

**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
PUEBLA**

FACULTAD DE ESTOMATOLOGÍA

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS DE POSGRADO

***“VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASTOS EXPUESTOS
A VIBRACIONES DE ALTA FRECUENCIA Y COMPRESIÓN MECÁNICA”***

TESIS

**Presentada para obtener el grado de:
Maestría en Estomatología Opción Terminal Ortodoncia**

PRESENTA:

MAYRA DANIELA CARRERA GONZÁLEZ

ID 222450006

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

ASESOR EXTERNO:

D.C Maura Cárdenas García ID 100337388

LECTOR:

M.O Yareli Hernández Ávila ID 100426099

Puebla de Zaragoza, Puebla, mayo 2024

1 5 7 8

I. DICTAMEN DE APROBACIÓN DE TESIS



Oficio No. FESIEP/CIFE/034/2024

C. Mayra Daniela Carrera González
 Estudiante de la Maestría en Estomatología
 con opción en Terminal en Endodoncia
 Matrícula No.: 222450006
 Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología
 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
 PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la que suscribe MEP. Gisela Nataly Rubín de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; para comunicarle una noticia importante en relación con su proceso académico.

Con agrado, le informo que la Secretaría de Posgrado ha otorgado la aprobación para la impresión de su Tesis Titulada:

"Viabilidad y proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y compresión mecánica".

Esta tesis está inscrita en el libro de registros No. 09, página 01, con el No. de asignación 2024243, en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica. Usted presentará esta tesis para realizar su examen profesional y así obtener el grado de Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Ortodoncia.

La aprobación de la impresión de su tesis represente un hito significativo en su trayectoria académica y profesional. Es el reflejo de su arduo trabajo, dedicación y la profundidad de su investigación en el campo de la Estomatología.

Le insta a que proceda con los pasos necesarios para la impresión y presentación de Tesis, cumpliendo con todas las normativas y plazos establecidos por la Facultad. Esto incluye la revisión final de su documento, asegurándose de que desempeñe todos los requisitos académicos y formatos establecidos, así como la coordinación con la Secretaría para la programación de su examen profesional.

Para cualquier consulta, aclaración o información adicional, le invito a contactar directamente a este Posgrado, estamos aquí para asistirlo en cada paso restante de su proceso académico.

Sin otro particular, le reitera mi más atenta y distinguida consideración y le deseo éxito en la etapa final de esta carrera académica.

A t e n t a m e n t e

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a miércoles 22 de mayo de 2024

MEP. Gisela Nataly Rubín de Celis Quintana
 Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología

*Nota: Se anexa Formato de Impresión de Tesis - C. Mayra Daniela Carrera González - Maestría en Estomatología con opción en Terminal en Ortodoncia - S.I.E.P. - Facultad de Estomatología - BUAP. (origina) - p.s.c.y.a.

*C.c.p. Archivo

*MCO. FJMA/MEP. GNRCQ/yaneth

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología

31 poniente 1304, Col. Volcanes
 Puebla, Pue.
 C.P. 72410
 Tel. Of. 22*22 29 55 00
 Ext. 5526

II. AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

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

Para obtener el Grado de: **Maestra en Estomatología con opción terminal en Ortodoncia**

Registro CIFE: 2024243.

Fecha de Registro ante CIFE: viernes 16 de febrero del 2024.

Título de la Tesis: "Viabilidad y proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y compresión mecánica"

Nombre del alumno: Mayra Daniela Carrera González.

Matrícula: 222450006.

Domicilio: 4 poniente No. 505, Cd. Serdán, Puebla.

Tel: 22*23 36 36 22.

Fecha de ingreso a la Facultad: lunes 03 de enero del 2022.

Firma: 

Director de Tesis: MO. Laura Mónica López Pérez Franco.

Grado académico: Maestra en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100527897.

Tel: 22*25 18 0320.

Firma: 

Director Disciplinario: MO. Alejandro Andrade Torres.

Grado académico: Maestría en Ortodoncia.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100426177.

Tel: 22*24719676.

Firma: 

Director Metodológico: DC. Miguel Ángel Casillas Santana.

Grado académico: Doctor en Ciencias Estomatológicas.

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100526485.

Tel: 44*48 46 76 45.

Firma: 

Lector: MO. Yareli Hernández Ávila.

Grado académico: Maestra en Ortodoncia

Adscripción: Facultad de Estomatología.

ID: 100426099

Tel: 22*21 99 20 62.

Firma: 

Nombre y firma de aprobación del presidente de la academia/Responsable de la Maestría en Estomatología con Opción terminal en Ortodoncia

MO. Farid Alfonso Dipp Velázquez

Firma: 

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


MEP. Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana



fecha: miércoles 22 de mayo del 2024.

Sello



Constancia No. FESIEP/CIFE/248/2024

MO. Laura Mónica López Pérez Franco
 Responsable del Proyecto de Investigación
 Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología
 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
 PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo, la que suscribe MEP, Gisela Nataly Rubin de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Es mi deber informarle acerca de una actualización significativa relacionada con el Proyecto de Investigación (Colectivo) que Usted lidera.

Título original:

"Proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y comprensión mecánica".

Fue presentado por el equipo compuesto por:

No.	Cargos	Nombres	ID - Matriculas
1	Responsable del Proyecto de Investigación:	MO. Laura Mónica López Pérez Franco	100527897
2	Director Disciplinario:	MO. Alejandro Andrade Torres	100426177
3	Directora Metodológica:	DC. Miguel Ángel Casillas Santana	100526485
4	Estudiante de Maestría en Estomatología <u>Terminal en Ortodoncia</u>	C. Mayra Daniela Carrera González	222450006

Dicho proyecto fue registrado en el libro de registros 09, página 01, bajo el No. de asignación 2024243, con fecha asentada el día viernes 16 de febrero del año vigente, ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.).

Se hace constar, que, el día lunes 20 de mayo del presente año, el C.I.F.E. recibió su notificación de Cambio de Título y anexo de un Asesor Externo a su Proyecto de Investigación. Tras su revisión y aprobación:

El título ha sido modificado a:

"Viabilidad y proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y comprensión mecánica".

La actualización de los integrantes del proyecto queda de la siguiente manera:

No.	Cargos	Nombres	ID - Matriculas
1	Responsable del Proyecto de Investigación:	MO. Laura Mónica López Pérez Franco	100527897
2	Director Disciplinario:	MO. Alejandro Andrade Torres	100426177
3	Directora Metodológica:	DC. Miguel Ángel Casillas Santana	100526485
4	Asesora Externa:	DC. Maura Cárdenas García Campus Regional Tehuacán Puebla - BUAP	100337388
4	Estudiante de Maestría en Estomatología <u>Terminal en Ortodoncia</u>	C. Mayra Daniela Carrera González	222450006

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología | 31 poniente 1304, Col. Volcanes
 Puebla, Pue.
 C.P. 72410
 Tel. Of. 22*22 29 55 00
 Ext. 5526



BUAP

Sin más por el momento y esperando una colaboración continua, le reitero mi disposición para cualquier consulta o aclaración.

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a lunes 20 de mayo del 2020

MEP. Gisela Lidia Rubín de Celis Quintana
Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
Facultad de Estomatología



*C.c.p. Archivo
*MCO.FJMA/MEP.GNRCQ/ymeth

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado Facultad de Estomatología	31 poniente 1304, Col. Volcanes Puebla, Pue. C.P. 72410 Tel. Of. 22'22 29 55 00 Ext. 5526
---	---

III. OFICIO DE ACEPTACIÓN DE C.I.F.E



Constancia No. FESIEP/CIFE/023/2024

MO. Laura Mónica López Pérez Franco
 Responsable del Proyecto de Investigación
 Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología
 Benemérita Universidad Autónoma de Puebla
 PRESENTE

Sirva este medio para enviarle un cordial saludo, asimismo la que suscribe MEP. Gisela Nataly Rubín de Celis Quintana en mi calidad de Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, y tras un detenido análisis y evaluación en el Proyecto de Investigación (Colectivo):

Nombre del Título del Proyecto:

"Proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y comprensión mecánica"

Presentado por:

No.	Cargos	Nombres	ID y/o Matrícula
1	Responsable del Proyecto de Investigación:	MO. Laura Mónica López Pérez Franco	100527897
2	Director Disciplinario:	MO. Alejandro Andrade Torres	100426177
3	Director Metodológico:	DC. Miguel Ángel Casillas Santana	100526485
4	Estudiante de Maestría en Estomatología: <u>Terminal en Ortodoncia</u>	C. Mayra Daniela Carrera González	222450006

HAGO CONSTAR que, ha sido oficialmente ACEPTADO. Este relevante proyecto, ha sido registrado ante el Comité de Investigación de la Facultad de Estomatología (C.I.F.E.), inscrito en el libro de registros No. 09, página 01, bajo el No. de asignación 2024243, en la Secretaría de Investigación de esta Unidad Académica.

Para los fines legales que los interesados convengan, y sin otro particular, reitero a Usted mi más atenta y distinguida consideración.

Atentamente
 "Pensar bien, para vivir mejor"
 H. Puebla de Z., a viernes 16 de febrero de 2024.

MEP. Gisela Nataly Rubín de Celis Quintana
 Secretaria de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología

*C.c.p. Archivo
 *MCO. FJMA/MEP. GNRCQ/#eneth

Secretaría de Investigación y Estudios de Posgrado
 Facultad de Estomatología
 31 poniente 1304, Col. Volcanes
 Puebla, Pue.
 C.P. 72410
 Tel. Of. 22*22 29 55 00
 Ext. 5526

IV. REPORTE DE SIMILITUD ANTIPLAGIO

Mayra

ORIGINALITY REPORT

13%	11%	3%	7%
SIMILARITY INDEX	INTERNET SOURCES	PUBLICATIONS	STUDENT PAPERS

PRIMARY SOURCES

1	Submitted to BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTONOMA DE PUEBLA BIBLIOTECA Student Paper	4%
2	hdl.handle.net Internet Source	1%
3	docplayer.es Internet Source	1%
4	Submitted to umb Student Paper	1%
5	Submitted to Universidad Nacional del Centro del Peru Student Paper	1%
6	Ruiz Gaspà, Sílvia. "Cultivo primario para el estudio de la función osteoblástica", Bellaterra : Universitat Autònoma de Barcelona,, 2006 Internet Source	<1%
7	patents.google.com Internet Source	<1%

repositorioinstitucional.buap.mx

V. AGRADECIMIENTOS

Doy gracias a Dios por ponerme en el camino con las personas adecuadas, en el lugar y momento precisos. Gracias porque no te cansas de demostrarme tu amor.

Este trabajo simboliza el final de una de las etapas más bonitas que un día pude imaginar. Es el cúmulo de un conjunto de historias y personas que contribuyeron desinteresadamente.

Quiero agradecer a mi madre, gracias Grillito, por estar siempre, por ser inspiración, apoyo y mi aliciente en todo lo que emprendo. No me canso de admirarte.

Gracias a mis padres. Flor y Filemón. Por enseñarme que para el amor nada tiene límite. Gracias por el apoyo incondicional y nunca abandonar mi camino.

Gracias a mi hermana Cami. Por los cafés durante el propedéutico y esperarme en casa siempre con amor. Gracias por que a pesar de tu corta edad siempre serás mi lugar seguro.

Gracias a la familia Carrera González, que siempre se hace presente y me hace sentir respaldada en todo momento. Siempre están en mi mente en cada paso que doy.

Gracias a toda la familia del posgrado, a mi hermano menor Eduardo Juárez por su compañía y cariño. En especial gracias a Paola Romero, Yuri Avilés, Rebeca Flores y Omar Berlanga por brindarme su amistad y amor estando lejos de casa. Tienen un lugar único en mi vida y mi corazón. Deseo que su futuro sea brillante y excepcional. Nuevamente gracias a Omar, por ser mi compañero en la aventura de cultivar células, por soportar mis momentos difíciles y nunca dejarme sola

Gracias a Mariana Huerta, Julieta Campos y Diana Barreda, por brindarme su amistad en esta etapa, gracias por emprender juntas el sueño de ser especialistas.

Gracias a mis docentes, no quiero olvidar a ninguno porque todos son importantes y su apoyo en mi formación es algo que valoro y aprecio mucho. Gracias por compartir su conocimiento y siempre enseñar desde su lado humano.

Gracias a la Dra. Mónica López, el Dr. Miguel Ángel Casillas y al Dr. Alejandro Andrade por su apoyo y soporte incondicional en la elaboración de este proyecto, gracias por siempre confiar en mí.

Gracias al Dr. Farid Dipp por apoyar a la gestión de este proyecto.

Gracias a la Dra. Maura Cárdenas por abrirnos las puertas de su laboratorio, por orientarnos con paciencia y dedicación. La oportunidad que nos brindó permitió que todo esto fuera posible.

Gracias al Dr. Toledo Solano Miller, al MC. Luis Rendón y al MC FA. Hugo Avalos de la facultad de ciencias físico Matemáticas de la BUAP. Por el apoyo, la disposición y la paciencia para este proyecto.

Gracias porque sin ustedes nada hubiera sido posible y eso siempre vivirá en mi corazón.

VI. ÍNDICE GENERAL

Título: “VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASOS EXPUESTOS A VIBRACIONES DE ALTA FRECUENCIA Y COMPRESIÓN MECÁNICA”	15
1.-RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	15
2.-INTRODUCCIÓN	16
3.- ANTECEDENTES	17
3.1 ANTECEDENTES GENERALES	17
3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	23
4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
5.-JUSTIFICACIÓN	26
6.-HIPOTESIS	27
7.-OBJETIVOS	27
7.1 General:	27
7.2 Específicos	27
8.-MATERIALES Y MÉTODOS	28
8.1 Diseño del estudio.	28
8.2 Población y muestra.	28
8.3 Criterios de selección.	28
8.4 Variables	29
8.5 Concordancia y fiabilidad.	30
8.6 Ubicación espaciotemporal	30
8.7 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS	32
8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	52
9.-RESULTADOS	53
10.-DISCUSIÓN	59
11.-CONCLUSIONES	62
12.- BIBLIOGRAFÍA	63

VII. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

<i>Figura 1</i>	32
Figura 2.....	32
Figura 3.....	33
Figura 4.....	34
Figura 5.....	34
Figura 6.....	34
Figura 7.....	35
Figura 8.....	36
Figura 9.....	36
Figura 10.....	37
Figura 11.....	37
Figura 12.....	38
Figura 13.....	38
Figura 14.....	39
Figura 15.....	39
Figura 16.....	39
Figura 17.....	40
Figura 18.....	41
Figura 19.....	41
Figura 20.....	41
Figura 21.....	43
Figura 22.....	43
Figura 23.....	44
Figura 24.....	44

Figura 25.....	44
Figura 26.....	44
Figura 27.....	45
Figura 28.....	46
Figura 29.....	47
Figura 30.....	47
Figura 31.....	48
Figura 32.....	49
Figura 33.....	50
Figura 34.....	51
Figura 35.....	51
Figura 36.....	51
Figura 37.....	51
Figura 38.....	52
Figura 39.....	54
TABLA 1.RESULTADO DE LA CALIBRACIÓN DE DISPOSITIVO.	53
TABLA 2 LECTURA DE PRUEBA MTT DE CURVA DE CRECIMIENTO 24 HORAS.	55
TABLA 3 LECTURA DE PRUEBA MTT DE CURVA DE CRECIMIENTO 48 HORAS	55
TABLA 4 LECTURA DE PRUEBA MTT DE CURVA DE CRECIMIENTO 72 HORAS	55
TABLA 5. LECTURA DE PRUEBA MTT DE CURVA DE CRECIMIENTO 96 HORAS	56
TABLA 6 RESULTADO DE CONTEO CELULAR DESPUÉS DE ESTÍMULOS	56

VIII. ABREVIATURAS

°C Grados centígrados

ARN Ácido Ribonucleico

ATM Articulación Temporo-Mandibular

ATP Adenosin Trifosfato

bFGF Factor básico de crecimiento de fibroblastos

cm² Centímetro(s) cuadrado(s)

DMEM Medio eagle modificado de Dulbecco

Dra. Doctora

FBS Suero Bovino Fetal

FDA Food and Drug Administration

FEBUAP Facultad de Estomatología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

g Gramos

Hz Hertz

HGF Fibroblastos gingivales humanos

IGF-1 Factor de crecimiento insulínico tipo 1

IL-1 β Interleucina 1-beta

ml Mililitros

mm Milímetros

mM Milimol(es)

OPG Osteoprotegerina

OTM Orthodontic Treatment Movement

FBS Buffer fosfato salino

PGE₂ Prostaglandina E₂

pH Potencial de hidrógeno

PLM Product life manager

pps Partes por segundo

RANK Receptor activador para el factor nuclear kappa β

RANK-L Ligando del receptor activador para el factor nuclear kappa β

ROS Especies reactivas de oxígeno

S Segundos

u Unidades

u/ml Unidades por mililitro

$\mu\text{g/ml}$ Microgramo por mililitro

μg Microgramo

Título: “VIABILIDAD Y PROLIFERACIÓN DE FIBROBLASOS EXPUESTOS A VIBRACIONES DE ALTA FRECUENCIA Y COMPRESIÓN MECÁNICA”

1.-RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

En el ámbito de la ortodoncia, las vibraciones mecánicas han sido introducidas con el propósito de acelerar el movimiento dental. A pesar de investigaciones realizadas a lo largo del tiempo para evaluar su eficacia, los dispositivos de vibración fueron comercializados sin resultados concluyentes sobre su capacidad para acelerar el movimiento dental. Actualmente, se observa una tendencia hacia la investigación celular para comprender mejor su impacto en el proceso de remodelado óseo y su influencia sobre las células responsables del mismo.

