercicio de la Medicina. México; 2006
69. NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, Que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos

biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica., SECRETARIA DE MEDIO AMBIENTE, RECURSOS NATURALES Y PESCA, Estados Unidos Mexicanos; DOF, 07 de noviembre 1995.

70. Baust JM, Campbell LH, Harbell JW. Best practices for cryopreserving, thawing, recovering, and assessing cells. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2017;53(10):855–71.
71. Reid YA. Best practices for naming, receiving, and managing cells in culture. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2017;53(9):761–74.
72. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture: an overview. *Vitr Cell Dev Biol - Anim.* 2017;53(8):669–72.
73. Hernández-Tapia LG, Fohlerová Z, Židek J, Alvarez-Perez MA, Čelko L, Kaiser J, et al. Effects of cryopreservation on cell metabolic activity and function of biofabricated structures laden with osteoblasts. *Materials (Basel).* 2020;13(8):1–14.
74. Pegg DE, Diaper MP, Skaer H le B, Hunt CJ. The effect of cooling rate and warming rate on the packing effect in human erythrocytes frozen and thawed in the presence of 2 M glycerol. *Cryobiology.* 1984;21(5):491–502.
75. Jang TH. Cryopreservation and its clinical applications | Elsevier Enhanced Reader. *Integr Med Res [Internet].* 2017;6(1):12–8
76. Kumar A, Bhattacharyya S, Rattan V. Effect of uncontrolled freezing on biological characteristics of human dental pulp stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2015;16(4):513–22.
77. Woods EJ, Perry BC, Hockema JJ, Larson L, Zhou D, Goebel WS. Optimized cryopreservation method for human dental pulp-derived stem cells and their tissues of origin for banking and clinical use. *Cryobiology.* 2009;59(2):150–7.
78. Wang S, Zhang W, Zhao J, Ye D, Zhu C, Yang Y, et al. Long-term outcome

of cryopreserved bone-derived osteoblasts for bone regeneration in vivo. *Biomaterials* [Internet]. 2011;32(20):4546–55.

79. Badowski M, Muise A, Harris DT. Mixed effects of long-term frozen storage on cord tissue stem cells. *Cytotherapy* [Internet]. 2014;16(9):1313–21.
80. Rodriguez MA, López-López MT, Durán JDG, Alaminos M, Campos A, Rodriguez IA. Cryopreservation of an artificial human oral mucosa stroma. A viability and rheological study. *Cryobiology* [Internet]. 2013;67(3):355–62.
81. Jacob Marsh, RJ Martínez CMK. Thawing, Expanding, and Freezing Human Fibroblasts [Internet]. 2020 [cited 2023 May 11].
82. Reuther T, Rohmann D, Scheer M, Kübler AC. Osteoblast viability and differentiation with Me2SO as cryoprotectant compared to osteoblasts from fresh human iliac cancellous bone. *Cryobiology*. 2005;51(3):311–21.
83. Walker JM. *Bone Research Protocols* [Internet]. Vol. 531, Life Sciences. 2009. 588 p.
84. Zhang C, Li J, Zhang L, Zhou Y, Hou W, Quan H, et al. Effects of mechanical vibration on proliferation and osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Arch Oral Biol*. 2012;57(10):1395–407.

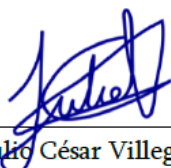
13. Anexos

13.1. Anexo 1

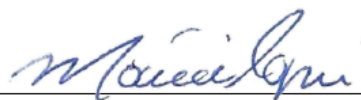
Puebla, Puebla, a 8 de mayo del 2023

Comité Académico de Posgrado:

Por medio de la presente quiero informar que el proyecto de investigación titulado "EXPRESIÓN DE IL-1B, OSTEOPONTINA Y MMP-8 EN OSTEÓBLASTOS EXPUESTOS A LIPOPOLISACÁRIDOS, VIBRACIONES DE ALTA FRECUENCIA Y CARGA MECÁNICA. *IN VITRO*" con número de registro 2022175, presentó múltiples percances que obstaculizaron el correcto desarrollo del mismo; las dificultades que se tuvieron a lo largo de la maestría fueron originadas por la pandemia que provocó el SARS-CoV-2, y fueron las siguientes: el acceso al laboratorio para realizar los experimentos fue concedido hasta la segunda mitad del periodo Agosto-Diciembre 2022, la incubadora de cultivos celulares estuvo instalada y en funcionamiento el día 27 de abril del presente año, además la capacitación para el manejo de cultivos celulares se logró tomar del 20 al 31 de marzo del presente año. Por todos estos motivos solicito poder presentar resultados preliminares, los cuales consisten en la elaboración de un protocolo de descongelación y montaje de cultivos celulares de osteoblastos dentro de las instalaciones de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, cabe mencionar que esta variación en la forma de presentar resultados de mi proyecto de investigación quedó consensuado con el comité tutorial y las autoridades de la terminal, a fin de que pueda presentar mi defensa de grado en tiempo y forma. Además se trabajó en el desarrollo de una revisión sistemática como apoyo del proyecto de investigación titulada "How mechanical vibrations regulate alveolar bone remodeling in animal models and their possible use during and after orthodontic treatment: A systematic review." Esta revisión se registró en la Plataforma Internacional de Protocolos Registrados de Revisiones Sistemáticas y Metaanálisis (INPLASY) el 28 de agosto de 2022 con el número de ID: 202280103 y se enviará a la revista Applied Sciences. Sin otro asunto que atender, agradezco su atención y comprensión.



Julio César Villegas Aguilar
Nombre y firma del estudiante



Dra. Laura Mónica López Pérez-Franco
Nombre y firma de la directora de tesis

13.2. Anexo 2

Revisión sistemática

¿Cómo regulan las vibraciones mecánicas la remodelación ósea alveolar en modelos animales y su posible uso durante y después del tratamiento ortodóncico?: Una revisión sistemática.

1. Introducción

Las vibraciones son oscilaciones que se producen alrededor de un punto de equilibrio, se propagan en un medio determinado (por ejemplo, aire, agua, o el suelo) [1]. Además, las formas de onda de las oscilaciones pueden ser desde muy regulares (sinusoidales) hasta muy irregulares (aleatorias); las vibraciones poseen tres características importantes; 1. frecuencia: número de veces que se desplaza de arriba hacia abajo por completo en un ciclo de 1 s, y su unidad de medida es el Hertz (Hz), 2. amplitud: distancia que recorre el movimiento oscilatorio, medida en milímetros (mm) y dirección: orientación en la que se dirige el movimiento vibratorio [2].

Las vibraciones han tenido un uso exitoso en la medicina general, su comportamiento bifásico explica que, ante la ausencia de compresión mecánica (por ejemplo, la ejercida por la aparatología fija en ortodoncia), promueven un aumento en el anabolismo del tejido óseo lo que permite mejorar su formación y densidad [2], mientras que, en condiciones donde exista compresión (uso de brackets), su efecto será un aumento en el catabolismo [3], lo que deriva en mayor remodelado óseo [3]. Gran parte de su éxito se debe a que son una terapia no invasiva cuya principal aplicación, ha sido el aumento del anabolismo, lo que permite contrarrestar los efectos de la osteoporosis y reducir el riesgo de fractura [4,5]. Sin embargo, para su uso en estomatología, las vibraciones en primer lugar se han clasificado en vibraciones de baja frecuencia (VBF) que son ≤ 45 Hz y vibraciones de alta frecuencia (VAF) que representan frecuencias de ≥ 90 Hz [6], y particularmente en ortodoncia, éstas se han empleado para ambos objetivos (catabolismo y

anabolismo), siendo el catabolismo el más recurrente con el fin de acelerar el movimiento dental [3,7,8], aunque, también se podría aprovechar su efecto anabólico y disminuir la recidiva post tratamiento [9], e inclusive, una tercera alternativa que implica disminuir el dolor durante el tratamiento ortodóncico [10]. Para los objetivos de esta revisión, nos concentraremos en el contraste de la literatura que concierne al efecto anabólico de las vibraciones y como aprovecharlo en beneficio del tratamiento de ortodoncia. Para ello, es importante mencionar que la literatura describe su efecto anabólico como una consecuencia de la presencia de receptores Ruffini tipo I que convierten al tejido óseo en un medio mecanosensitivo, fácilmente adaptable ante este tipo de estímulos [11,12]. Además, se ha determinado que la magnitud del efecto es dependiente de la frecuencia de las vibraciones y el estado de salud del tejido al momento de aplicar el estímulo [13]. Y por último, resaltar que el efecto osteogénico es consecuencia de la activación de la vía Wnt canónica, sobreexpresión de fosfatasa alcalina (ALP) y diferenciación y proliferación de osteoblástica, así como regulación del eje RANK/RANKL/OPG [14-16].