En este estudio, se evaluó la proliferación de fibroblastos del ligamento periodontal obtenidos de un cultivo primario. Estas células se sometieron a estímulos como lo son vibración (150-175 Hz), compresión (2g), y una combinación de ambos, simulando así el proceso de ortodoncia. La proliferación fue evaluada mediante la prueba MTT, donde se encontró que el grupo Vibración y Compresión-Vibración proliferaron más respecto a su control y el grupo Compresión disminuyó su viabilidad.

Palabras clave: *vibraciones de alta frecuencia, proliferación celular, viabilidad celular, movimiento dental ortodóncico, fibroblastos*

2.-INTRODUCCIÓN

La ortodoncia es el área de la odontología encargada de la corrección de las maloclusiones dentales, su aplicación y desarrollo ha logrado evolucionar durante el paso de los años. Esta rama de la odontología se ha adaptado a las necesidades del paciente, a la época en que se desarrolla y los avances tecnológicos que están en constante innovación. Así mismo, el paciente ortodóncico ha logrado cambiar con él paso de los años, entre esos cambios encontramos sus expectativas sobre el tratamiento, sobre lo que espera estéticamente, el precio que está dispuesto a pagar y el tiempo que desea dure el tratamiento. Al atender a esta última, las vibraciones mecánicas se introdujeron a la ortodoncia en busca de la aceleración del movimiento dental siguiendo la evidencia reportada en el área médica sobre su influencia en las células osteoblásticas.

Las vibraciones de baja y alta frecuencia tienen efectos anabólicos y catabólicos sobre el proceso de remodelado óseo y este efecto será diferente dependiendo de la intensidad y el momento en que se apliquen. Las vibraciones de alta frecuencia y la compresión mecánica pueden estimular la proliferación de fibroblastos y a su vez estas células pueden aumentar en número en respuesta a este tipo de estímulos. Este proceso es importante en la reparación de tejidos dañados como es en el caso del movimiento dental que es una respuesta del organismo dónde el hueso se repara y remodela a favor de las fuerzas aplicadas.

Las vibraciones mecánicas ya se encuentran en el mercado y son aplicadas en dispositivos con acceso al público en general. Sin embargo, la evidencia actual no sigue una línea cronológica de investigación que permita al clínico recomendar su uso con el suficiente sustento científico ya que los resultados son contradictorios y algunos de ellos no cuentan con el diseño adecuado para la evaluación de su efecto en el tratamiento ortodóncico. Atento a lo anterior, nació el propósito de realizar el presente estudio donde se evaluó el uso de las vibraciones de alta frecuencia del dispositivo A10™ (150-175Hz) el cual se encuentra en el mercado ofreciendo acelerar el movimiento dental y es un dispositivo de libre venta. Este estudio se realizó *in vitro*, ya que existe información limitada que evalué la vibración, tanto a nivel clínico como celular, y la poca que se tiene a nivel celular, en su mayoría no ha sido aplicada con carga compresiva, componente básico para simular el proceso ortodóncico *in-vitro* y/o en vibraciones de alta frecuencia; además, estudios recientes han demostrado que las vibraciones de alta frecuencia pueden influir positivamente en la homeostasis ósea, no obstante, no se han dilucidado los mecanismos a través de los cuales las vibraciones de alta frecuencia pudieran tener una influencia sobre las células del ligamento periodontal; fibroblastos, osteocitos y osteoblastos; por ello es de suma importancia profundizar en el tema y con base a estos resultados dar pauta a futuras líneas de seguimiento.

3.- ANTECEDENTES

3.1 ANTECEDENTES GENERALES

La maloclusión dental es definida por la OMS como una anomalía dentofacial perjudicial, la cual implica una oclusión anormal y/o relación craneofacial alterada, esta presenta una afectación funcional y estética, que altera a su vez el bienestar psicosocial del paciente a cualquier edad (1).

Los objetivos del tratamiento ortodóncico implican una mejora en la función y en la estética dentofacial dependientes del tipo de maloclusión ortodóncica dental y/o esquelética, y conllevan un aumento en el tiempo del tratamiento, esto da paso a una nueva etapa, la de la ortodoncia acelerada, la cual implica cumplir con los mismos objetivos en un menor rango de tiempo y disminuye los factores indeseables que podemos tener como consecuencia de periodos prolongados del tratamiento. La búsqueda de la ortodoncia acelerada es relevante ya que es la causa de la introducción de las vibraciones de baja y alta frecuencia en el área ortodóncica (2).

Vibraciones en Ortodoncia y su papel en el metabolismo óseo

Las vibraciones son estímulos caracterizados por movimientos oscilatorios, los cuales van a tener tres factores principales:

- a) Frecuencia (Medida en Hertz, siendo el número de oscilaciones por segundo).
- b) Amplitud (Medida en mm, se refiere a la altura máxima que alcanza la onda).
- c) Dirección del movimiento (3).

Con base a lo anterior, estos dispositivos vibratorios se van a dividir en dos, es decir, en baja y alta frecuencia; los de baja frecuencia van a ser menores o iguales a 45 Hz, mientras que los de alta frecuencia serán mayores o iguales a 90 Hz (4), actualmente encontramos en el mercado diversos dispositivos que brindan vibraciones mecánicas para ser utilizados en el área dental, el AceceleDent® y el A10™ son algunos ejemplos y que siguiendo las especificaciones del fabricante producen 30 Hz y 150-175 Hz de frecuencia respectivamente (5). Las vibraciones mecánicas como respuesta a cualquier estímulo externo, iniciarán su proceso mediante la recepción por la membrana, seguido de una transducción en señales intracelulares eléctricas que inducirán una respuesta del periodonto, aumentando la actividad celular presente durante la osteogénesis. La estimulación mecánica es importante en el mantenimiento del hueso alveolar (6).

En los últimos años se ha analizado el efecto de las vibraciones en el metabolismo óseo, así como los efectos catabólicos o anabólicos dependientes de la presencia o ausencia de cargas mecánicas; no obstante, los estudios que se encuentran en la literatura son escasos e insuficientes los enfocados en células dentales humanas, pese a eso dispositivos vibratorios ya se encuentran en el mercado (7,8). Por lo tanto, para poder tener un contexto sobre las vibraciones y como podrán ser aplicadas en este estudio

hablamos de investigaciones enfocadas en el tratamiento ortodóncico y de estudios realizados de manera *In vitro* ya que son pocos los que han evaluado directamente la proliferación de células especializadas en el recambio óseo como lo son los fibroblastos (9).

Uno de los primeros investigadores en describir el efecto de las vibraciones pulsantes contra las fuerzas continuas en ortodoncia, fue el trabajo de Shapiro et al. 1979, el cual aplicó una fuerza pulsante a los dientes para estimular la actividad osteogénica y mejorar el movimiento de los dientes y reportó una probable deformación ósea dependiente de la magnitud de la tensión mecánica. En ese momento fue la única información reportada en la literatura sobre el movimiento dental inducido por las fuerzas pulsátiles y planteaba un amplio panorama a futuras investigaciones (10).

En este sentido, la búsqueda por evaluar los resultados de las vibraciones no solamente se aplicó a la ortodoncia convencional, si no a ortodoncia con alineadores, Alansari et. al. 2018, utilizaron un dispositivo llamado V pro5 ® que ya no se encuentra comercialmente disponible y que vibra a 120 Hz, ellos evaluaron citocinas en el fluido crevicular gingival y los tiempos de recambio de los alineadores y el movimiento dental, como resultado, las vibraciones a esta frecuencia disminuían significativamente los intervalos de tiempo entre los alineadores, además, observaron niveles de citocinas y marcadores de remodelación ósea más altos ($P < 0.05$) (11).

Estas investigaciones han demostrado que las fuerzas mecánicas generadas por la ortodoncia convencional y las vibraciones impactan directamente en la microarquitectura y la composición celular de los tejidos periodontales. Estas fuerzas desencadenan una respuesta celular, lo que podría incluir a los fibroblastos que son células clave en la homeostasis y remodelación de la matriz extracelular.

Los fibroblastos, al ser sensibles a las fuerzas mecánicas, exhiben cambios en su actividad metabólica y proliferación en respuesta a estímulos físicos. Las vibraciones mecánicas pueden modular la expresión génica y la proliferación de fibroblastos (7).

Fisiología del movimiento dental en ortodoncia.

Las fuerzas aplicadas de manera ortodóncica producen como respuesta la remodelación de tejidos, entre ellos; el hueso alveolar, el ligamento periodontal (LPD), encía y vasos sanguíneos. Al realizar esta carga sobre el periodonto se genera una respuesta inflamatoria, la cual produce un cambio en la microcirculación del LPD, formando áreas de isquemia y vasodilatación, en respuesta a ello, se producen citoquinas, quimiocinas, factores de crecimiento, neurotransmisores, metabolitos del ácido araquidónico y hormonas (3).

En cuanto a las células responsables del modelado y remodelado óseo, mencionaremos a los fibroblastos, osteoclastos y osteoblastos, las cuales son capaces de responder ante un estímulo mecánico (7); Los fibroblastos son células que se encuentran en el tejido conectivo y son responsables de la producción y mantenimiento de la matriz extracelular. En el contexto del remodelado óseo, los fibroblastos juegan un papel importante en la

formación y mantenimiento del tejido óseo. Son responsables de la producción de colágeno y otros componentes de la matriz ósea, así como de la regulación de la actividad de los osteoblastos y osteoclastos, las células responsables de la formación y resorción ósea, respectivamente. Además, los fibroblastos también pueden secretar factores de crecimiento y citocinas que regulan la actividad de las células óseas y otros tipos celulares en el tejido conectivo. Por lo que podemos decir que los fibroblastos desempeñan un papel importante en el remodelado óseo al producir y mantener la matriz extracelular y regular la actividad de las células óseas (12).

Por su parte los osteoclastos participan mediante la degradación del tejido óseo mineralizado, regulan la homeostasis del calcio, la erupción y los movimientos dentales ortodóncicos, a esto, se le denomina osteoclastogénesis, para ello se van a adherir a la superficie del hueso donde se presentan enzimas proteolíticas que degradan la matriz extracelular (3). Una vez migradas las células a las zonas de resorción, se diferencian o activan, y el grado de reclutamiento, diferenciación, activación y mantenimiento de estas células, es dependiente del movimiento dental. La diferenciación de los osteoclastos se debe a la activación de RANK (receptor activador del factor nuclear kB) por RANKL (receptor activador del ligando del factor nuclear kB) expresado por las células estromales en la médula ósea y los osteoblastos (13).

Los osteoblastos son células responsables de la formación ósea, se dedican a la síntesis y depósito de proteínas de la matriz del hueso, regulan la diferenciación y actividad de los osteoclastos; por su parte, tienen un papel importante en el recambio óseo y la homeostasis del calcio; factores de transcripción como el Cbfa/Runx-2, son imprescindibles para la diferenciación de los osteoblastos al actuar en las fases tempranas, estos se derivan de células madre mesenquimales pluripotenciales que tienen la capacidad de diferenciarse en cuatro linajes (14).

Los osteoblastos maduros, son células no migratorias altamente diferenciadas que, pueden diferir en sus propiedades dependiendo de su etapa de desarrollo; su función depende de su categoría, es decir si se encuentra de manera activa, estos van a ser cúbicos, mononucleares y ricos en actividad de fosfatasa alcalina, los cuales, sintetizan y secretan colágeno tipo I y glicoproteínas (osteopontina, osteocalcina), citocinas y factores de crecimiento en una región de matriz no mineralizada (osteóide), entre el cuerpo celular y la matriz mineralizada, los osteoblastos también producen minerales de fosfato de calcio extra e intracelular (15).

Los osteocitos, son osteoblastos maduros que han quedado atrapados dentro de la matriz ósea y son responsables de su mantenimiento, luego, encontramos a las células del revestimiento óseo, las cuales no experimentan formación ni reabsorción ósea, finalmente, en último lugar los osteoblastos inactivos (15).

Los osteoblastos y osteocitos se comunican entre sí dando paso al calcio, prostaglandinas y citocinas, estos presentan la enzima fosfatasa alcalina (ALP), la cual permite la mineralización del material y media la reabsorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citocinas específicas y factores de crecimiento, esta es un marcador de diferenciación del fenotipo osteoblástico y un indicador de formación y recambio óseo (16). Para que ocurra la regeneración ósea como

consecuencia de la reabsorción provocada, se lleva a cabo la liberación de interleucinas y factores de crecimiento, lo que, a su vez, desencadena la migración de linfocitos, macrófagos y precursores de osteoclastos, estas a su vez promueven la diferenciación de colágeno tipo I, III, V y VII (16). Esta formación del hueso comienza de 40-48 horas después de la aplicación de la fuerza ortodóncica, donde los osteocitos y osteoblastos participarán respondiendo a la señal e iniciando la aposición ósea (4).

Los procesos de regeneración y degradación ósea son estimulados por la tensión, ya sea mediante la contracción muscular o por alguna carga extra, para ello las células óseas responden a las tensiones locales de manera precisa ante el estrés de rutina proporcionado por las actividades de la vida diaria, gracias a que tiene propiedades únicas de adaptación (14). Los osteoblastos regulan la actividad de los osteoclastos al expresar citocinas como RANKL y osteoprotegerina (OPG) que inhibe RANKL (13).

También participan en la remodelación ósea como respuesta al tratamiento ortodóncico: el factor de necrosis tumoral (TNF) $-\alpha$, interleucina (IL) -1β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, interferón- γ (IFN- γ), biomarcadores tisulares (metaloproteinasas de matriz (MMP) -1, MMP-2, MMP-9, inhibidores tisulares de MMP (TIMP) -1 y 2) y quimiocinas (CCL2, CCL3, CCL5, CCL7, CCL9, CXCL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL12 y CXCL-13), mediante la localización de leucocitos, células inmunes y células estromales (13).