En la actualidad, existe basta evidencia sobre el efecto anabólico de las vibraciones en huesos largos o el sistema esquelético en general [5], sin embargo, hay poca evidencia cuando se trata de la evaluación del mismo efecto osteogénico pero en el hueso alveolar, un estudio reciente realizado por Shipley et al. demostró que las vibraciones de 120 Hz mejoraron la densidad ósea alveolar [11], no obstante, solo existe este estudio clínico en humanos que demostró dicho efecto [11], sin embargo, existen múltiples investigaciones en modelos animales donde el principal objetivo ha sido evaluar el efecto de las vibraciones en el hueso alveolar y en el contexto de la estomatología, lo que su contraste nos permitiría establecer de manera indirecta las implicaciones que el uso de las vibraciones podría tener durante el tratamiento ortodóncico en humanos.

Por lo tanto, el objetivo de esta revisión sistemática es contrastar la evidencia existente con respecto al uso de vibraciones mecánicas y su efecto sobre la

densidad y/o actividad osteogénica del hueso alveolar en modelos animales y su posible aplicación durante el tratamiento de ortodoncia.

2. Material y métodos

Esta revisión sistemática se desarrolló siguiendo las recomendaciones de PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-Analyses) [17].

2.1. Métodos de búsqueda para la identificación de estudios

Se desarrolló una pregunta precisa en congruencia con el principio P.I.C.O. (participantes, intervención, control y resultados). La pregunta concreta fue: ¿la aplicación de vibraciones de alta o baja frecuencia aumenta la densidad ósea u osteogénesis en hueso alveolar de modelos animales?

(P) Población: animales

(I) Intervención: aplicación de vibraciones de cualquier frecuencia en el hueso alveolar, sin restricción en el periodo de aplicación.

(C) Comparación: modelos de animales que no aplicaron estímulo mecánico vibratorio

(O) Resultados: Cuantificación de la densidad ósea alveolar u osteogénesis en hueso alveolar, aplicando vibraciones de alta o baja frecuencia, antes, durante o después de la aplicación de fuerzas ortodóncicas.

Este protocolo se registró en la Plataforma Internacional de Protocolos Registrados de Revisiones Sistemáticas y Metaanálisis (INPLASY) el 28 de agosto de 2022 con el número de ID: 202280103.

2.2. Fuentes de información

Se realizó una búsqueda electrónica desde enero de 2022 hasta abril de 2023 en las siguientes bases de datos: PubMed, Scopus y Web of Science. Además, también se realizó una búsqueda manual en la lista de referencias de los artículos incluidos; sólo se incluyeron artículos publicados en lengua inglesa y no se aplicaron limitaciones en cuanto al año de publicación. Las principales palabras clave para la

estrategia de búsqueda fueron: 1) high-frequency vibrations, low frequency vibrations, cyclical forces, mechanical stimuli, mechanical signals 2) alveolar bone, craniofacial skeleton, maxilla bone. 3) bone density, osteogenesis, orthodontic relapse, bone-remodeling 4) 1 Y 2 Y 3.

2.3. Criterios de elegibilidad

2.3.1. 2.3.1. Criterios de inclusión

- (1) Todos los estudios publicados con modelos animales.
- (2) Estudios con animales en los que se apliquen vibraciones.
- (3) Artículos en los que se evalúe la densidad o la osteogénesis y su respectivo grupo control.
- (4) Se tendrán en cuenta todas las publicaciones excepto aquellas en las que no esté disponible el texto completo del artículo o no se especifique la afiliación de los autores o el lugar de publicación.
- (5) Sólo artículos publicados en inglés.

2.4. Criterios de exclusión:

- (1) Estudios en los que no se mencione la frecuencia de las vibraciones.
- (2) Estudios que no evalúen la densidad o la osteogénesis a nivel alveolar
- (3) Modelos en los que se hayan aplicado medicamentos u otros tratamientos al grupo control, estudios en los que los resultados no sean claros o estén incompletos.

2.5. Métodos de selección y extracción de datos

La selección de los artículos corrió a cargo de tres investigadores independientes expertos en la materia. En la primera fase, la búsqueda electrónica arrojó 65 artículos; se descartaron los duplicados, se revisaron los títulos y resúmenes y se eliminaron artículos irrelevantes y los que no cumplían los criterios de inclusión. En la segunda fase, se revisaron los artículos de registro potencialmente adecuados y se eliminaron los que estaban incompletos, no estaban disponibles y los que no

cumplían los criterios de elegibilidad. El proceso de identificación, selección y exclusión de estudios se muestra en un diagrama de flujo de acuerdo con la declaración PRISMA (figura 1).

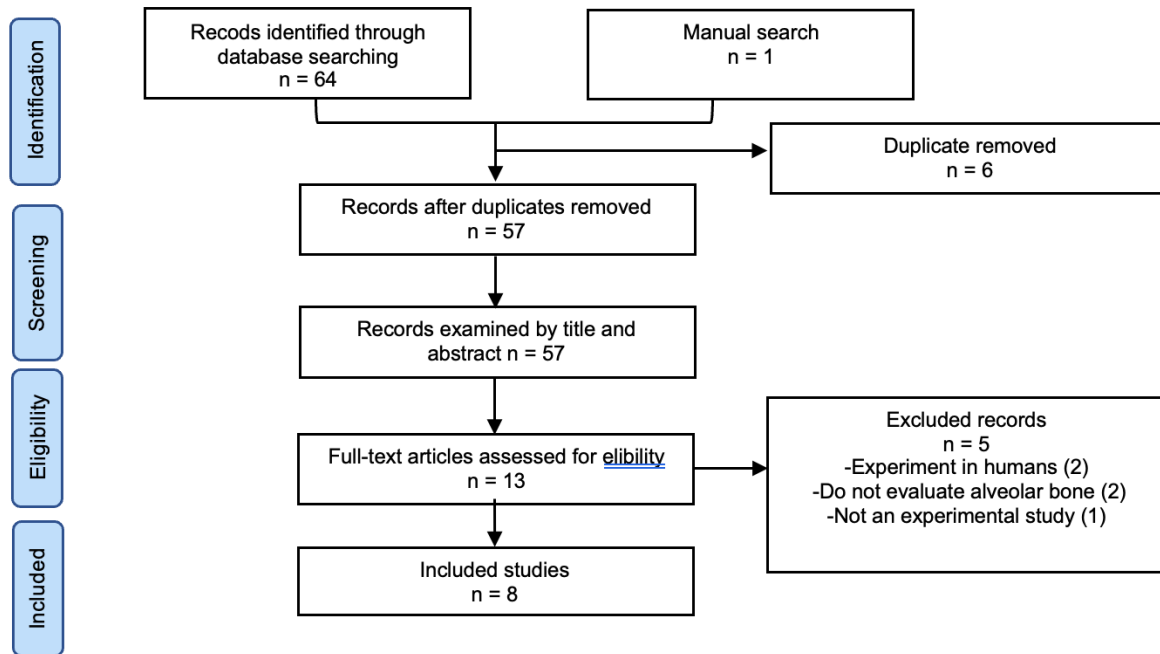


Figura 1. PRISMA Flujo de proceso de selección.

2.5.1. Proceso de recolección de datos

Los datos recogidos fueron extraídos por dos autores (JCVA, MACS) utilizando una tabla de homogeneización: autores, año de publicación, origen, diseño del estudio, especie, sexo, edad, muestra, régimen de vibración (frecuencia, aceleración, magnitud, duración), cuantificación de la densidad ósea, cuantificación de la osteogénesis. Los datos se contrastaron para comprobar su validez, y cualquier discrepancia se determinó para reexaminar el estudio.

2.5.2. Evaluación del riesgo de sesgo y calidad.

Cada análisis de riesgo de sesgo y calidad fue realizado por tres revisores (J.C.V.A, M.C.S y L.L.P.F) y, en caso de no coincidencia, se consultó a un tercer revisor (A.A.T). El riesgo de sesgo fue realizado según la herramienta del Centro de Revisión Sistemática para la Experimentación con Animales de Laboratorio

(SYRCLE) [18]. Esta herramienta consta de diez ítems relacionados con el sesgo de selección, el sesgo de rendimiento, el sesgo de detección, el sesgo de fricción, el sesgo de informe y entre otros. El RoB atribuido para cada dominio podía ser alto, poco claro o bajo. Además, se realizó una evaluación de la calidad de acuerdo con Animal Research: Notificación de Experimentos In Vivo (ARRIVE) [19].

2.6. Síntesis de los resultados

Se realizó una búsqueda sistemática y cualitativa con la información recogida en los artículos, y se presentó de forma narrativa y resumida en tablas, correlacionándose los resultados entre los artículos.

3. Resultados

3.1. Selección de los estudios.

Se incluyeron ocho artículos en los que se evaluó el efecto de las vibraciones sobre el hueso alveolar; un estudio utilizó un conejo blanco [20], seis estudios se realizaron en ratas Sprague-Dawley [3,6,9,13,21,22] y un estudio en ratones [23].

3.2. Características generales de los estudios

Todos los estudios incluidos utilizaron vibraciones mecánicas, cinco aplicaron VBF($\leq 45\text{Hz}$) [6,9,20,21,23], y tres incluían VAF ($\geq 90\text{Hz}$) [3,13,22] en sus protocolos. Independientemente del estudio, todos ellos tenían como objetivo principal evaluar el efecto de las vibraciones mecánicas sobre la formación de hueso alveolar, midiendo para ello, longitud craneofacial [20], efecto osteogénico, grosor trabecular, densidad ósea, volumen óseo y marcadores osteogénicos mediante diferentes técnicas [3,6,9,13,21-23]. El número de animales utilizados en los experimentos de los estudios osciló entre 13 y 206. En los seis estudios realizados con ratas, la edad de éstas oscilaba entre 1,5 y 4 meses. [3,6,9,13,21,22]; de los estudios realizados en conejos y ratones, la edad era de 1,5 meses y 3 meses, respectivamente [20,23], los principales resultados de los artículos incluidos se resumen en la tabla 1.

Tabla1. Principales resultados de los estudios incluidos

Author / year / pais	Desing of study	Sample	Groups	Protocol	Measurement	Results	Conclusion
Mao (2003) U.S.A.	<i>In vivo</i>	N=21M Age: 6-weeks-old Spices: white rabbits	EG1: n= 4, tensile cycled forces of 2N with 0.1 Hz EG2: n= 5, tensile cycled forces of 2N with 0.2 Hz EG2: n=, 2 N of static forces over pre maxilla suture CG: n= 4	0.2 Hz for 10 min/d over 12 days	Craniofacial length	Craniofacial length was significantly higher when cyclic forces at 0.2 Hz was applied	Cyclic forces involve activation of stress-sensitive genes, leading more craniofacial growth and osteogenesis
Alikhani (2012) U.S.A.	<i>In vivo</i>	N= 85 M Age: 120 days Spices: Sprague-Dawley rats	EG: n=43 different high-frequency accelerations vibration SC: n=23 4 μ ε of static load over the maxilla CG: n= 19	30,60,100 and 200 Hz for 5 min/d over 28 days	BV/TV Osteogenic effect Trabecular thickness Trabecular space Alveolar bone density Growth factors Transcription factors Extracellular matrix Mineralization	The highest BV/TV was with 60 and 100Hz rate 60 Hz demonstrated a higher leves compared with the static group in: osteogenic effect, density, growth factors, transcription factors, extracellular matrix, mineralization, trabecular thickness and and the greatest decrease in trabecular space	high-frequency accelerations vibration increase osteoblast activity, play a key role during the mineralization process. The higher response to vibration was in trabecular bone
Kalajic (2014) U.S.A.	<i>In vivo</i>	N= 26 F Age: 7 weeks old Spices: Sprague Dawley rats	EG1: n=4 received occlusal vibratory stimulus twice a week without orthodontic force EG2: n= 9 received the orthodontic force only EG3: n= 9 received the orthodontic force and additional	30 Hz for 10 min/d, twice per week with five applications	BV/TV Alveolar bone density	No significant difference between the control group and groups used vibrations in BV/TV and alveolar bone density	LFMV may cause diferent effects depending on force magnitude, frequency, or point of Application

			vibratory stimulus twice a week CG: n=4 No received stimulus				
Yadav (2015) U.S.A.	<i>In vivo</i>	N= 30 M Age: 12 weeks old Spices: CD1 mice	EG1: n= 10 Applied orthodontic force for 7 days, then orthodontic force was removed and molar was allowed to relapse EG2: n=10 Applied orthodontic force for 7 days then exposed it to vibrational stimuli without orthodontic forces CG: n= 10 Applied orthodontic force for 7 days	30Hz for 15 min/d over 7 days	Bone volume Alveolar bone density	No significant differences in bone volume and density when compared the CG and vibration group Density was significantly more in vibration group when compared to EG1	LFMV vibrations increase bone density despite inducing a process of bone resorption with orthodontic forces.
Alikhani (2016) U.S.A.	<i>In vivo</i>	N= 85 M Age: 4 moths Spices: Sprague-Dawley rats	The maxillary right third molar was extracted in all rats EG: received 120 Hz SC: received 4µε of static load CG: no recived stimuli	120Hz for 5 min/d over 56 days	BV/TV Level of bone formation Trabecular thickness Trabecular number Trabecular spacing Tissue mineral density Height Osteogenic markers: ALP, Runx 2, OPN, OCN	EG had significantly greater, BV/TV, level of bone formation, trabecular thickness, trabecular number, tissue mineral density and height. EG: obtained the least trabecular spacing EG: exhibited significantly higher ALP activity and, Runx 2, osteopontin , osteocalcin	HFMV promote alveolar bone formation and decrease RANKL expression and osteoclast activation
Alikhani (2018) U.S.A.	<i>In vivo</i>	N= 206 M Age: 120 days Spices: Sprague Dawley rats	EG: Received orthodontic force + HFA OTM: Received orthodontic force	120 Hz, for 5 min/d over 14 days	Alveolar bone density Bone volume	Alveolar bone density decreased more during tooth movement in experimental group Bone volume decreased further during tooth	HFMV treatment during orthodontic tooth movement produces a catabolic effect HFMV increased the number of osteoclasts