El remodelado óseo es un proceso dinámico y altamente regulado que implica la formación y resorción de tejido óseo, y varios tipos de células desempeñan un papel crucial en este proceso (5). La proliferación de fibroblastos puede contribuir a la remodelación de los tejidos periodontales durante el movimiento dental, la expresión de biomarcadores específicos indica la acción positiva de los fibroblastos en la remodelación de los tejidos (17).

Cultivo celular

El cultivo celular es un conjunto de técnicas que permiten el crecimiento celular de manera controlada y en condiciones fisiológicas en un laboratorio. Esta técnica es uno de los procesos en investigación con mayor importancia ya que permiten estudiar de manera específica procesos celulares, bioquímicos y fisiológicos de cualquier tipo celular. Brinda información que permite evaluar un problema desde su unidad fundamental y trasladarlo hasta algo más complejo (18). Estas técnicas permiten que las células se multipliquen gracias a un medio de cultivo formado por una compleja mezcla de nutrientes y pH, estos nutrientes van a variar dependiendo de la línea celular a desarrollar, estas condiciones deben ser estables y constantes. Las células para cultivarse se pueden obtener mediante biopsias, tejidos o líneas celulares previamente cultivadas (19). Existen diferentes tipos de cultivo celular:

El cultivo primario se refiere a la técnica de cultivo celular a partir de un explante de tejido estéril que en condiciones fisiológicas normales generaran células nuevas. Se permite que las células se desplacen fuera del tejido después de una disección estéril, ya sea adhiriéndose a un sustrato o descomponiendo mecánicamente o enzimáticamente el tejido para generar una suspensión que usualmente contiene una variedad de células. Estas células

son más representativas del tejido, aunque no todas pueden sobrevivir y reproducirse en cultivos *in vitro* (20-22)

Cultivo celular secundario: Cuando las células de un cultivo primario crecen y se multiplican, consumen nutrientes y es necesario trasladar una parte de ellas a otro recipiente para proporcionarles más espacio y condiciones nutricionales óptimas. Este proceso se denomina subcultivo o pasaje celular. A pesar de que estas células conservan la mayoría de las características de los tejidos originales, después de un número limitado de subcultivos, típicamente alrededor de 10-20 (dependiendo del tipo celular), alcanzan la senescencia y dejan de reproducirse (23).

Líneas celulares continuas: Se trata de células seleccionadas durante el proceso de pasaje; se eligen aquellas con características deseables, como una mayor capacidad de crecimiento, y se homogeneizan en términos de genotipo y fenotipo. Algunas de estas células pueden tener el potencial de multiplicarse indefinidamente, lo que las convierte en líneas celulares continuas que pueden ser subcultivadas en serie durante numerosos pasajes, posiblemente infinitos, sin perder su capacidad de crecimiento, a estas células se les conoce como células inmortalizadas (23).

Evaluación de viabilidad y proliferación celular

El ensayo MTT se emplea para evaluar la actividad metabólica de las células como un indicador de su capacidad de supervivencia, reproducción y de cuán tóxicas pueden ser. Este método colorimétrico se fundamenta en la conversión de una sal de tetrazolio amarilla (conocida como bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) en cristales de formazán de color morado por parte de las células que están metabólicamente activas (24). Este ensayo colorimétrico se basa en la reducción de una sal de tetrazolio amarilla (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio o MTT) a cristales de formazán de color morado por las células metabólicamente activas. Las células viables contienen enzimas oxidorreductasas dependientes del NAD(P)H que reducen el TTM a formazán (25). Los cristales de formazán insolubles se disuelven utilizando una disolución de solubilización y la disolución coloreada resultante se cuantifica midiendo la absorbancia a 500-600 nanómetros con un espectrofotómetro multipocillos. Cuanto más oscura sea la disolución, mayor será el número de células metabólicamente activas viables (24). El ensayo MTT se realizó con el Kit I de proliferación celular del fabricante Roche el cual sirvió para las dos pruebas.

Viabilidad Celular y Proliferación Celular

El MTT se convierte en formazán principalmente por la acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa presente en las células viables. Las células metabolizan el MTT, y el producto formazán se acumula en las células viables, lo que resulta en la formación de cristales de color púrpura. Por lo tanto, la cantidad de formazán formado es directamente proporcional al número de células metabólicamente activas y, por ende, a la viabilidad celular. Este método permite determinar la cantidad de células vivas presentes en nuestra muestra (24). Además de evaluar la viabilidad, el ensayo MTT también puede ser utilizado para estimar la proliferación celular. A lo largo del tiempo, si las células están proliferando, la cantidad de formazán formado aumentará, ya que habrá más células metabólicamente activas, estas mediciones pueden ser apoyadas de un conteo celular (25).

Se realizó mediante el siguiente protocolo:

- Realizar un cultivo de tejidos utilizando microplacas de fondo plano de 96 pocillos, de calidad para cultivo de tejidos.
- Agregar reactivo de etiquetado MTT e incube en una atmósfera humidificada.
- Añadir tampón de solubilización e incubar en atmósfera humidificada.
- Evaluar la microplaca utilizando un lector ELISA de 550 a 600 nm con una longitud de onda de referencia de >650 nm.

3.2 ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Existen muy pocos artículos similares al presente estudio. En los antecedentes presentados a continuación existe únicamente un artículo realizado en fibroblastos donde se evalúa viabilidad celular mediante XTT, sin embargo, no se utiliza la compresión como método para simular el tratamiento de ortodoncia. También se incluyen aquellos artículos donde se midió viabilidad celular, pero en células del ligamento periodontal. Existen otros artículos en células en el contexto de las vibraciones los cuales no son incluidos pues evalúan biomarcadores y no viabilidad celular.

Judex et al.2018. Realizaron un estudio donde se analizaba el efecto de las vibraciones mecánicas sobre las tres principales líneas celulares involucradas en el movimiento dental: Fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos utilizando específicamente los dispositivos Acceledent® y Vpro5™ (30Hz durante 20 minutos y 120Hz durante 5 minutos respectivamente), se analizó la proliferación celular mediante un Kit de ensayo de proliferación celular. Además, para valorar la actividad de los osteoclastos y de la fosfatasa ácida se utilizó un kit AcidKit de Fosfatasa (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Los osteoblastos y fibroblastos mostraron mejores resultados de proliferación celular con el dispositivo VPro5™ lo que el autor interpreta como uno de los factores para acelerar el movimiento dental, sin embargo, en dicho estudio no se tomó en cuenta una medida estándar de compresión, la cual es completamente necesaria para simular la fuerza ortodóncica (7).

De los artículos que tomarían el factor de carga compresiva como una variable se encuentran el de Benjakul et al. 2018, sobre los efectos de la vibración mecánica de baja frecuencia combinada con la fuerza de compresión en las células del ligamento periodontal humano, se aislaron células de premolares extraídos de cuatro individuos y aplicaron tres ciclos de vibraciones de baja magnitud (0,3 g) a (30, 60 o 90 Hz) durante 20 min cada 24 horas incluyendo dos grupos más, uno al que se le añadió compresión de 1,5 g / cm² 48 horas y otro de vibración combinada con compresión, la viabilidad celular se evaluó mediante el ensayo MTT, Se calculó el porcentaje de viabilidad celular con respecto al control. Además de PGE₂, RANKL soluble (RANKL) y OPG cuantificado mediante ELISA, para la cuantificación de la expresión de RANKL, OPG y Runx² se utilizó PCR en tiempo real, se obtuvieron como resultados un aumento de PGE₂ y RANKL de manera significativa (P = 0,021 y P = 0,021), también observaron que la capacidad de las células para mantenerse con vida disminuyó de manera significativa en los grupos de compresión y vibración con compresión. Lo cual podría explicarse por la posible pérdida de células durante el proceso de extracción de un cilindro de vidrio utilizado para aplicar fuerza de compresión. Además, cuando combinaron la vibración con la fuerza de compresión, no se observó un aumento adicional en la reducción de la proliferación celular en comparación con la aplicación exclusiva de fuerza de compresión. La vibración no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad de las células PDL *in vitro* ya que la disminución celular que tuvo el grupo de compresión-vibración es atribuida a la posible pérdida celular al momento de extraer el disco de compresión (26).

También en 2018, Phusuntornsakul et al. Realizaron un estudio que se centró en investigar cómo la vibración mecánica combinada con fuerza de compresión afecta las respuestas celulares en células del ligamento periodontal humano (hPDL). Además de realizar prueba MTT para evaluar la viabilidad celular se examinaron varios marcadores incluyendo la ciclooxigenasa (COX)-2, la prostaglandina E2 (PGE2) y las interleucinas (IL)-6 e IL-8, tanto a nivel de ARN mensajero (ARNm) como de expresión de proteínas. Las células hPDL se expusieron a una frecuencia de vibraciones de 30 Hz con una compresión de 3g durante 20 min. El análisis de proliferación no reveló diferencias significativas en la viabilidad de las células de control y las estimuladas mecánicamente a las 72 horas. La combinación de vibración mecánica y fuerza compresiva aumentó sinérgicamente la expresión de ARNm de COX-2, IL-6 e IL-8 en células hPDL y posteriormente aumentó los niveles de PGE2, IL-6 e IL-8 en el medio de cultivo mediante la activación de la vía de COX. Dado que PGE2, IL-6 e IL-8 lo que sugiere la posibilidad de que la vibración mecánica pueda potenciar la resorción ósea alveolar en el sitio de compresión durante el movimiento dental ortodóncico mediante un mecanismo que involucra la vía de COX (27).

En el estudio de Kun-Hong Bai et. Al.2019, se observó el efecto de las vibraciones sobre la diferenciación osteogénica de las células madre del ligamento periodontal, para ello, aislaron dichas células de premolares y las distribuyeron de manera aleatoria en un grupo de cultivo de vibración mencionando una frecuencia de 40 Hz, una magnitud de 0.3g. durante 15min/24 h y un grupo control sin dicho estímulo; cabe destacar que no se menciona la aplicación de una fuerza compresiva que pudiera simular la carga ortodóncica, la expresión del gen de osteogénesis que se analizó fue mediante PCR-RT y la expresión de la proteína mediante Western blot, la capacidad de diferenciación de osteogénesis mediante tinción con rojo de alizarina, se obtuvo como resultados que las vibraciones a esta frecuencia y magnitud, habían producido un incremento en la capacidad de proliferación y migración de las células madre del ligamento periodontal (28). A pesar de que son pocos los artículos que han evaluado directamente proliferación de fibroblastos podemos deducir por los resultados en la literatura que estos podrían representar cambios celulares importantes que se dan al momento de aplicar estímulos como las vibraciones y con ello crear una línea de respuesta celular realizada por las tres principales líneas celulares involucradas en el movimiento ortodóncico; fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos (7,29).

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las vibraciones mecánicas tienen un efecto bifásico en el hueso alveolar que depende del contexto en el que sean aplicadas, en ese sentido, la medicina ha aprovechado su efecto anabólico para aumentar la densidad del hueso mientras que en ortodoncia se han usado con la finalidad de acelerar el movimiento dental a través del catabolismo óseo que se presenta cuando existe una fuerza mecánica de por medio (brackets), en teoría, como consecuencia, se acelera el tratamiento ortodóncico, es por ello que la mayoría de las publicaciones en el área son en términos de aceleración, sin embargo, estos reportes no son concluyentes y algunos de ellos presentan riesgos de sesgo en la metodología.

Con la finalidad de acelerar el tratamiento ortodóncico, se ha comercializado el dispositivo A10™ (vibraciones de alta frecuencia), sin embargo, como se menciona previamente, su efectividad es controversial, y destaca, que son limitadas las investigaciones en alta frecuencia como lo son los 150-175 Hz que alcanza el dispositivo, también son escasas las que determinen su efecto a nivel celular, y además, en la mayoría de ellas se excluye una variable de suma importancia “la compresión mecánica celular”, estrategia que permite simular un tratamiento de ortodoncia *in-vitro*. Asimismo, y a pesar de que ya existen algunas investigaciones en modelos animales y humanos, es de suma importancia establecer las bases celulares con un buen diseño metodológico que sustenten su uso futuro durante el tratamiento de ortodoncia y con fines de aceleración, o en su defecto, modificar este enfoque.

Las células encargadas del movimiento dental son los fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos, las cuales suelen presentar cambios que al ser interpretados de manera adecuada podrán hablarnos de qué es lo que sucede cuando aplicamos ciertos estímulos. A pesar de la importancia de la proliferación de fibroblastos en la fisiología del movimiento dental al ser células que participan activamente y regulan a las otras células participantes en el proceso celular y su relevancia clínica, se carece de una comprensión integral de cómo las vibraciones de alta frecuencia y la compresión mecánica influyen en este proceso. Por lo que se planea la siguiente pregunta:

¿Existe mayor Viabilidad y proliferación de fibroblastos al aplicar vibraciones de alta frecuencia 150-175 Hz y compresión mecánica?

5.-JUSTIFICACIÓN

Los fibroblastos, osteoclastos y osteoblastos presentes en el ligamento periodontal juegan un papel fundamental para facilitar el movimiento dental ya que son células encargadas de reaccionar a estímulos y con ello crear cambios en los tejidos. Por lo tanto, son el objetivo principal de técnicas, fármacos y dispositivos diseñados para acelerar el movimiento dental.

Estas células son capaces de detectar y responder a señales mecánicas, y entre estas señales podemos encontrar las vibraciones, que son una forma de señales mecánicas generadas por dispositivos oscilantes, gracias al diseño de estos dispositivos pueden aplicarse de manera sencilla y cómoda a las estructuras dentales comparadas con otras opciones más invasivas. Realizar estudios que nos ayuden a entender que está pasando a nivel celular desde el punto más básico, pero con el diseño experimental adecuado, podría darnos la pauta sobre el futuro de estos estímulos en la ortodoncia o bien, ser un precedente que nos lleve a nuevas investigaciones y enfoques.

Es por ello que los fibroblastos son las células ideales para este estudio ya que al proliferar nos hablan de un remodelado óseo debido a que están presentes en dicho proceso, ya sea por si solas al producir proteínas específicas o actuando sobre la proliferación de otras células igual de importantes en dicha serie de reacciones. Ahora bien, el diseño de un experimento que logre representar la fuerza aplicada durante el tratamiento ortodóncico al aplicarse carga compresiva y que además utilice uno de los dispositivos que esta de venta en el mercado el cual brinda una frecuencia de vibraciones que han sido las menos estudiadas, será un gran parteaguas para futuras investigaciones.

El presente estudio buscó llenar este vacío en la literatura científica al investigar de manera integral y específica cómo las vibraciones de alta frecuencia, la compresión mecánica y su interacción impactan la proliferación de fibroblastos. El objetivo es aportar un conocimiento más completo sobre la respuesta celular en el entorno ortodóncico, lo que podría tener implicaciones significativas en la optimización de los tratamientos ortodóncicos y la salud periodontal de los pacientes.

6.-HIPOTESIS

Hi: La viabilidad y proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y compresión mecánica es mayor a la proliferación de fibroblastos expuestos únicamente a compresión mecánica.

Ho: La viabilidad y proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y compresión mecánica es menor a la proliferación de fibroblastos expuestos únicamente a compresión mecánica.