			CG: Not received orthodontic force			movement in experimental group	
Alikhani (2019)	<i>In vivo</i>	N= 14 F Age: 16 weeks old Spices: Sprague Dawley rats	EG1 received bilateral ovariectomy EG2 received ovariectomy and HFA EG3 received ovariectomy and 10 µε of static load SG: received ovariectomy surgery without having the ovaries removed CG did not receive any intervention	120Hz for 5 min/d over 28 and 56 days	Alveolar bone density BV/TV BMD Osteogenic markers: -OPG -Runx2 -Osterix -ALP -OCN -Colla1 -BMP2 -Wnt	HFMV group reestablished the alveolar bone density the levels of the Sham group BV/TV and BMD was significantly higher with HFMV, compared to ovariectomy group HFMV restored osteogenic markers to levels similar to the Sham group	HFMV-induced bone remodeling depends on the inflammatory condition of the tissue In absence of inflammatory condition HFMV is anabolic The highest osteogenic effect of HFMV was observed closest to the HFMV application site
Öztürk (2021) Turkey	<i>In vivo</i>	N= 64 Age: ? Spices: rats	CG: No treatment CG2: Orthodontic tooth movement (10 days)+ relapse (only relapse) PC1: Orthodontic tooth movement (10 days)+ long-term retention (15 days) PC2: Orthodontic tooth movement (10 days)+ short-term retention (7 days) EG1: Orthodontic tooth movement (10 days)+ long-term retention (15 days)+ 10–20–30Hz cumulative increased frequencies	10–20–30Hz cumulative increased for 10 min/d First 3 days 10Hz Next 3 days 20Hz Final 3 days 30Hz	Trabecular thickness Trabecular number OPG RANKL COX-2	Trabecular thickness was lower in vibration Group than controls groups Trabecular number in vibration group was higher than CG and PC No statistically significant intergroup difference in the OPG level RANKL and COX-2 was significantly lower than those in the control groups	HFMV yielded a better bone structure by increasing trabecular number and decreasing trabecular thickness and levels of RANKL and COX-2.

			mechanical vibration				
			EG2: Orthodontic tooth movement (10 days)+ short-term retention (7 days)+ 10–20–30Hz cumulative increased frequencies mechanical vibration				
EG: experimental group, CG: control group, SG: sham group, M: male, F: female, BV/TV: bone volume/tissue volume, BMD: bone mineral density, OTM: orthodontic tooth movement. $\mu\epsilon$: micro strain, HFMV: high-frequency mechanical vibration, LFMV: low-frequency mechanical vibrations OPG: osteoprotegerin, OPN: Osteopontin, OCN: Osteocalcin, ALP:alkaline phosphatase, PC: Positive control							

3.3 Principales variables de resultado del estudio

Es importante destacar que en los estudios se utilizaron dos regímenes de tratamiento principales; vibraciones de baja o alta frecuencia, todos con el mismo objetivo, observar los efectos osteogénicos del estímulo vibratorio.

3.3.1 Vibraciones de baja frecuencia

Las vibraciones de baja frecuencia son las oscilaciones que están por debajo de los 45Hz, y han mostrado que pueden aumentar la densidad ósea y actividad osteogénica, como lo muestra Mao et al. En el 2003 en el cual uso 21 conejos con el objetivo de observar cual estímulo mostraba mayor actividad osteogénica comparando el crecimiento en longitud de la premaxila usando diferentes estímulos mecánicos, aplicando fuerzas estáticas exógenas con una magnitud máxima de 2 N, o fuerzas cíclicas también a 2 N pero con frecuencias de 0,2 Hz y 1 Hz. los resultados mostraron que La longitud craneofacial fue significativamente mayor cuando se aplicaron fuerzas cíclicas a 0,2 Hz ($p<0.01$) [20].

Kalajzic et al., Investigaron el efecto que tienen las vibraciones de baja frecuencia sobre el remodelado óseo, para lo cual usaron 26 ratas femeninas que se dividieron en cuatro grupos, el grupo control que no recibió un estímulo, un grupo vibraciones que recibió una frecuencia de 30 Hz por 10 minutos al día dos veces cada semana

por 5 semanas, un tercer grupo el cual se aplicó una fuerza ortodóntica equivalente a 25g de fuerza y el último grupo fue una combinación de fuerza ortodóntica de 25 g junto con vibraciones de 30 Hz. después del experimento los resultados demostraron que el grupo de vibraciones obtuvo una densidad tisular ($p=0.0127$) y volumen óseo ($p=0.0252$) similar al grupo control y grupo de fuerzas ortodónticas junto con vibraciones; por lo contrario la densidad tisular ($p=0.0127$) y volumen óseo ($p=0.0252$) fueron inferiores en el grupo que solo hubo una fuerza ortodóntica implicada, esto se debe a que sufrió un proceso de remodelado óseo por la fuerza aplicada lo que originó una reabsorción ósea; lo que podemos inferir es que el uso de vibraciones inhibe el proceso de reabsorción ósea a pesar de que exista una carga externa como la fuerza ortodóntica que pueda inducir un remodelado óseo [6].

Para continuar con las investigaciones de las vibraciones de baja frecuencia sobre el hueso alveolar y su posible aplicación para reducir la recidiva del movimiento dental después de recibir una fuerza ortodóntica los autores Yadav et al., y Öztürk et al., realizaron experimentos para medir el índice de recidiva en dientes que fueron sometidos a un movimiento por una fuerza ortodóntica, además de cuantificar parámetros osteogénicos, tales como el volumen óseo y densidad tisular. Yadav et al., con un modelo de 30 ratones, uso un esquema de 30 Hz por 15 minutos diarios por 7 días después de realizar el movimiento dental y lo compararon con un grupo control y un grupo recidiva el cual solo recibió el movimiento dental y se dejó un periodo sin fuerza alguna. Sus hallazgos mostraron que la densidad tisular fue significativamente mayor en el grupo que se usó vibraciones cuando lo compararon con el grupo recidiva, sin embargo, el volumen óseo no obtuvo diferencias significativas, por otra parte, cuando se comparó con el grupo control, la densidad y el volumen óseo tisular es similar al grupo de vibraciones. Mas recientemente Öztürk et al., evaluó y comparo los efectos de las vibraciones de baja frecuencia en la retención ortodóntica junto con el efecto osteogénico, para lo cual realizó un experimento en ratas que dividió en diferentes grupos, el grupo control y los grupos experimentales, donde se les colocó un resorte de cierre de níquel-titanio con 50cN de fuerza por 10 días, entre el incisivo y molar superior. Se aplicaron vibraciones durante el periodo de retención, con un protocolo de aumento acumulativo de

frecuencias, que consistió en estimular por 10 minutos diarios con 10 Hz, 20 Hz y 30 Hz distribuidos en dos periodos uno corto de 7 días y otro largo de 15 días; midiendo el número y espesor trabecular, además de marcadores genéticos de remodelado óseo como la OPG, RANKL y Cox-2. En sus resultados reportaron que en el grupo de vibraciones presentó un efecto osteogénico mayor dado a que el espesor trabecular disminuyó ($p<0.05$) pero el número de trabéculas aumentó ($p<0.05$), no hubo diferencia estadísticamente significativa en los valores de OPN ($p>0.05$), los niveles de cox-2 y RANKL fueron menores ($p<0.05$) [9].

3.3.2. Vibraciones de alta frecuencia

Las vibraciones que se consideran de alta frecuencia son aquellas que tienen una frecuencia mayor a $\geq 90\text{Hz}$ [24]. En este trabajo se incluyeron 3 estudios que realizaron un estímulo vibratorio por encima de los 90 Hz [3,13,22], y un solo estudio que usó 60Hz, este último estudio se incluye la categoría de alta frecuencia ya que supera los 45 Hz.