7.-OBJETIVOS

7.1 General:

Evaluar la viabilidad y proliferación de fibroblastos expuestos a vibraciones de alta frecuencia y compresión mecánica

7.2 Específicos

- Evaluar las oscilaciones del dispositivo A10 para saber si son las mismas que reporta el fabricante.
- Evaluar si las vibraciones emitidas por el dispositivo A10 son constantes al colocarle la caja de cultivo con medio y células.
- Calcular y diseñar un disco de compresión que ejerza 2g de compresión.
- Realizar cultivo primario de fibroblastos para reproducir y experimentar con los mismos.
- Evaluar la viabilidad y proliferación celular *in vitro* en cultivos de fibroblastos periodontales mediante la prueba de ensayo MTT (sin estímulos).
- Evaluar la viabilidad y proliferación celular *in vitro* en cultivos de fibroblastos periodontales mediante la prueba de ensayo MTT después de la aplicación de vibraciones de alta frecuencia (150-175Hz/5min) (Solo vibración).
- Evaluar la viabilidad y proliferación celular *in vitro* en cultivos de fibroblastos periodontales mediante la prueba de ensayo MTT después de la aplicación de compresión (2.0g/cm²) (solo compresión).
- Evaluar la viabilidad y proliferación celular *in vitro* en cultivos de fibroblastos periodontales mediante la prueba de ensayo MTT después de la aplicación de vibraciones mecánicas (150-175Hz/5 min) y compresión (2.0g/cm²) (vibración y compresión).

8.-MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 Diseño del estudio.

- Experimental.
- Descriptivo.
- In Vitro.

8.2 Población y muestra.

Fibroblastos periodontales sembrados en microplacas de cultivo celular de 6 pozos, de fondo plano con un volumen de 200 microlitros

Muestreo:

Asignación aleatoria simple.

Dicho muestreo se llevó a cabo ya que las células en cultivo asumieron una constitución homogénea, evitando el problema inherente a la heterogeneidad de las muestras.

Grupos. 4 grupos divididos en:

- Control: 2 pocillos de 1 placa de seis pocillos con 2.5×10^5 células por pocillo sin estímulo alguno. Un control por grupo experimental
 - Vibración: 2 pocillos de 1 placa de seis pocillos con 2.5×10^5 células por pocillo a las cuales se les aplicaron vibraciones mediante el dispositivo A10 TM de 150-175 Hz, por 5 minutos. Un control por grupo experimental
- Compresión: 2 pocillos de 1 placa de seis pocillos con 2.5×10^5 células por pocillo a las cuales se les aplicó una compresión de $2g/cm^2$.
- Compresión y vibración: 2 pocillos de 1 placa de seis pocillos con 2.5×10^5 células por pocillo a las cuales se les aplicó una compresión de $2g/cm^2$ y vibraciones mediante el dispositivo A10 TM de 150-175 Hz por 5 minutos.

8.3 Criterios de selección.

8.3.1 Criterios de inclusión:

- Células de reciente ingreso.
- Volumen celular de 2.5×10^5 células por pocillo.

8.3.2 Criterios de exclusión:

- Volumen celular menor a 2.5×10^5 células por pocillo.

8.3.3 Criterios de eliminación

- Presencia de turbidez del medio.
- Presencia de gránulos en el sobrenadante.

8.4 Variables

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	CATEGORÍA	ESCALA	ANÁLISIS ESTADÍSTICO
Vibración	Estímulos caracterizados por movimientos oscilatorios.	Estimulo aplicado mediante el dispositivo A10™ a 150-175 Hz durante 5 minutos	Independiente cuantitativa por razón discreta	Hertz. 120Hz.	No se requiere
Carga compresiva	Presión a que está sometido un cuerpo por la acción de fuerzas opuestas que tienden a disminuir su volumen.	Fuerza aplicada mediante un cilindro de plástico de 32mm de diámetro.	Independiente Cuantitativa Por razón Discreta.	Gramos sobre centímetro cuadrado 2gr/cm ²	No se requiere
Viabilidad celular	Proporción de células vivas y funcionales existentes en una población celular.	Integridad estructural y funciona mediante el estudio MTT	Dependiente cuantitativa por razón Continua.	Células sobre centímetro cubico (células/cm ³)	Gráficos Porcentaje
Proliferación celular	Aumento en el número de células a través de la división celular	Células que proliferen evaluadas mediante el estudio MTT	Dependiente cuantitativa por razón Continua.	Células sobre centímetro cubico (células/cm ³)	Gráficos Porcentaje

8.5 Concordancia y fiabilidad.

Para asegurar la concordancia y fiabilidad de este estudio se llevaron a cabo diferentes pasos durante la parte experimental:

- Estandarización del procedimiento: Cada procedimiento fue realizado de manera estandarizada, tomando en cuenta desde tiempos iguales entre la toma de cada muestra, la aplicación de estímulos, la lectura de resultados hasta establecer protocolos de elaboración para cada paso, por ejemplo: resuspender el mismo número de veces al momento de tripsinizar las células.
- Calibración de equipos: El equipo de vibración fue calibrado con el vibrómetro Láser Doppler OMS LaserPoint LP01, además de ser un dispositivo completamente nuevo también fue utilizado con el 100% de carga siempre.
- Control de condiciones ambientales: Las células fueron cultivadas, almacenadas y estimuladas en la misma incubadora y en el mismo cuarto de cultivo celular.
- Pruebas piloto: se realizó una prueba piloto del experimento para identificar posibles problemas y ajustar el diseño experimental.

8.6 Ubicación espaciotemporal

Laboratorio de interferometría. Facultad de Ciencias Fisicomatemáticas BUAP

Laboratorio de Fisiología Celular. Facultad de Medicina BUAP

Aspectos éticos

El material biológico extraído del paciente vivo fue recolectado por un profesional de la salud tras una detallada explicación al paciente sobre el propósito de la muestra, el método de recolección y su finalidad. El paciente otorgó su consentimiento informado, redactado y presentado conforme a los principios éticos establecidos en el Código de Nuremberg y la Declaración de Helsinki (Anexo1). Las muestras obtenidas se destinaron exclusivamente con fines de investigación apegados a la no maleficencia. Todos los procedimientos realizados en el tejido siguieron las pautas especificadas en la normativa NOM-087-ECOL-SSA1-2002 y se adhirieron a los criterios establecidos por el Comité de Bioética de la FEBUAP y la FMBUAP (30):

- Beneficencia: El propósito de este estudio es maximizar los beneficios para la comunidad al tiempo que se minimizan posibles daños, llevando a cabo una evaluación exhaustiva de los riesgos y ventajas antes de realizar experimentos con células.
- No maleficencia: Se compromete a no causar daño innecesario a las células o tejidos utilizados en esta investigación.
- Confidencialidad: Se asegurará de que la información asociada a las células donadas y los datos de investigación se mantenga en secreto para preservar la privacidad de los donantes y prevenir cualquier forma de discriminación.
- Justicia: En este estudio, se garantizará una distribución equitativa de los beneficios y riesgos asociados a la investigación con células (25).
- El estudio a nivel celular permite un adecuado control de factores fisicoquímicos y fisiológicos del medio en el que se cultivan las células. Por lo que el manejo del

tejido fue realizado de manera adecuada y responsable de acuerdo con la NORMA Oficial Mexicana NOM-037-SSA3-2016, para la organización y funcionamiento de los laboratorios de anatomía patológica.

Normas de bioseguridad

- a. Utilizar batas o uniformes apropiados.
- b. Para ciertas actividades utilizar guantes, tapabocas, gorros.
- c. Usar calzado cerrado.
- d. Los uniformes y batas contaminadas se deben colocar en recipientes identificados, para proceder a su esterilización.
- e. Proteger los ojos y la cara de salpicaduras con lentes de seguridad u otros dispositivos de protección.
- f. Lavarse las manos antes y después de haber manipulado materiales, durante el trabajo con cultivos, al abandonar el laboratorio y cuantas veces sea necesario para evitar contaminaciones en los experimentos.
- g. Descontaminar por agentes químicos o calor todo el material biológico o contaminado con éste antes de ser eliminado.
- h. Limpiar y desinfectar las superficies y útiles de trabajo cada vez que se trabaja con distintas líneas.
- i. Verificar periódicamente las propiedades del cultivo.
- j. No tocarse partes del cuerpo mientras se está manipulando material biológico.
- k. No pipetear con la boca.
- l. Emplear las pipetas automáticas o propipeta
- m. No comer, beber, fumar, guardar alimentos, ni aplicar cosméticos en el laboratorio.

Fuentes de recolección

Se tomó una muestra de tejido de un paciente masculino sano libre de caries y enfermedad periodontal de la clínica de Ortodoncia de la FEBUAP para el cultivo primario de Fibroblastos periodontales.

8.7 PROCEDIMIENTOS Y TÉCNICAS

Calibración y caracterización de dispositivo de vibración A10™

El dispositivo A10 es un dispositivo de uso dental comercializado en México por la casa comercial TD (TD, Monterrey, N.L, México) (Figura 1) la indicación de este es para aceleración de movimiento dental durante el tratamiento de ortodoncia. Según el reporte del fabricante el dispositivo brinda vibraciones de alta frecuencia las cuales oscilan de +/- 150 Hz a 175 Hz, dicho dispositivo está indicado una vez al día durante 5 min. Como se muestra en la figura 2.



Figura 1. Dispositivo de Vibración. Muestra las partes del dispositivo. 1. Cargador de imán. 2. Dispositivo. 3. Limpiador bucal. 4. Cable toma corriente con salida USB. Tomado de TD™ (31)

ACELERADOR DE ORTODONCIA

CON SOLO 10 MIN AL DÍA ACELERA HASTA EN UN 40% TUS TRATAMIENTOS DE ORTODONCIA Y DISMINUTE EL DOLOR



¡EN SOLO 10! MINUTOS

El A10 está diseñado para que lo utilice el paciente de ortodoncia durante el tratamiento de alineadores o brackets para facilitar el movimiento menor de los dientes. Reduce el tiempo de tratamiento hasta en un 40% con brackets convencionales. El dispositivo de vibración A10 debe usarse durante un total de 5 minutos por día en una sola sesión.

- Alineador que emite vibraciones de alta frecuencia (+/- 150 hertz a 175 hertz).
- Para conveniencia del paciente solamente se requiere un uso diario de 10 minutos.
- Aumento gradual de la vibración hasta alcanzar su máxima potencia.
- Notificaciones luminosas para una fácil operación

Figura 4. Folleto promocional. Indicaciones del fabricante. Muestra los Hz a los cuales el fabricante reporta que oscila y el tiempo de uso para el paciente. Tomado de TD™ (31)

El dispositivo de medición de vibración LaserPoint LP01 de OMS (OMS, Optical Measurement Systems. Laguna Hills, CA. EE. UU), basado en la tecnología del láser Doppler y el láser de diodo, es un instrumento altamente preciso. Este equipo puede detectar vibraciones sin necesidad de contacto con objetos a una distancia de hasta cinco metros, sin requerir ajustes ópticos o mecánicos (Figura 3). El vibrómetro estándar LP01 tiene la capacidad de medir frecuencias de vibración de hasta 20 kHz (32).



Figura 7. vibrómetro láser Doppler OMS LaserPoint LP01. Tomado de OMS Corporation (32).

Para la caracterización y calibración del dispositivo A10™ se utilizó el vibrómetro Láser Doppler OMS LaserPoint LP01 existente en el laboratorio de interferometría en la Facultad de Ciencias Fisicomatemáticas BUAP.

Se establecieron puntos específicos del dispositivo A10 para realizar un mapeo de las oscilaciones que tenía el dispositivo (Figura 4).

Para el mapeo únicamente del dispositivo de vibración se establecieron tres puntos base sobre el mango del vibrador en la parte donde se sostiene el limpiador bucal y con ayuda del vibrómetro se midieron las oscilaciones.

Tomando en cuenta el mapeo inicial se eligió el punto uno para medir las oscilaciones del dispositivo durante 10 min ya que el fabricante reporta que se puede usar de 5 a 10 min consecutivos, los registros se realizaron cada que existía una variante en la cantidad de Hz (Figura 5).

El dispositivo se mantuvo todo el tiempo sostenido con una pinza metálica ajustable a una mesa holográfica que esta dinámicamente amortiguada e impide la transferencia de movimientos propios del piso o ambiente para evitar alterar los resultados (Figura 6).

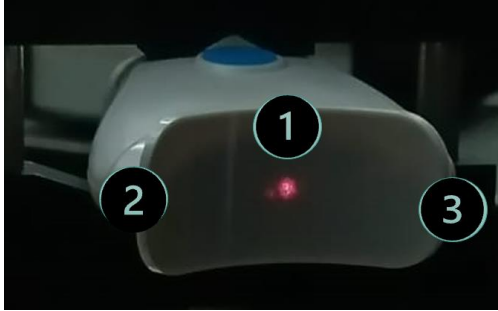


Figura 11. Puntos mapeados. Puntos de dispositivo de vibración que fueron mapeados con el vibrómetro (Fuente propia)

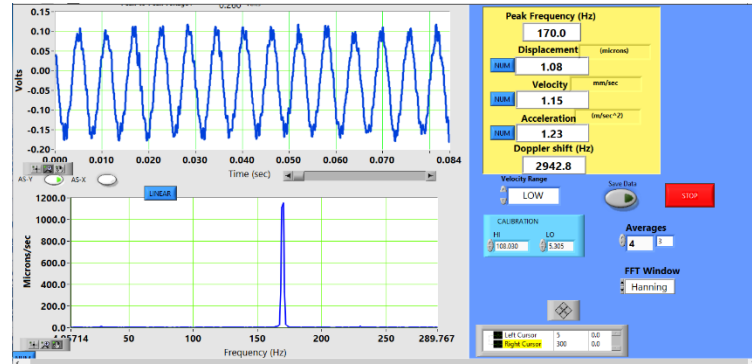


Figura 8. Imagen del software básico. Para adquirir los datos del vibrómetro, realizar FFT y convertir las señales recibidas a unidades de velocidad, aceleración y desplazamiento (Fuente propia).

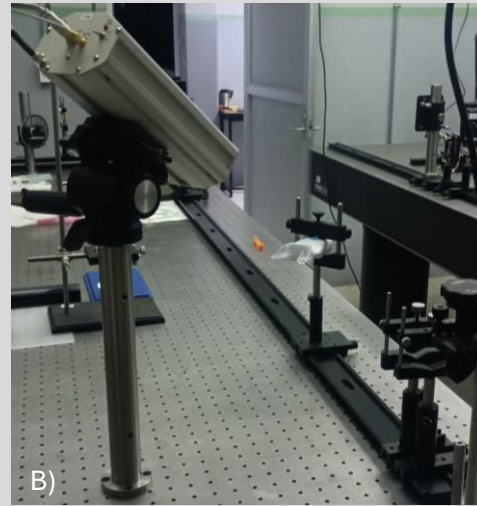
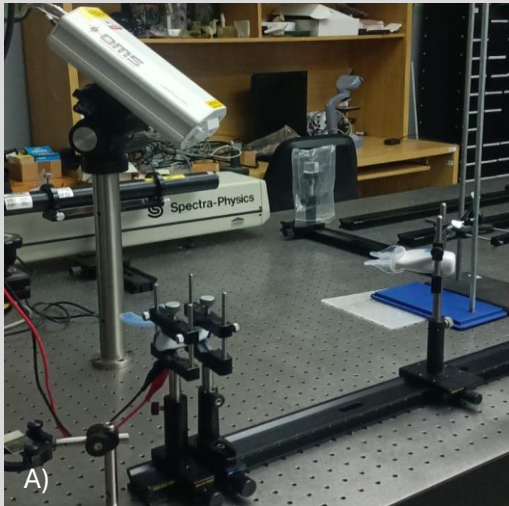


Figura 14. Ubicación para calibración de dispositivo A10. A) y B) Imagen del dispositivo de vibración en la posición para el mapeo inicial sobre una mesa que inhibe vibraciones externas (Fuente propia).

Cálculo y diseño de dispositivo de compresión

Con el fin de representar la presión ejercida sobre los tejidos durante movimientos ortodóncicos, se diseñó un dispositivo que por sus características sea fácil de colocarse sobre las células y que solo con posicionarlo encima ejerza 2 g de compresión (33).

Para lograr este objetivo, se contó con el respaldo del laboratorio de interferometría de la Facultad de Ciencias Fisicomatemáticas de la BUAP. Se calculó y diseñó un disco de acrílico que incluye un cubo como asa para facilitar su manipulación y colocación en el pocillo. Los cálculos realizados tuvieron en cuenta la densidad del material, así como el tamaño y la disposición del disco dentro del pocillo, junto con el cubo diseñado para su manipulación. Inicialmente, se tomaron las medidas de los pocillos de la placa de 6 pozos que se utilizarían en el experimento. Se consideraron las dimensiones disponibles para el dispositivo de compresión, teniendo en cuenta que este debía contener tanto las células como el medio de cultivo necesario para su supervivencia, además de garantizar la adecuada aplicación de la compresión.

Primero se tomaron medidas con un Vernier del espacio disponible en el pozo para la colocación del dispositivo de compresión (Figura 7). Una vez que se obtuvo la información de las dimensiones del pocillo se calculó el disco de compresión. Se tomó como fórmula principal $Densidad = masa/volumen$, los datos con los que contábamos era la densidad del acrílico que en este caso era de 1.19 y contábamos con cierta información para el volumen; el diámetro del disco y la altura aproximada que tendría el cubo de acuerdo con las dimensiones que sacamos con el vernier del pocillo (Figura 8).



Figura 7. Toma de medidas de pocillo para diseño de disco de compresión (Fuente propia).

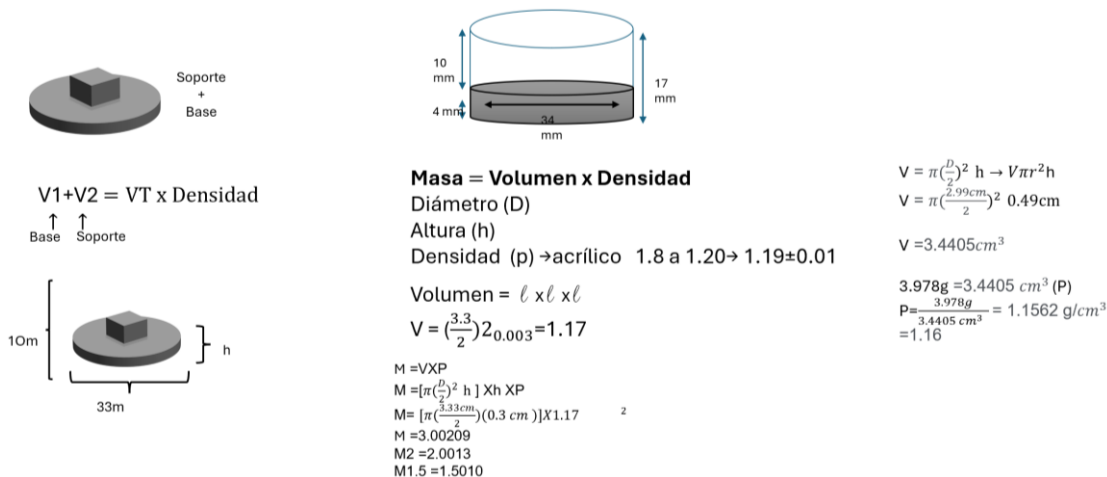


Figura 8. Desarrollo de ecuación para cálculo de dimensiones de dispositivo de compresión (Fuente propia).

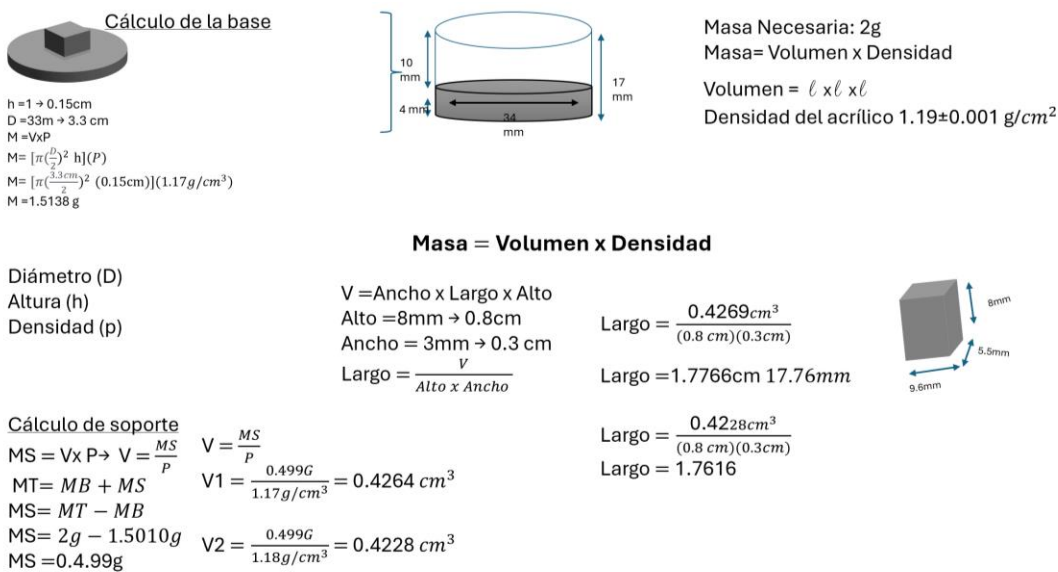


Figura 9. Desarrollo de ecuación para cálculo de dimensiones de dispositivo de compresión. Cálculo de soporte (Fuente propia).

Ya que nuestra masa necesaria era de 2g, entonces la masa por el volumen debe ser igual a 2. Para sacar el volumen del cubo se usó la fórmula de lado por lado por lado y para el disco base el volumen será igual a $\pi r^2 h$. Al sumar los dos volúmenes y multiplicarlos por la densidad nos dio 2, lo que es equivalente a 2g (Figura 9) (34,35).

Una vez que se calcularon las dimensiones del dispositivo de compresión se realizó el diseño de manera digital para poder cortar las piezas con láser, tanto del disco como del cubo, los cuales utilizaron acrílico de diferente grosor, para esto se utilizó un software

llamado "Nx de Siemens", el cuál es un software de PLM (product life manager) y se utilizó el módulo de diseño mecánico para realizar los croquis (sketches) que se utilizaron para la cortadora láser (figura 10).

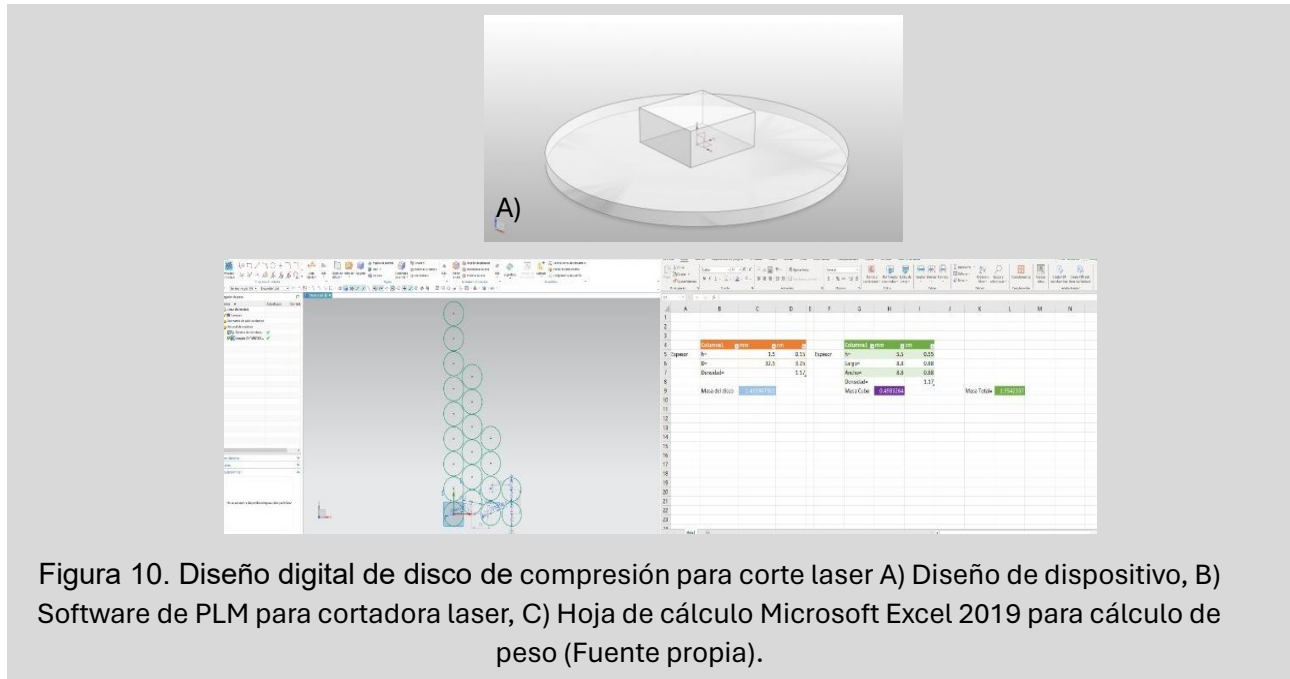


Figura 10. Diseño digital de disco de compresión para corte laser A) Diseño de dispositivo, B) Software de PLM para cortadora laser, C) Hoja de cálculo Microsoft Excel 2019 para cálculo de peso (Fuente propia).

Ya cortadas las piezas se pesaron en la balanza analítica todas por separado, los discos y los cubos y se registró el peso de cada pieza como se muestra en la (figura 11).

Con ayuda de adhesivo epóxico para acrílico se unieron las piezas para que juntas tuvieran un peso de 2g (Figura 12). Una vez pegadas se repitió el procedimiento de pesarlas en la balanza analítica ahora como piezas únicas (Figura 13).



Figura 11. Balanza analítica para la medición del disco de acrílico (Fuente propia).

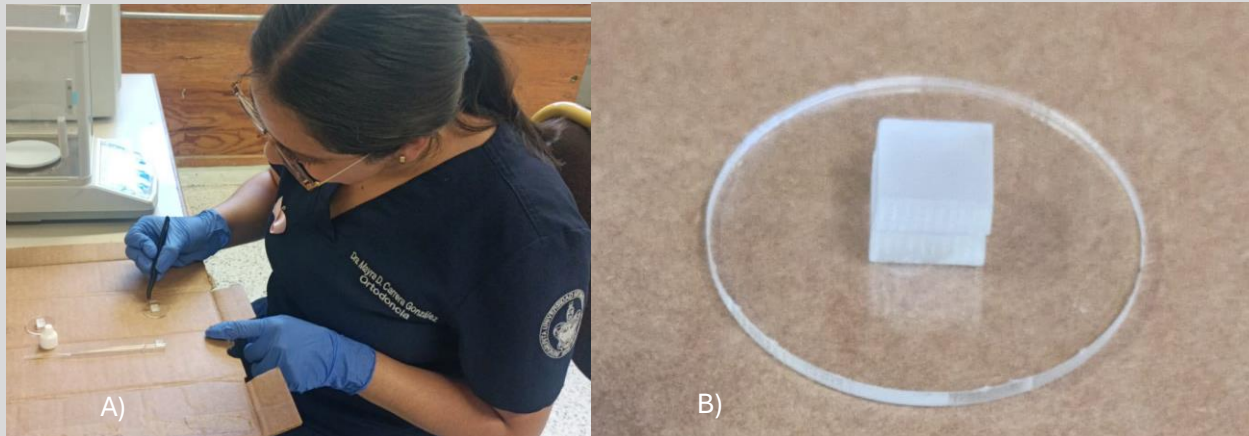


Figura 12. Elaboración de discos de compresión. A) Unión de cubos con disco de compresión. B) Dispositivo de compresión (Fuente propia).



Figura 13. Balanza analítica para la medición del disco de acrílico ya conformado (Fuente propia).

Prueba piloto de dispositivo de vibración A10™

Para verificar que las vibraciones tendrían una distribución homogénea al momento de realizar la parte experimental se realizó una prueba piloto en el siguiente orden:

1. Los discos de compresión se colocaron sobre el agua que simulaba el medio, estos fueron tomados con pinzas para simular la manera sutil en que deben colocarse para no dañar las células (Figura 14).
2. Se colocó el dispositivo de vibración A10 en una base con una pinza metálica para mantenerlo fijo (Figura 15).
3. Se establecieron puntos de mapeo en la placa de cultivo para ser medidos (Figura 16).
4. Se colocó la placa de 6 pozos sobre el vibrador, esta placa contenía 2 ml de agua simulando la cantidad de medio de cultivo en la que estarían las células (Figura 12).



Figura 14. Caja de 6 pozos con agua que simula medio de cultivo y discos de compresión (Fuente propia).

5. Sobre la placa de 6 pozos ya cerrada se colocó un nivel para establecer una posición replicable (Figura 13).
6. Una vez todo montado se encendió el dispositivo durante 5 min y se mapearon ciertas zonas en la caja de cultivo.



Figura 15. Prueba piloto. Ubicación de experimento y vibrómetro en posición para mediciones (Fuente propia).

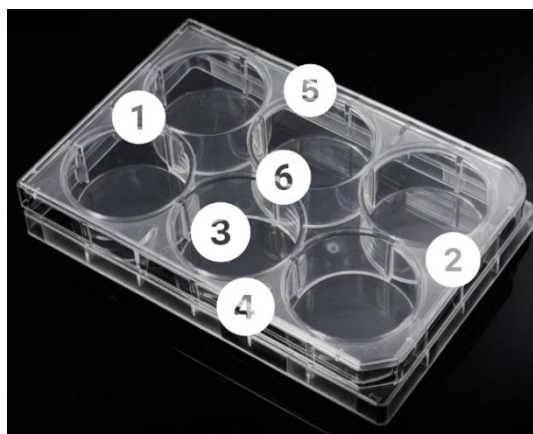


Figura 16. Puntos de mapeo. Ubicación de puntos a mapear en la caja de 6 pozos (Fuente propia).

Cultivo celular primario

Obtención de fibroblastos periodontales humanos.

Para la obtención de los fibroblastos se tomó una biopsia de tejido humano de un paciente masculino sano, libre de caries y enfermedad periodontal que acudió por tratamiento a la clínica de Ortodoncia de la FEBUAP y firmó el consentimiento informado (Anexo 1).

Se le explicó a él paciente la finalidad, así como el procedimiento, el cual se llevó a cabo en la misma clínica por el cirujano maxilofacial responsable quirúrgico de la misma.

- Con ayuda de unas pinzas adson desdentadas y estériles se tomaron partes del tejido residual unido a la raíz del órgano dentario al momento de hacer la extracción con el menor trauma posible (Figura 17).



Figura 17. Retiro de tejido en la parte de la raíz del OD extraído (Fuente propia)

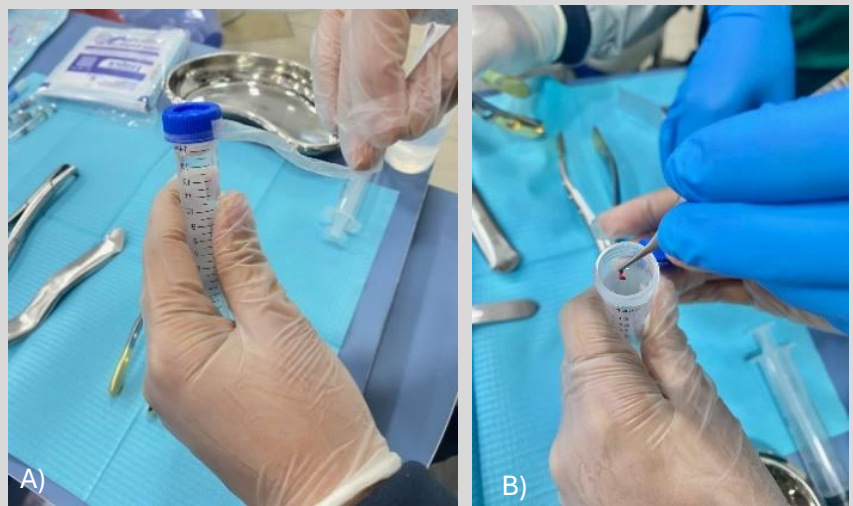


Figura 18. A) Y B) Almacenamiento de tejido en falcon para ser llevado a procesar (Fuente Propia).