Alikhani et al., con el propósito de probar el efecto anabólico de las vibraciones sobre el hueso alveolar realizó un estudio en 85 ratas que se dividieron en tres grupos: experimental combinando vibraciones de alta y baja frecuencia (30Hz, 60Hz, 100Hz y 200Hz), grupo placebo en el cual se aplica una carga de 4 $\mu\epsilon$ (microtensión) y un grupo control que no recibió estímulo, en sus resultados reportaron que todas las frecuencias tuvieron un aumento en el volumen óseo, sin embargo las dos frecuencias que obtuvieron el mayor aumento fueron la de 60Hz y 100Hz ($p<0.05$), las vibraciones de 60 Hz ocasionaron un aumento en el espesor trabecular ($p<0.05$), disminución del espacio trabecular ($p<0.05$), aumento en la densidad tisular ($p<0.05$), y una mayor expresión de marcadores osteogénicos ($p<0.05$) [21].

Es importante resaltar que Alikhani et al., publicó tres estudios en los cuales usó un protocolo de estímulo vibratorio similar entre ellos, que consistió en aplicar 120 Hz por 5 minutos diarios un mínimo de 14 días con un máximo de 56 días, cabe mencionar que en cada uno de los artículos realizó un diseño experimental diferente con el fin de analizar el comportamiento de las vibraciones simulando distintos

escenarios clínicos. En su primer trabajo aplicó vibraciones de alta frecuencia en ratas post extracción dental y lo comparó contra un grupo control y placebo, en sus resultados reportaron que el grupo de vibraciones de alta frecuencia tuvo mayor espesor trabecular, espacio intratrabecular menor y mayor densidad tisular ($p < 0.05$), además que la recuperación cuantitativa de tejido óseo fue en mejor tiempo que en los grupos que no hubo vibraciones ($p < 0.05$), de igual forma hubo mayor actividad de Runx2, OPN, OCN y ALP ($p < 0.05$). Posteriormente en su segundo artículo investigó el efecto de las vibraciones durante el movimiento dental influenciado por una fuerza ortodóntica, para lo cual expuso a ratas a diferentes estímulos, un grupo consistía en aplicar una fuerza de 10 y 25 cN sobre los dientes guiada con un resorte de cierre Sentalloy y otro en colocar las vibraciones de alta frecuencia junto con la fuerza ortodóntica, en sus resultados se mostró que tanto la densidad tisular como el volumen óseo disminuyeron ($p < 0.05$) en el grupo que se estimuló con vibraciones junto con una fuerza ortodóntica produciendo un efecto catabólico. En el último artículo se observó el efecto anabólico de las vibraciones de alta frecuencia sobre el hueso alveolar con osteoporosis, en el indujeron una osteoporosis en ratas por medio de la ovariectomía, en un grupo estimularon con vibraciones de alta frecuencia y lo compararon con el grupo control y placebo. Sus resultados mostraron que las ratas con osteoporosis estimuladas con vibraciones reestablecieron los niveles de volumen óseo y densidad tisular al no existir diferencia significativa con el grupo placebo ($p < 0.05$). Observaron que la recuperación se dio a través del incremento del espesor trabecular ($p < 0.02$) y disminución del espacio intratrabecular ($p < 0.015$). Por otra parte, las vibraciones también ayudaron a restaurar los niveles de marcadores osteogénicos ya que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de “osteoporosis + HFA” y el grupo placebo ($p < 0.05$). El efecto anabólico que tienen las vibraciones de alta frecuencia encontrado en nuestra búsqueda coincide con los resultados obtenidos por Shipley et al., quienes en un grupo de 30 pacientes evaluaron la densidad ósea antes y después de un tratamiento de ortodoncia con alineadores, aplicando vibraciones de 120 Hz por 5 minutos al día, y comparándolo con un grupo que no

fue estimulado con vibraciones. En sus resultados reportan que la densidad alveolar incremento en comparación al grupo control ($p=0.001$) [11].

3.4 Evaluación del riesgo de sesgo

La evaluación del riesgo de sesgo se llevó a cabo siguiendo los principios del centro de revisión sistemática para la experimentación con animales de laboratorio (SYRCLE) [25], este instrumento está basado en la Herramienta de Riesgo de Sesgo de la Colaboración Cochrane adaptada a los aspectos de sesgo que desempeñan un papel en los experimentos con animales [18]. Ocho artículos describieron correctamente todos los datos de sus resultados, no contenían información selectiva dentro de sus resultados y declararon no tener conflictos de interés [3,6,9,13,20-23]. Es importante destacar que ninguno de los artículos informó correctamente sobre la ocultación de la asignación, el alojamiento aleatorio de los animales, el cegamiento durante el proceso, la evaluación aleatoria de los resultados y la detección de sesgos. Cinco artículos declararon que los grupos de intervención y de control eran similares al inicio del experimento [6,9,20,21,23]. Tres artículos reportan una asignación adecuada de los animales en los diferentes grupos experimentales y control [21-23]. En cinco [6,9,20,21,23] de los ocho artículos evaluados, se obtuvo una calificación de alto riesgo de sesgo para el 60% de los criterios evaluados. Los otros tres artículos [3,13,22] recibieron una calificación de alto riesgo de sesgo en el 50% de los criterios evaluados. El resumen de los resultados de la evaluación del riesgo de sesgo se puede observar en la figura 2.

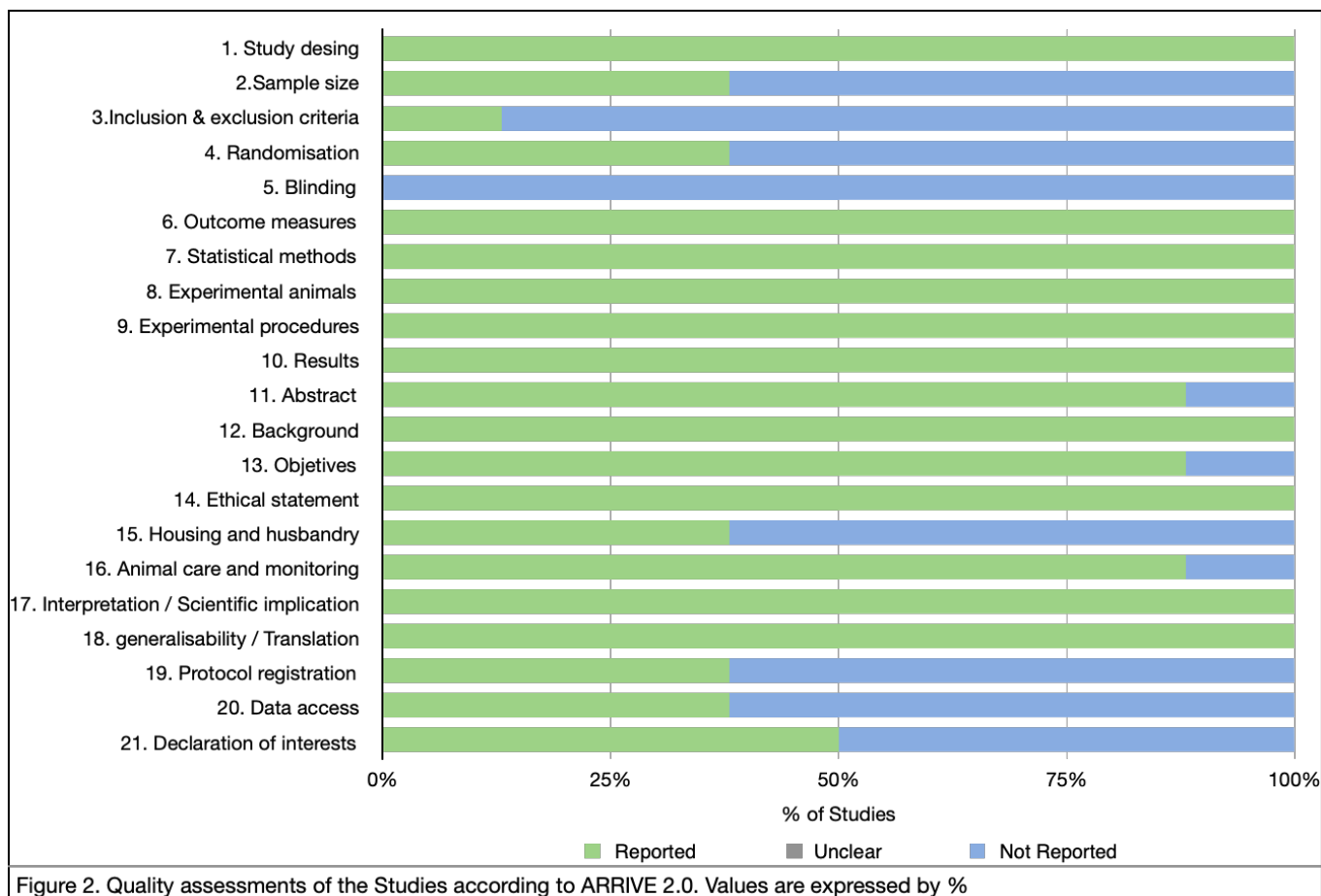
Risk of Bias								
	Mao 2003	Alikhani 2012	Kelajzic 2014	Yadav 2015	Alikhani 2016	Alikhani 2018	Alikhani 2019	Öztürk 2021
Was the allocation sequence adequately generated and applied?								
Were the groups similar at baseline or were they adjusted for confounders in the analysis?								
Was the allocation adequately concealed?								
Were the animals randomly housed during the experiment?								
Were the caregivers and/or investigators blinded from knowledge which intervention each animal received during the experiment?								
Random outcome Were animals selected at random for outcome assessment?								
Was the outcome assessor blinded?								
Were incomplete outcome data adequately addressed?								
Are reports of the study free of selective outcome reporting?								
Was the study apparently free of other problems that could result in high risk of bias?								
Figure 2. Evaluation of risk of bias in the studies according to Systematic Review Centre for Laboratory animal Experimentation (SYRCLE) presents.								