- Él tejido fue depositado en un tubo falcon que contenía medio de cultivo DMEM a temperatura ambiente y sellado herméticamente, la muestra fue llevada inmediatamente al laboratorio para ser procesado (Figura 19).
- Una vez en el laboratorio el tejido fue depositado en cajas Petri con DEMEM y con ayuda de un bisturí el tejido se cortó en repetidas ocasiones hasta convertirlo en pedazos pequeños (Figura 20) (36).

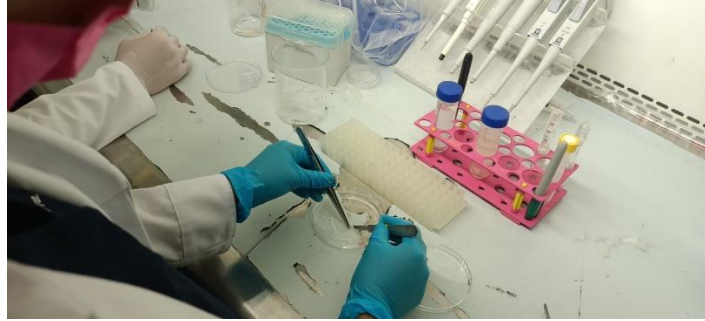


Figura 19. División del tejido con bisturí mango 3 hoja 15 (Fuente propia).

- Estos explantes se lavaron con solución salina amortiguada estéril (PBS) múltiples veces hasta observar que el tejido se encontrara libre de sangre (Figura 18).

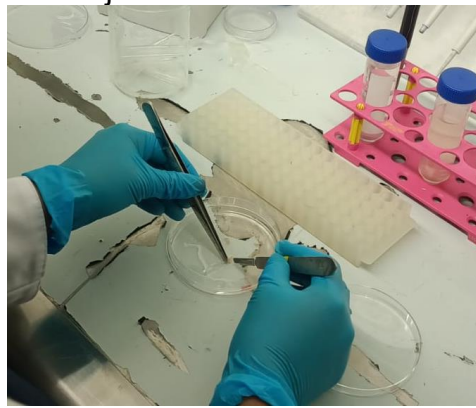


Figura 20. Lavado de explantes (Fuente propia)

- Los tejidos se observaron al microscopio para verificar la existencia nula o mínima de eritrocitos.
- Una vez que los tejidos estuvieron lo más libres de eritrocitos se cortaron en pedazos aún más pequeños y se repartieron lo más uniformemente en dos placas de 6 pozos que contenían 2ml de DEMEM suplementado al 10% de suero fetal bovino SFB y 4% de antibiótico (ATB).
- Una vez depositados en las cajas Petri, los tejidos se colocaron en una incubadora con cámara húmeda, manteniendo una temperatura de 37 °C y una atmósfera con un 5% de CO₂. Esta incubadora se encuentra ubicada en el Laboratorio de Fisiología Celular de la Facultad de Medicina de la BUAP. El laboratorio cuenta con un área estéril destinada a cultivos celulares y es donde se localiza la incubadora.
 - Se llevó a cabo el cambio de medio de cultivo cada 24 horas. Para ello, se realizaba una observación de los tejidos al microscopio antes y después del cambio, tras lo cual se volvían a colocar en la incubadora.
 - Durante una semana y media, se efectuó el cambio de medio cada 24 horas utilizando DEMEM suplementado con un 10% de SFB y un 4% de antibióticos.
 - Al no observarse indicios de la presencia de fibroblastos desprendidos de los tejidos, se decidió suplementar el medio de cultivo con un 10% de SFB y un 2%

de antibióticos. Además, se modificó la frecuencia del cambio de medio a cada 48 horas.

- Una semana después, se detectaron los primeros fibroblastos en los pocillos mediante observación microscópica.
- Con el objetivo de fomentar la replicación celular, se estableció un régimen de cambio de medio de cultivo cada 48 horas, utilizando un 10% de SFB y un 4% de ATB durante un mes.
- En cada cambio de medio, se evaluaba visualmente el aumento en el número de células en cada pozo, observando la confluencia de estas células. Esta evaluación se realizaba a simple vista, ya que era posible distinguir entre el tejido explantado y los propios fibroblastos.
- Después de 6 semanas desde la toma inicial del tejido, se alcanzó una confluencia del 99% en dos de los pocillos. En este punto, se procedió a la tripsinización de estos pocillos, ya que, si las células cubren toda la superficie del recipiente y no son trasladadas a un pozo de mayor tamaño comienzan a morir debido a la falta de espacio para su crecimiento.
- Antes de iniciar la tripsinización, el tejido que se quedó en el pocillo destinado a este procedimiento se transfirió a otro pocillo con menor confluencia.
- A continuación, se describe detalladamente el procedimiento:

Tripsinización para cambio de pozo por aumento de confluencia.

- Una vez que se verificó al microscopio la confluencia se retiró el medio de cultivo del pozo de la placa de 6 pozos.
- Se agregaron 2ml de PBS, se dejaron 3 segundos mientras se movía lentamente de manera circular para lograr que el PBS tocara todas las superficies.
- Se retiró PBS.
- Se agregaron 2 ml de tripsina.
- Se ingresó a la incubadora durante 5 min.
- Después de 5 min se sacó y se observó al microscopio para identificar si las células se habían desprendido y se encontraban flotantes en el medio, en caso de que se observaran células aun adheridas en el fondo de pozo se procedió a dar pequeños golpes verticales con los dedos justo en la zona donde estaban adheridos. Este procedimiento se repitió hasta comprobar en el microscopio que las células se habían desprendido.
- Este procedimiento se realizó de manera rápida y cronometrada pues la tripsina no puede estar en contacto con las células más de 10 min una vez que es depositada en el pozo.
- Antes de que pasaran esos 10 min y al comprobar que se habían desprendido las células, se neutralizó la tripsina con medio de cultivo, la cantidad debe ser el doble que la tripsina, en ese caso fueron 4 ml.

- Se resuspendió 20 veces el medio con la tripsina y de manera inmediata se pasó todo el contenido a un falcon de 15 ml sin dejar nada de líquido o espuma en el pozo tripsinizado.
- Se cerró herméticamente el falcon con Parafilm y se llevó a la centrifugadora.
- Se centrifugó durante 10 min a una velocidad de 1500 RPM a una temperatura de 20° (Figura 21,22).



Figura 21. Programación de centrifugadora (Fuente propia)

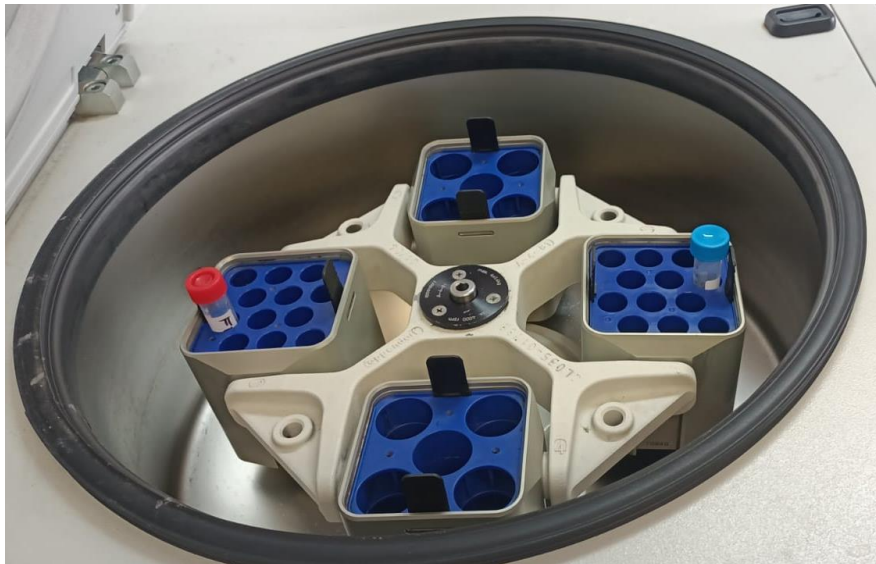


Figura 22. Centrifugadora. Ubicación de falcon en la centrifugadora con su contraparte (Fuente propia).

- Se retiró el falcon de la centrifugadora y se observó el pellet con una capa densa en el fondo lo que nos indicó que las células se trasladaron correctamente ya que se podía identificar la separación del líquido del medio y sólido de las células (Figura 23).
- Por decantamiento se desechó el medio que estaba en el falcon separado de las células, el movimiento era firme y en una sola intención.

- Se preparó el siguiente recipiente en que crecerían las células con DEMEM suplementado, en este caso se agregaron 6 ml de medio a una caja T25.
- Al pallet del facón se le agregó 1 ml de DEMEM y se resuspendió durante 20 veces para después trasladar el medio con las células a la T25.



Figura 23. Pellet de células al fondo del falcon (Fuente propia).

Replicación celular.

El proceso para llegar al número celular necesario para los experimentos, que las células crezcan y proliferen es el siguiente (figura 24-27): las células fueron cultivadas durante 5 meses, en los que se realizaba el mismo procedimiento: Se realizó cambio de medio cada 48 horas con DEMEM suplementado al 10% de SFB y 2% de ATB. Una vez que el pozo con el tejido alcanzó su confluencia máxima se trypsinizó y se pasó a una T25, después de que la T25 alcanzó su máxima confluencia se trypsinizó y se pasó a una T75, una vez que la T75 alcanzó confluencia se llegó a pasar hasta una T90.

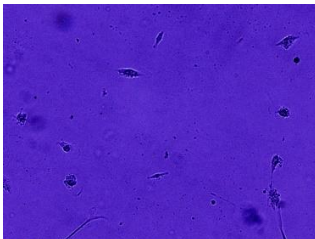


Figura 24. Células que inician su diferenciación. Muestran una forma alargada (Fuente propia).

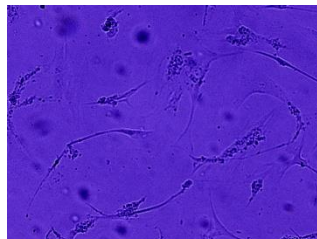


Figura 25. Células ya diferenciadas. Comienzan a llenar los espacios (Fuente propia).

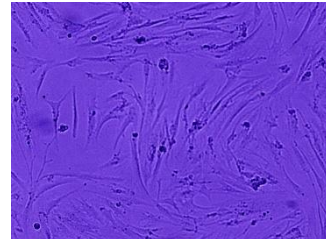


Figura 26. Células ya diferenciadas. Confluencia a un 70%. Ocupan la mayoría de los espacios (Fuente propia).

Cuando se alcanzó el número de células requeridas se procedió a realizar el sembrado de los grupos, debido a que el número de células a sembrar era elevado (250,000 por pozo) se realizó el sembrado de un grupo control por cada grupo experimental para que las células procedieran de la misma caja de cultivo y así tener la seguridad de que las células se encontraban en las mismas condiciones.

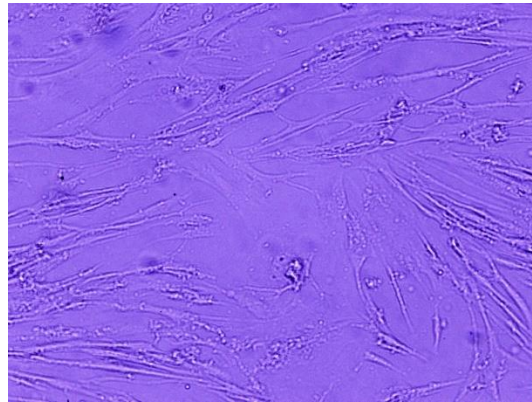


Figura 27. Células ya diferenciadas. Confluencia a un 80%. Ocupan la mayoría de los espacios y siguen patrones de crecimiento formando redes (Fuente propia).

Tripsinización y conteo celular

- Una vez que se verificó al microscopio la confluencia se retiró el medio de cultivo del pozo de la placa de 6 pozos.
- Se agregaron 2ml de PBS, se dejaron 3 segundos mientras se movía lentamente de manera circular para lograr que el PBS tocara todas las superficies.
- Se retiró PBS.
- Se agregaron 2 ml de tripsina.
- Se ingresó a la incubadora durante 5 min.
- Después de 5 min se sacó y se observó al microscopio para identificar si las células se habían desprendido y se encontraban flotantes en el medio, en caso de que se observaran células aun adheridas en el fondo de pozo se procedió a dar pequeños golpes verticales con los dedos justo en la zona donde estaban adheridos. Este procedimiento se repitió hasta comprobar en el microscopio que las células se habían desprendido.
- Este procedimiento se realizó de manera rápida y cronometrada pues la tripsina no puede estar en contacto con las células más de 10 min una vez que es depositada en el pozo.

- Antes de que pasaran esos 10 min y al comprobar que se habían desprendido las células, se neutralizó la tripsina con medio de cultivo, la cantidad debe ser el doble que la tripsina, en ese caso fueron 4 ml.
- Se resuspendió 20 veces el medio con la tripsina y de manera inmediata se pasó todo el contenido a un falcon de 15 ml sin dejar nada de líquido o espuma en el pozo tripsinizado.
- Se cerró herméticamente el falcon con Parafilm y se llevó a la centrifugadora.
- Se centrifugó durante 10 min a una velocidad de 1500 RPM a una temperatura de 20° (Figura 21,22).
- Se retiró el falcon de la centrifugadora y se observó el pellet al fondo que nos indicó que las células se trasladaron correctamente ya que se podía observar la separación del líquido del medio y solido de las células.
- Por decantamiento se desechó el medio que está en el falcon separado de las células, el movimiento fue firme y en una sola intención.
- Al pallet del facón se le agregó 1 ml de DEMEM y se resuspendió durante 20 veces.
- En un tubo eppendorf se preparó una tinción para hacer el conteo celular: se colocaron 45 μ l de PBS y 45 μ l de azul de tripano y se resuspendió 20 veces.
- Se tomaron 10 μ l de células del falcon previamente resuspendido y se agregaron al eppendorf con la tinción, se resuspende nuevamente 20 veces y se lleva a conteo celular en la cámara de Neubauer.
- Se resuspende 20 veces y se tomaron 10 μ l de las células con la tinción, se llevaron de manera precisa a los dos compartimentos de la cámara (superior e inferior) (Figura 28).

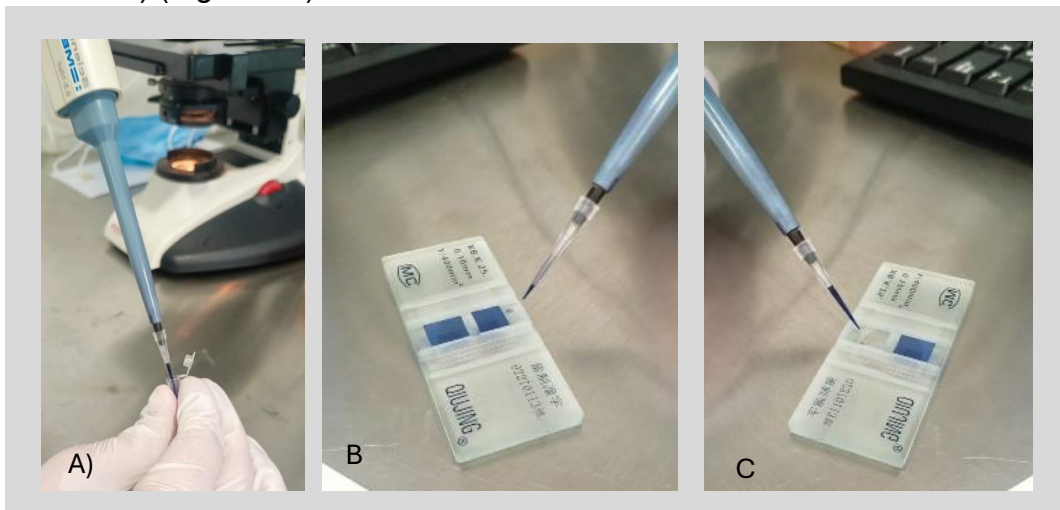


Figura 28. Conteo celular. A) Resuspención de células en eppendorf para ser contadas. B) y C) Colocación de células en compartimentos de cámara de Neubauer (Fuente propia)

Con precisión y sin mover el líquido se llevó la cámara al microscopio para hacer el conteo (Figura 29) (37).