Low risk of bias
 Unclear risk of bias
 High risk of bias

3.5 Evaluation of the Quality of the Included Studies

La evaluación de la calidad se llevó a cabo de acuerdo con las directrices ARRIVE 2.0 [19], donde cada uno de los artículos incluidos fue evaluado individualmente con el uso de los criterios recomendados para una buena práctica informativa. Para obtener un porcentaje del 100%, deben cumplirse los siguientes requisitos: 1. diseño del estudio, 2. tamaño de la muestra, 3. criterios de inclusión y exclusión, 4. aleatorización, 5. cegamiento, 6. medidas de resultado, 7. métodos estadísticos, 8. animales de experimentación, 9. procedimientos experimentales, 10. resultados, 11. resumen, 12. antecedentes, 13. objetivos, 14. declaración ética, 15. alojamiento y cría, 16. cuidado y seguimiento de los animales, 17. interpretación/implicación científica, 18. traducción, 19. registro del protocolo, 20. acceso a los datos y 21. declaración de intereses. Con base en lo anterior, los criterios reportados en el 100% de los artículos fueron: 1,6,7,8,9,10,17 y 18; seguidos por los criterios 11,13

y 16 en un 88%, el criterio 21 (declaración de intereses) se cumplió en el 50% de los artículos; mientras que los porcentajes más bajos fueron para el criterio 13, con un 13%, y con un 38%, los criterios: 2,4,15,19 y 20. Cabe destacar que ninguno de los artículos cumplía los criterios de cegamiento [5], véase la figura 3.



4.Discusión

Las vibraciones son fuerzas cíclicas que realizan un estímulo físico las cuales han demostrado promover la formación ósea por medio de la diferenciación y proliferación de osteoblastos [26]. Este fenómeno puede ser posible debido a que el hueso es un tejido mecanosensitivo al igual que las células óseas, las cuales reaccionan a un entorno biomecánico, al poder activar vías de señalización moleculares las cuales regulan la producción de matriz, diferenciación y

proliferación [16]. En el contexto del ambiente intraoral existen dos tipos de frecuencia que son utilizadas para estimular el hueso alveolar, las denominadas baja frecuencia que operan a $\leq 45\text{Hz}$ y las de alta frecuencia que son de $\geq 90\text{Hz}$ [24]. Esta revisión sistemática contrastó las diferentes publicaciones relacionadas con las vibraciones baja [6,9,20,23] y alta frecuencia [3,13,21,22] y el efecto osteogénico que tienen sobre el hueso alveolar. Los resultados de esta investigación mostraron que las vibraciones de baja y alta frecuencia producen un estímulo mecánico que conlleva a un efecto osteogénico sobre el hueso alveolar [3,6,9,13,20-23], ayudando a mejorar la cicatrización en una extracción dental [24], aumentar la densidad ósea [6], y contrarrestar los efectos de una osteoporosis inducida [13].

4.1 Efecto de las vibraciones de baja frecuencia

En los estudios analizados en esta revisión que estimulaban con VBF se encontró que por primera vez el uso de vibraciones estimulan el crecimiento y la osteogénesis en huesos craneofaciales, como lo demuestra Mao et al. donde la aplicación de vibraciones de 0.2 Hz junto con una fuerza ortopédica logró incrementar la longitud de la premaxilar comparada con el control [20], esto es debido a que las vibraciones afectan las suturas ya que los datos histológicos muestran que la sutura premaxilomaxilar tratada con carga cíclica mostró una amplia separación sutural con islas de formación de hueso nuevo [20],. Este resultado es consistente con lo reportado por Mehmet et al. donde reportan que la aplicación de VBF por un periodo corto inducen el crecimiento craneal mediante el agrandamiento de las suturas sagital y parietotemporal, además aumentó la anchura craneal; por otra parte, el mismo estímulo vibratorio por un periodo más largo estimula la formación de huesos del cráneo aumentando su anchura [27]. Estos resultados dan pauta a la posibilidad de usar las vibraciones en combinación con fuerzas ortopédicas durante una ortodoncia interceptiva para lograr los efectos terapéuticos óptimos.

Al mismo tiempo la aplicación de VBF han sido sugeridas como alternativa para prevenir la recidiva después del tratamiento de ortodoncia [9]. En nuestros

resultados de la revisión Öztürk et al. reportó que la aplicación de VBF en dos periodos de retención uno de corto (7 días) y otro de largo (15días) plazo, postratamiento de ortodoncia, disminuía la recidiva, siendo el periodo de 15 días el que obtuvo una cantidad menor de recidiva, provocado por una disminución del RANKL y aumento en el número de trabéculas óseas en el hueso alveolar [9]; esto es consistente con lo reportado por García-López et al. donde el estímulo con 30 Hz en osteoblastos disminuye la expresión de RANKL y promueven un aumento en la actividad de los osteoblastos, esto puede conducir al aumento de densidad mineral ósea [28], lo que conlleva un aumento de hueso trabecular, grosor de cortical y volumen tisular, esto puede representar la causa de la disminución de la cantidad de recidiva; de igual forma coincide con lo reportado por Kalajzic et al., ellos reportan una inhibición en el movimiento del diente cuando se utilizan VBF [6]. Por otro lado, los resultados encontrados por Yadav et al. se contraponen a lo anterior mencionado, dado a que ellos reportan que el uso de VBF en un periodo de retención no hace la diferencia en la cantidad de recidiva, a pesar de que la densidad ósea fue mayor en el grupo de vibraciones [23].

4.2 Efecto de las vibraciones de alta frecuencia

Dentro de nuestra revisión los estudios que analizamos en los cuales estimularon con VAF son los realizados por Alikhani et al. en los cuales reportó que el uso de VAF presentan un efecto paradójico sobre el hueso alveolar, creando diferentes reacciones que dependen del contexto en el que se apliquen las vibraciones [3]. Por una parte, cuando hay una fuerza ortodóntica creando un movimiento dental el efecto que se consigue es catabólico, esto fue consistente con los estudios *in vitro* de Benjakul et al. donde células del ligamento periodontal comprimidas por un disco de acrílico y estimuladas mecánicamente con VAF sobre-expresaron los genes relacionados con la reabsorción ósea RANKL y la PGE2 [29]. Sin embargo, en hueso alveolar sano, en proceso de cicatrización post-extracción, e inclusive con osteoporosis las VAF estimulan el crecimiento, aumentan la densidad tisular, volumen óseo, promoviendo un proceso de osteogénesis [3,9,20-23]. Esto es posible debido a que el hueso alveolar es un tejido mecanosensible que reacciona

a diferentes estímulos mecánicos externos, adaptando la masa y estructura ósea en un proceso de remodelación continuo [15,16]. Aunado a esto, en el ambiente oral, el ligamento periodontal posee mecanorreceptores que dan respuesta a estímulos mecánicos externos denominados Ruffini tipo I, los cuales se caracterizan por poseer los dos tipos de respuesta, tanto como los de respuesta de adaptación rápida, localizados cerca del centro de resistencia del diente, como los de adaptación lenta, que se encuentran cerca del ápice; los de adaptación rápida se activan solo cuando hay una carga mecánica de presión, mientras que los de la unidad de adaptación lenta dependientes de la frecuencia y magnitud de carga para la transmisión del impulso [12]. Al mismo tiempo el estímulo vibratorio se propaga a través de los tejidos, al observar que los efectos anabólicos no solo se vieron aumentados en la zona de aplicación si no también en las áreas adyacentes a este, sin embargo, el efecto se va atenuando cuanto más lejos este del área de ampliación [13,21].

Es importante señalar que el efecto anabólico sobre el hueso alveolar de las vibraciones de baja y alta frecuencia es resultado de la activación de la vía de señalización Wnt canónica [14-16]. En esta revisión sistemática Alikhani et al., reportaron un aumento en el gen Wnt al aplicar vibraciones de 120 Hz [13]; esto coincide con los resultados de Pravitharangul et al., donde reportan que osteoblastos de origen mandibular tuvieron una sobreexpresión del gen Wnt10b después de someterlas a vibraciones de 120 Hz [14]. La vía de señalización Wnt canónica actúa a través de los ligandos de Wnt como el Wnt10B, en un inicio las proteínas de la Wnt se unen al receptor Frizzled y al co-receptor Lrp5/6 que se encuentran sobre la membrana celular, lo que causa una concentración de β -catenina dentro de los osteoblastos, inhibiendo la degradación de β -catenina fosforilada a través de la vía de la ubiquitina-proteosoma; la concentración de β -catenina dentro del citoplasma de los osteoblastos produce un desplazamiento de esta enzima dentro del núcleo, donde se une a los factores de transcripción TCF/LEF y regula la expresión de RUNX2 [30]. Por lo que cabe señalar que el efecto anabólico de las vibraciones es mayor con vibraciones de alta frecuencia, esto coincide con los mencionado por Pravitharangul et al. en donde su estudio en el cual

comparó la aplicación de varias frecuencias sobre osteoblastos de mandíbula y mostraron que los niveles de proteína Wnt10b y ALP fueron superiores cuando se aplicaron frecuencias >90Hz [14]. Se puede afirmar que por medio de promover la proliferación y diferenciación osteoblástica junto con la mineralización de la matriz a través de la activación de la vía de señalización Wnt canónica que induce la liberación de ALP, Runx2, y BMP2 que a su vez median el efecto de las vibraciones de alta frecuencia en los osteoblastos, crean un ciclo [14-16,30].

Se tiene reportado que la vía señalización Wnt causa la activación de la osificación tanto intramembranosa como endocondral [30], sin embargo Alikhani et al., mostró en sus resultados que la aplicación de las vibraciones de alta frecuencia en un alveolo en proceso de cicatrización post-extracción ayuda a mejorar este proceso de reparación con base a la proliferación y diferenciación de osteoblastos, así mismo como fomentar la mineralización de la matriz debido al aumento de las expresiones de Runx2 y Sox9, a lo se sugiere que las vibraciones de alta frecuencia inducen la formación de hueso intramembranoso principalmente y no el crecimiento endocondral [22].

4.3 Otros factores que promueven efecto anabólico.

Cabe destacar que existen otros factores que favorecen este efecto anabólico cuando se usan los estímulos vibratorios, como la reducción de la actividad y cantidad de osteoclastos [6,22,23]. Esto es consistente con los resultados que obtuvieron Kalajzic et al. al observar que la cantidad de recidiva fue menor en ratas que recibieron vibraciones de 30 Hz durante un periodo de retención [6], además se mostró una disminución en la cantidad de osteoclastos evitando así un desplazamiento del diente. Estos resultados son similares con lo reportado por Yadav et al. en el cual mostraron que el uso de VBF produce una disminución de la esclerosina la cual provocó una disminución en la cantidad de osteoclastos [23]. Estos resultados son consistentes con la disminución del gen SOST en osteoblastos sometidos a vibración que reportó Gao et al. en su estudio *in vitro* [15]. El gen SOST codifica la proteína esclerostina y principalmente es secretada por osteocitos y células del ligamento periodontal la cual tiene como función la inhibición de la

formación ósea al unirse de forma competitiva al correceptor Wnt, LRP5/6, la esclerostina provoca la fosforilación y degradación de la beta-catenina y dificulta la activación de los osteoblastos [31,32], en este sentido una disminución del gen SOST representa una inhibición al proceso de resorción ósea. Por lo que una depresión en el gen SOST ayudan a disminuir el movimiento dental al disminuir la actividad de los osteoclastos, lo cual es el objetivo dentro de una etapa de retención post-ortodoncia o cuando se quiere detener un proceso de reabsorción óseo [6,23].

4.4 Posible uso de las vibraciones en el protocolo de retención

El efecto anabólico sobre el hueso alveolar que se consigue con las vibraciones tiene diversas aplicaciones clínicas, como podría ser una regeneración de hueso como parte del tratamiento de una periodontitis, o en este caso particular aumentar la densidad tisular con el fin de prevenir la recidiva.

Solo dos estudios incluyeron en su diseño experimental en cual simulaban de una situación clínica de retención ortodóntica [9,23]; Yadav et al. reporto que no existe una diferencia significativa en usar o no las vibraciones en el periodo de retención [23]. Por otra parte, Öztürk et al. en sus resultados demostraron que la cantidad de recidiva en lo grupos que siguieron el esquema de vibraciones fue menor que en los grupos que siguieron un protocolo de retención convencional, además de obtener menor porcentaje de recidiva en los casos donde el periodo de retención fue de 15 días [9]. Esto puede ser debido a múltiples factores el primero es que Öztürk et al. aplicaron el estímulo en un periodo más prolongado además de ir incrementando sus frecuencias de 10 Hz hasta 30Hz en un periodo de 9 días además de que su periodo de retención máximo fue de 15 días, y por lo contrario Yadav et al. aplico vibraciones en su periodo de retención que duro 7 días [9].

Conclusión:

Las vibraciones de baja y alta frecuencia han demostrado tener un efecto anabólico sobre el hueso alveolar cuando se encuentra sano, en proceso de cicatrización e incluso con osteoporosis. La manera en que las vibraciones provocan este efecto anabólico es a través del: Aumentando la densidad y volumen óseo, Incrementando

actividad osteoblástica, Disminución del espacio intratrabecular y aumento del grosor de las trabéculas óseas, Sobre expresar biomarcadores osteogénicos, Activación de la vía Wnt canónica, Disminución de la actividad de osteoclastos por inhibición del gen SOST.