Figura 29. Microscopio para conteo celular (Fuente propia)

- Una vez en la cámara, se contaron las células que se encontraban con una forma redonda homogénea y brillantes (38).
- Se procedió a hacer el conteo por cuadrantes en sentido de las manecillas del reloj.

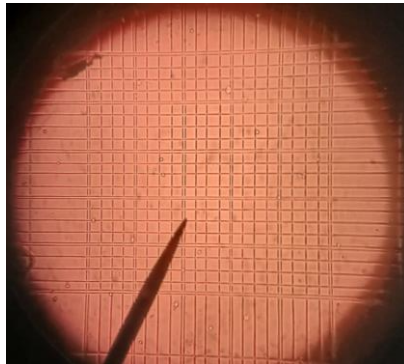


Figura 30. Conteo celular. Ejemplo de cómo se ven las células en el microscopio durante el conteo celular (Fuente propia).

Se registró el número de células del compartimento superior e inferior, se hizo un promedio de los dos números y se calcularon las células de acuerdo con la fórmula:

de células $\div 0.5 \times 10$ lo que dio como resultado el número de fibroblastos por microlitro. Para hacer el cálculo total solo se realizó una regla de 3(38,39).

Curva de crecimiento celular:

Para poder tener un conocimiento claro del comportamiento de las células en los espacios en que fueron colocadas se realizó una curva de crecimiento celular específicamente en los pocillos de la placa de 96 pozos, ya que las células tienden a llenar todos los espacios y si en algún momento ya no hay espacio suficiente tienden a morir (37).

- Una vez alcanzada la confluencia necesaria se tripsinizaron las células y se sembraron en diferentes concentraciones.
- Se sembraron a concentraciones de 2,000, 4,000, 6,000 y 8,000 células por pocillo y se hicieron grupos dependiendo de los intervalos de tiempo a los que fueron medidas con intervalos de 24, 48, 72 y 96 horas.
- Por lo tanto, se sembraron 4 grupos con 4 filas de 3 pocillos cada una ya que se realizó por triplicado.
- Se aplicó prueba MTT.

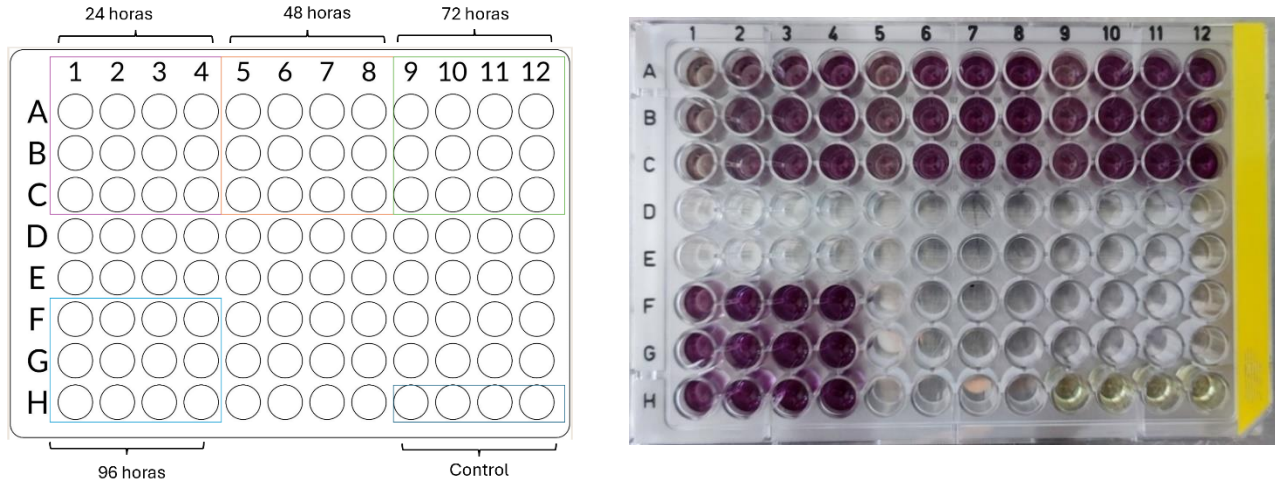


Figura 31. Placa de cultivo de 96 pozos. Distribución de grupos para prueba MTT para determinar curva de crecimiento celular (Fuente propia)

Sembrado para experimentos

- Una vez claras las cantidades a las que serían sembradas las células al momento de hacer MTT se procedió con el experimento y realizó el sembrado de las células de los grupos experimentales en placas de 6 pozos de la siguiente manera, como se muestra en la figura 32:
- 250,000 células para el Grupo Vibraciones (EV) + 250,000 células para el control (CV).
- 250,000 células para el Grupo Compresión (EC) + 250,000 células para el control (CC).
- 250,000 células para el Grupo Compresión y Vibración (ECV) + 250,000 células para el control (CCV).
- Los grupos se hicieron por duplicado

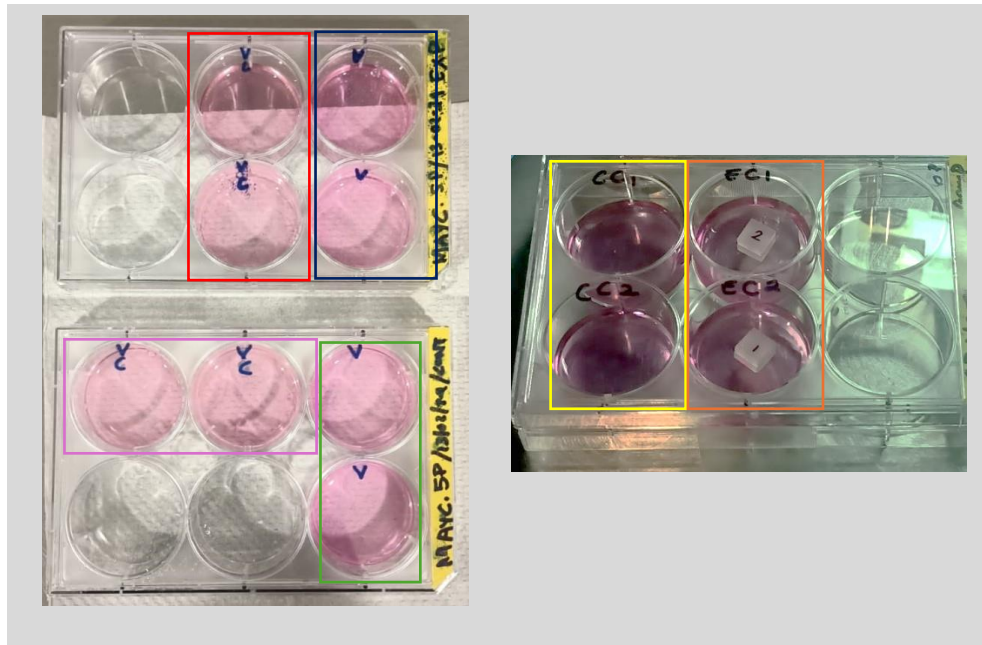


Figura 32. Placa de cultivo de 6 pozos. Distribución de grupos para aplicación de estímulos. Rojo: Experimental Compresión- Vibración, Azul: Experimental vibración, Lila: control Compresión-Vibración, Verde: Control vibración, Amarillo: Control compresión, Naranja: Experimental compresión (Fuente propia).

Aplicación de estímulos

- 24 horas después sembrar las células a la concentración planeada se procedió a aplicar los estímulos (Figura 33).
- Compresión: se colocaron los discos sobre el medio de cultivo y se dejaron sobre este durante el mismo tiempo que se aplicaron las vibraciones, posteriormente se retiraron.
- Vibración: Con el vibrador cargado al 100% y la posición dada como en la prueba piloto. Se colocaron los pozos sobre el vibrador y se dejó activo durante 5 minutos, al término del tiempo se apagó el dispositivo.
- Vibración y compresión. Con el dispositivo de vibración cargado al 100% y la base como en la prueba piloto dentro de la campana laminar se aplicó vibraciones a los pozos que contenían un disco de compresión en su interior. Se verificó que el disco no girara con la vibración y se dejó durante 5 min.



Figura 33: Posición de dispositivo de vibración con base metálica (Fuente propia)

- Después de la aplicación de estímulos las células se regresaron a la incubadora durante 24 horas.
- Se tripsinizaron las células y se realizó conteo celular por triplicado.
- Se sembraron en placas de 96 pozos a una concentración del 1% del total celular en 200 μ l con la distribución que se presenta en la figura 34 y 35.

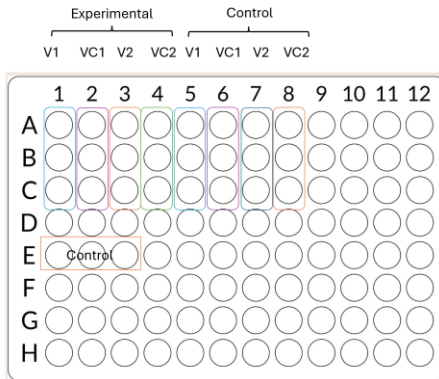


Figura 34: Distribución del sembrado celular para aplicar MTT. Grupo Vibraciones y Compresión-Vibraciones

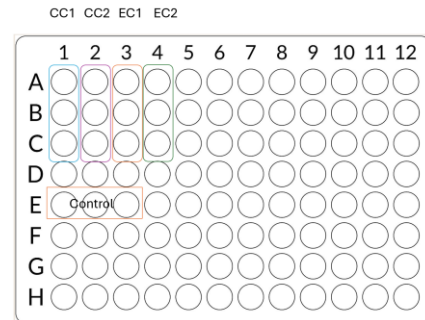


Figura 35: Distribución del sembrado celular para aplicar MTT. Grupo Compresión

- Después de sembradas las células se llevaron a la incubadora nuevamente.
- 24 horas después se retiró el medio y se agregó únicamente 100 μ l de DEMEM más 10 μ l de MTT (25). Este procedimiento debía realizarse en un espacio donde la luz sea mínima ya que el MTT hará una reacción de color y se podría alterar con la luz, esto se debe hacer desde que se manipulan por si solos los reactivos hasta cuando son agregados y medidos (Figura 36).

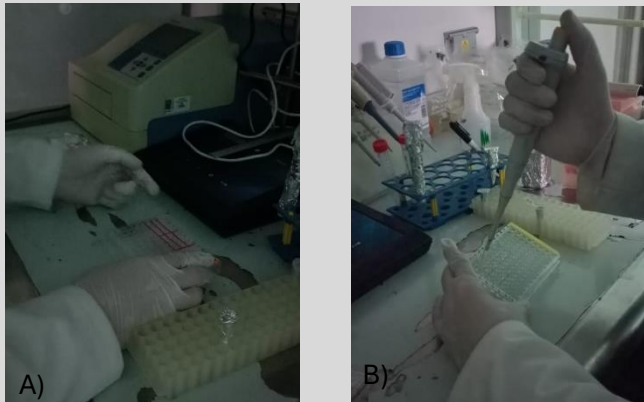


Figura 36. Ensayo MTT. A) Aplicación de MTT con mínima cantidad de luz B) Aplicación de buffer 4 horas después (Fuente propia).

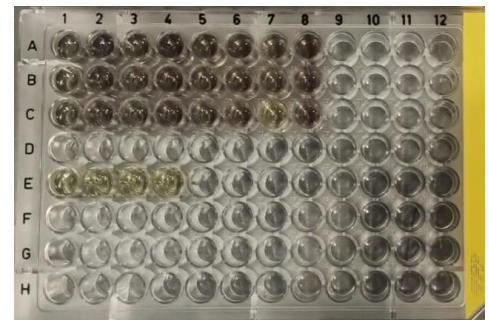


Figura 37. Pocillos con tinción después de prueba MTT (Fuente propia)

- Una vez agregado el MTT se cubrió la caja de cultivo con papel aluminio por completo para evitar que le llegue luz al interior.
- Se llevó a la incubadora.
- Se dejó durante 4 horas y posteriormente se saca nuevamente.
- Pasadas las 4 horas se agregan 10 μ l de buffer a todos los pozos.
- 24 horas después se realizó la lectura con el espectrofotómetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Waltham,

Massachusetts, Estados Unidos) (la lectura se realizó por triplicado) (Figura 37,38).



Figura 38. Espectrofotómetro Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer (Waltham, Massachusetts, Estados (Unidos)(Fuente propia).

8.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el presente estudio utilizamos estadística descriptiva debido a que era un número pequeño de muestras. La cual proporcionó una forma clara y concisa de comunicar los resultados del análisis. Los resúmenes numéricos y gráficos ayudan a que se entiendan rápidamente las características de los datos.

9.-RESULTADOS

Dispositivo de Vibración

La calibración del dispositivo A10™ nos arrojó mediciones de Vibraciones en Hz cada que existía un cambio en dicha frecuencia. Lo que ofrece un parámetro real de cómo se comportan las vibraciones emitidas por este dispositivo cuando se encuentra en óptimas condiciones y dio un panorama de cómo se comportó durante el experimento además de lo que se espera emita al usarse *In vivo* (Tabla 1).

Tabla 1. Resultado de la calibración de dispositivo (Frecuencia Hz)

Tiempo/Minutos	Hz	Tiempo/Minutos	Hz	Tiempo/Minutos	Hz	Tiempo/Minutos	Hz
0:5	163	03:10	167	05:42	170	07:55	168
03:09	164	03:38	168	05:58	171	08:10	169
01:15	165	04:14	165	06:00	175	08:18	168
01:20	166	04:19	167	06:22	175	08:26	169
01:30	167	04:35	168	06:42	167	08:42	169
02:14	166	04:38	167	06:53	168	08:46	170
02:23	167	04:40	168	07:00	169	09:00	171
02:30	166	04:47	167	07:10	166	09:14	6
02:42	167	05:00	167	07:15	168	09:30	5
03:03	168	05:30	170	07:40	169	10:00	8

Muestra la frecuencia en Hz (hertz) del dispositivo A10™ en el punto 1 Durante 10 min.

Estas mediciones nos indicaron que el dispositivo tarda 30s en alcanzar los 160 Hz. A los 6 min alcanza los 175 Hz, las mismas oscilaciones que reporta el fabricante pero que no especifica si son estables o constantes, con esta información sabemos que son fluctuantes en ese rango, la oscilación máxima que manejó fue de 175 Hz y al llegar a los 9min las oscilaciones decrecen bruscamente. Lo que demuestra que el dispositivo brinda las vibraciones necesarias terapéuticas para los 5 min indicados por el fabricante, sin embargo, no se mantiene durante 10 min consecutivos.

Cálculo y disco de compresión.

Se diseñaron e imprimieron un total de 12 dispositivos de compresión de los cuales se seleccionaron 6 que dieran una fuerza de compresión de 2 g/cm² verificados en la balanza analítica. Los discos que cumplieron con el peso adecuado y fueron utilizados para la fase experimental fueron los números: 1,2,9,10,11 y 12.