La mayor actividad anabólica se observó en aquellos protocolos que fueron de alta frecuencia ($\geq 90\text{Hz}$) además de que el efecto se propaga a las zonas adyacentes. El uso de vibraciones puede ser útil en distintas áreas de la odontología, tal como en la ortodoncia, al poder reducir el índice de recidiva aumentando la densidad ósea post tratamiento, sin embargo, faltan estudios que puedan simular esta situación clínica con otros protocolos de vibración y que se puedan obtener resultados concluyentes.

Referencias:

1. van der Zee EA, Oroszi T, van Heuvelen MJG, Nyakas C. Vibration detection: Its function and recent advances in medical applications. *F1000Research*. 2020;9.
2. Amidzic O, Riehle HJ, Fehr T, Wienbruch C, Rubin C, Turner AS, et al. Pattern of focal. 2001;1–2.
3. Alikhani M, Alansari S, Hamidaddin MA, Sangsuwon C, Alyami B, Thirumoorthy SN, et al. Vibration paradox in orthodontics: Anabolic and catabolic effects. *PLoS One* [Internet]. 2018;13(5):1–18.
4. ElDeeb AM, Abdel-Aziem AA. Effect of Whole-Body Vibration Exercise on Power Profile and Bone Mineral Density in Postmenopausal Women With Osteoporosis: A Randomized Controlled Trial. *J Manipulative Physiol Ther* [Internet]. 2020;43(4):384–93.
5. DadeMatthews OO, Agostinelli PJ, Neal FK, Oladipupo SO, Hirschhorn RM, Wilson AE, et al. Systematic review and meta-analyses on the effects of whole-body vibration on bone health. *Complement Ther Med* [Internet]. 2022;65:102811.

6. Kalajzic Z, Peluso EB, Utreja A, Dymment N, Nihara J, Xu M, 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.
7. Vega MFG, Pérez-Franco LML, Kanán AD, Méndez CDR, Sainz JES, Cervantes ER, et al. Are mechanical vibrations an effective alternative to accelerate orthodontic tooth movement in humans? A systematic review. *Appl Sci*. 2021;11(22).
8. Keerthana P, Diddige R, Chitra P. Performance comparison of vibration devices on orthodontic tooth movement - A systematic review and meta-analysis. *J Oral Biol Craniofacial Res [Internet]*. 2020;10(4):814–23.
9. Öztürk T, Gül Amuk N. Three-dimensional imaging and molecular analysis of the effects of photobiomodulation and mechanical vibration on orthodontic retention treatment in rats: Effects of photobiomodulation and mechanical vibration on orthodontic retention treatment. *J Orofac Orthop*. 2022;
10. Thammanichanon P, Kaewpitak A, Binlateh T, Leethanakul C. Interval vibration reduces orthodontic pain via a mechanism involving down-regulation of TRPV1 and CGRP. *In Vivo (Brooklyn)*. 2020;34(5):2389–99.
11. Shipley T, Farouk K, El-Bialy T. Effect of high-frequency vibration on orthodontic tooth movement and bone density. *J Orthod Sci [Internet]*. 2019;8(15):15.
12. Piacino MG, Isola G, Cannavale R, Cutroneo G, Vermiglio G, Bracco P, et al. From periodontal mechanoreceptors to chewing motor control: A systematic review. *Arch Oral Biol [Internet]*. 2017;78:109–21.
13. Alikhani M, Alikhani M, Alansari S, Almansour A, Hamidaddin MA, Khoo E, et al. Therapeutic effect of localized vibration on alveolar bone of osteoporotic rats. *PLoS One*. 2019;14(1):1–23.
14. Pravitharangul A, Suttapreyasri S, Leethanakul C. Mandible and iliac osteoblasts exhibit different Wnt signaling responses to LMHF vibration. *J Oral Biol Craniofacial Res [Internet]*. 2019;9(4):355–9.

15. Gao H, Zhai M, Wang P, Zhang X, Cai J, Chen X, et al. Low-level mechanical vibration enhances osteoblastogenesis via a canonical Wnt signaling-associated mechanism. *Mol Med Rep.* 2017;16(1):317–24.
16. 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(October).
17. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ.* 2021;372.
18. Sandercock P, Roberts I. Systematic reviews of animal experiments. *Lancet.* 2002;360(9333):586.
19. du Sert NP, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M, et al. The arrive guidelines 2.0: Updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol.* 2020;18(7):1–12.
20. Mao JJ, Wang X, Mooney MP, Kopher RA NJ. Strain Induced Osteogenesis of the Craniofacial Suture Upon Controlled Delivery Of Low-Frequency Cyclic Forces. *Front Biosci.* 2003;8:1–10.
21. Alikhani M, Khoo E, Alyami B, Raptis M, Salgueiro JM, Oliveira SM, et al. Osteogenic effect of high-frequency acceleration on alveolar bone. *J Dent Res.* 2012;91(4):413–9.
22. Alikhani M, Lopez JA, Alabdullah H, Vongthongleur T, Sangsuwon C, Alikhani M, et al. High-Frequency Acceleration: Therapeutic Tool to Preserve Bone following Tooth Extractions. *J Dent Res.* 2016;95(3):311–8.
23. Yadav S, Assefnia A, Gupta H, Vishwanath M, Kalajzic Z, Allareddy V, et al. The effect of low-frequency mechanical vibration on retention in an orthodontic relapse model. *Eur J Orthod.* 2015;38(1):44–50.

24. Kanzaki H, Nakamura Y. Orthodontic tooth movement and bone density. *J Oral Biosci.* 2018;60(2):49–53.
25. Hooijmans CR, Rovers MM, De Vries RBM, Leenaars M, Ritskes-Hoitinga M, Langendam MW. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol [Internet].* 2014;14(1):1–9.
26. Fu Z, Huang X, Zhou P, Wu B, Cheng L, Wang X, et al. Protective effects of low-magnitude high-frequency vibration on high glucose-induced osteoblast dysfunction and bone loss in diabetic rats. *J Orthop Surg Res.* 2021;16(1):1–13.
27. Mehment Amuk, Nisa Gül Amuk ZH. Effects of orofacial applications of low-magnitude, high-frequency mechanical vibration on cranial sutures and calvarial bones_ A micro-computed tomography study in rats. *Am J Orthod Dentofac Orthop.* 2022;162(4):459–68.
28. García-López S, Villanueva RE, Massó-Rojas F, Páez-Arenas A, Meikle MC. Micro-vibrations at 30 Hz on bone cells cultivated in vitro produce soluble factors for osteoclast inhibition and osteoblast activity. *Arch Oral Biol [Internet].* 2020;110(May 2019):104594.
29. Benjakul S, Jitpukdeebodintra S, Leethanakul C. Effects of low magnitude high frequency mechanical vibration combined with compressive force on human periodontal ligament cells in vitro. *Eur J Orthod.* 2018;40(4):356–63.
30. Houschyar KS, Tapking C, Borrelli MR, Popp D, Duscher D, Maan ZN, et al. Wnt Pathway in Bone Repair and Regeneration – What Do We Know So Far. *Front Cell Dev Biol.* 2019;6(January):1–13.
31. Ueda M, Kuroishi KN, Gunjigake KK, Ikeda E, Kawamoto T. Expression of SOST/sclerostin in compressed periodontal ligament cells. *J Dent Sci [Internet].* 2016;11(3):272–8.
32. Shu R, Bai D, Sheu T, He Y, Yang X, Xue C, et al. Sclerostin promotes bone remodeling in the process of tooth movement. *PLoS One.* 2017;12(1):1–16.