Prueba piloto de dispositivo de vibración A10™.

Después del mapeo de vibraciones de los 6 puntos del pocillo se obtuvo como resultado que las vibraciones eran constantes y similares entre todos los puntos durante 5 min (figura 39). Lo que nos indicó que si colocábamos todos los elementos en la misma posición y bajos los mismos estándares el dispositivo de vibración emitió los mismos parámetros de vibración en la fase experimental.

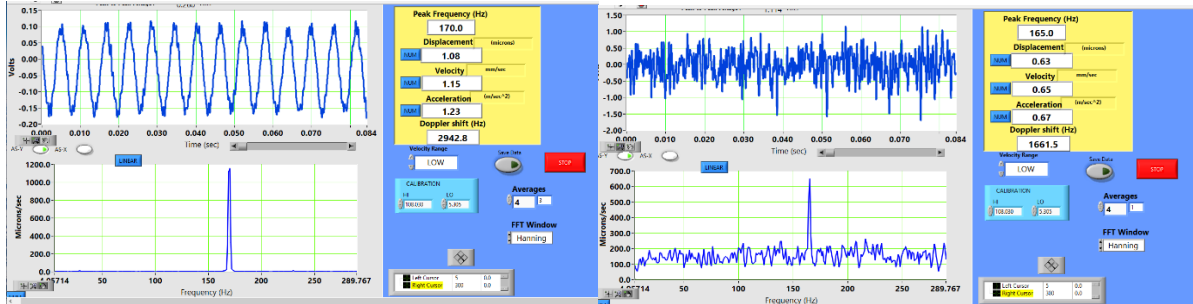


Figura 39. Ejemplo de comportamiento de las ondas de frecuencia y Hz emitidos durante la prueba piloto (Fuente propia).

Cultivo celular

Como producto del cultivo primario realizado obtuvimos fibroblastos humanos periodontales, sin embargo, en ausencia de pruebas específicas para caracterizar los fibroblastos obtenidos en nuestro cultivo primario solo podemos fundamentar nuestra afirmación de que las células cultivadas son fibroblastos a través de la revisión de protocolos estándar de obtención de fibroblastos de cultivo primario (39). Y podríamos tomar ciertos puntos del experimento como:

- La zona específica de donde se obtuvieron los explantes de tejido. Los cuales se tomaron de la parte unida a la raíz de los Órganos dentarios.
- Morfología Distintiva: La morfología de los fibroblastos en cultivo primario se caracteriza por su forma alargada y delgada, con múltiples extensiones citoplasmáticas. Esta morfología única es una adaptación a su función en el tejido conectivo, permitiéndoles sintetizar y remodelar la matriz extracelular (39,40)
- Velocidad de Crecimiento: Los fibroblastos son conocidos por su rápida tasa de proliferación en cultivo primario. Varios estudios han demostrado que los fibroblastos tienen una capacidad proliferativa significativa, lo que les permite colonizar y dominar rápidamente el ambiente de cultivo celular (41).

Curva de Crecimiento celular

Después de haber medido la viabilidad de las células se obtuvieron los siguientes resultados por intervalos de tiempo y diferentes concentraciones lo que nos muestra que la mejor concentración en la que las células proliferan sin morir de manera homogénea es a una concentración de 8,000 células por pocillo, esta información fue únicamente útil para el proceso de sembrado al momento de hacer la prueba MTT pero no nos brindó mayor información para los objetivos de este proyecto de investigación.

Tabla 2 Lectura de prueba MTT de curva de crecimiento 24 horas.

LECTURA /24H	2,000	4,000	6,000	8,000
1	198	361	456	605
2	221	383	503	595
3	213	391	504	605
PROMEDIO	210.67	378.33	487.67	601.67

Cantidad de Absorbancia 24 horas después de sembradas las células (Fuente propia).

Tabla 3 Lectura de prueba MTT de curva de crecimiento 48 horas

LECTURA 48H	2,000	4,000	6,000	8,000
1	280	528	618	615
2	298	488	622	602
3	297	521	609	662
PROMEDIO	291.67	512.33	616.33	626.33

Cantidad de absorbancia 48 horas después de sembradas las células (Fuente propia).

Tabla 4 Lectura de prueba MTT de curva de crecimiento 72 horas

LECTURA 72H	2,000	4,000	6,000	8,000
1	291	574	598	665
2	369	562	633	684
3	352	541	617	883
PROMEDIO	337.33	559.00	616.00	744.00

Cantidad de absorbancia 72 horas después de sembradas las células (Fuente propia).

Tabla 5. Lectura de prueba MTT de curva de crecimiento 96 horas

LECTURA 96H	2,000	4,000	6,000	8,000
1	438	600	772	852
2	555	668	762	823
3	530	663	798	835
PROMEDIO	507.67	643.67	777.33	836.67

Absorbancia 96 horas después de sembradas las células (Fuente propia).

Conteo celular

Los fibroblastos periodontales humanos fueron contabilizados en dos ocasiones, al momento de ser sembrados con una concentración de 250,000 células por pozo y al momento de ser sembradas para la realización de la prueba MTT. Dichos conteos arrojaron los siguientes resultados después de la aplicación de estímulos:

Tabla 6 Resultado de conteo celular después de estímulos

Grupo	EV1	EV2	CV1	CV2	EC1	EC2	CC1	CC2	ECV1	ECV2	CCV1	CCV2
No. Cel	320,000	340,000	280,000	280,000	180,000	240,000	220,000	250,000	320,000	390,000	340,000	300,000
No. Cel	300,000	320,000	300,000	250,000	200,000	250,000	250,000	270,000	260,000	340,000	270,000	260,000
No. Cel	310,000	300,000	260,000	260,000	190,000	300,000	270,000	290,000	300,000	360,000	300,000	260,000
Promedio	310000	320000	280000	263333.3	190000	263333.3	246666.7	270000	293333.3	363333.3	303333.3	273333.3

Muestra la cantidad de células por pozo de cada grupo después de la aplicación de estímulos a los grupos experimentales. EV: Experimental vibraciones, CV: control vibraciones, EC: Experimental compresión, CC: Control compresión, ECV: experimental Control compresión, CCV: Control compresión vibración (Fuente propia).

Los fibroblastos de todos los grupos presentaron proliferación celular después de la aplicación de estímulos a excepción del grupo Experimental Compresión 1 el cual mostró una disminución respecto a su control inicial.

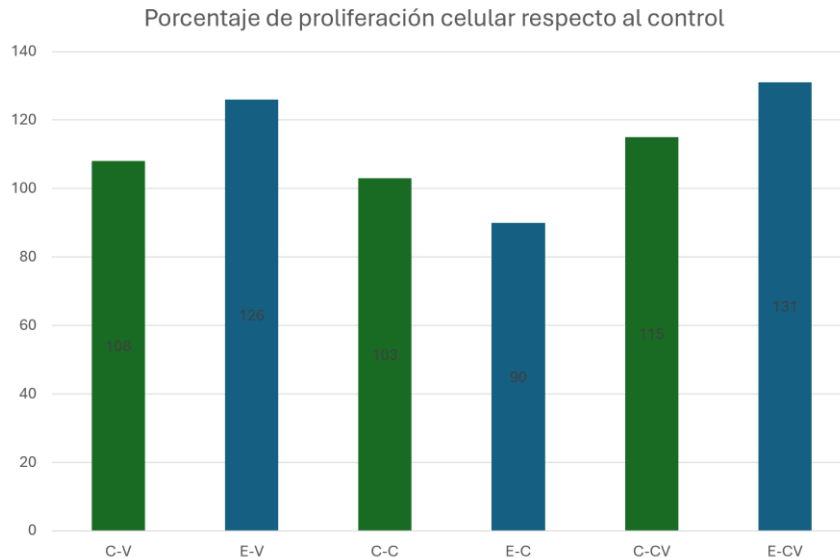


Figura 40. Porcentaje de proliferación celular respecto al control. Barras de conteo celular después de la aplicación de estímulos respecto al antes expresadas en porcentaje. Eje X. Grupos celulares, Eje Y. Porcentaje de proliferación (Fuente propia).

El grupo Control-Vibración aumentó un 8% respecto al conteo inicial, el grupo Experimental-Vibración aumentó un 26%, lo que nos habla de una proliferación del 18% más el experimental respecto a su control.

El grupo Control-Compresión tuvo un aumento de tan solo el 3%, el grupo Experimental-Compresión disminuyó un 10% a diferencia del grupo Control-Compresión, esto habla de que las células del grupo control, aunque mínima, si presentaron proliferación sin embargo disminuyeron al momento de que se les colocaron los discos de compresión. El grupo Control-Compresión Vibración aumentó un 15% y el grupo Experimental-Compresión Vibración aumentó un 31%, lo que demuestra una proliferación del 16% más el grupo experimental que su control. Esto nos indicó que la proliferación en los grupos experimentales Vibración y Vibración Compresión fue mayor respecto al inicio y respecto a sus controles.

MTT

La absorbancia registrada a una longitud de onda específica se correlaciona directamente con la cantidad de células vivas presentes en el cultivo. Los datos de absorbancia se muestran en el siguiente gráfico.

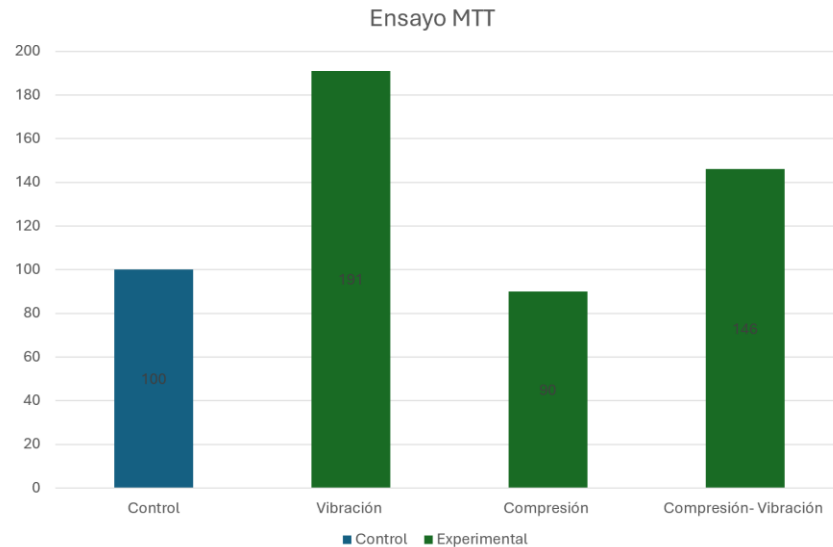


Figura 39. Porcentaje de proliferación. Ensayo MTT. Gráfico de barras de absorbancia tomadas del espectrofotómetro después de ensayo MTT. Porcentaje respecto a su control. Eje X. Grupos celulares promediados. Eje Y. Porcentajes de proliferación y viabilidad celular (Fuente propia).

Los experimentos se realizaron con un grupo control por cada grupo experimental, por lo tanto, se tomó cada grupo experimental como el 100% correspondiente al mismo, Obteniendo que el grupo celular al que se estimularon con vibraciones aumentaron un 91%, el grupo de sólo compresión mecánica disminuyó su viabilidad un 10% y el grupo experimental compresión-vibración aumentó un 46%. El grupo que fue estimulado exclusivamente con vibraciones fue el que mayor viabilidad celular demostró, seguido del grupo Compresión Vibración, únicamente el grupo de compresión no mostró proliferación celular y tomando en cuenta que la absorbancia indica viabilidad también podemos inferir que el 10% del total celular de ese grupo murió.

10.-DISCUSIÓN

Las vibraciones mecánicas se introdujeron a la ortodoncia con el fin de acelerar el movimiento dental por lo que a lo largo del tiempo han surgido diferentes investigaciones para probar su desempeño, sin embargo, los dispositivos de vibración fueron lanzados al mercado con resultados contradictorios sobre si funcionan o no para acelerar el movimiento dental. En la actualidad existe una tendencia de regresar a la investigación celular para evaluar y valorar su acción en el proceso de remodelado óseo y como actúa sobre las células encargadas del mismo (26).

En el presente estudio se evaluó la proliferación de fibroblastos del ligamento periodontal obtenidos de un explante de un paciente sano libre de caries y enfermedad periodontal a través de un cultivo primario siguiendo procedimientos ya establecidos (42,36,43). Estas células se sometieron a diferentes estímulos; vibración, compresión y un conjunto de las dos simulando ortodoncia y el método de aceleración de movimiento dental mediante vibraciones (26).

Dispositivo de vibración

Para la aplicación de las vibraciones se utilizó el dispositivo A10™ el cual no cuenta con estudios publicados sobre sus características mecánicas o sobre su influencia en el movimiento dental ya sea *In vitro* o *In vivo*, por lo que esta es la primera investigación que lo utiliza. Después de las pruebas de caracterización se demostró que dicho dispositivo es capaz de mantener vibraciones de alta frecuencia durante 5 min, aunque estas vibraciones no son constantes se mantienen en el rango que el fabricante reporta (150-175 Hz), El dispositivo VPro5 (Propel Orthodontics, Ossining, Nueva York) actualmente se encuentra fuera del mercado, sin embargo, este era muy similar al dispositivo A10 pues era capaz de emitir vibraciones de alta frecuencia (120 Hz). Judex et al.2018, evaluaron las vibraciones emitidas por el dispositivo a través de un acelerómetro, el cual fue colocado durante los experimentos lo que nos habla de que probablemente estos dispositivos mantengan las vibraciones que se necesitan para el tratamiento. En el dispositivo A10™ pudimos identificar que las vibraciones decrecen a los 9 min de que el dispositivo este encendido, todo esto con la carga al 100% en un dispositivo nuevo, por lo que se estableció un protocolo para la aplicación de las vibraciones y se aplicó el estímulo durante 5 min que es una de las indicaciones terapéuticas del fabricante. Por todo lo anterior se recomienda solo se utilice de manera consecutiva 5 min y en caso de desear una terapéutica de mayor tiempo se use en varios intervalos de 5 min para asegurarse que si está emitiendo la cantidad de vibraciones necesarias (7).

Dispositivo de compresión

El dispositivo de compresión fue un disco de acrílico diseñado y calculado para ejercer 2 g de fuerza sobre las células cultivadas en un pozo con un diámetro de 34mm. Estudios anteriores reportaron que las células reaccionaban al estímulo de compresión expresando biomarcadores cuando se les aplicaban 2 g de compresión (38,30,11). Kanzaki et al.2022, utilizó la fuerza compresiva con un dispositivo que ejerciera la misma fuerza en todas las partes del pozo a cultivo a nivel celular, diseñó un cilindro de vidrio el cual estaba lleno con partículas de plomo que le permitieron adecuar el peso

dependiendo del grupo experimental (33,44). Benjakul et al. En 2020 y en 2018 utilizaron el mismo principio y en el estudio más reciente utilizan acrílico para el dispositivo de compresión igual al diseñado para este trabajo. Podemos inferir que el diseño del dispositivo de compresión aquí empleado es adecuado y que por sus adaptaciones es más fácil de manejar lo que facilita su manipulación y por consecuencia reduce el riesgo de sesgo (45).

Viabilidad y proliferación celular

Los fibroblastos son células que participan activamente y regulan a las otras células participantes en el proceso celular, sin embargo, no son activamente tomadas en cuenta al momento de realizar investigación respecto a movimiento dental. Judex et al. Realizaron un estudio similar donde también utilizaron a los fibroblastos como célula de interés para el movimiento ortodóncico y en diferentes pruebas realizadas a fibroblastos, osteoblastos y osteoclastos se mostró relación entre los resultados de los tres grupos celulares sin embargo ellos utilizaron dos dispositivos para generar los estímulos con el fin de compararlos y no utilizaron la carga compresiva que simula el movimiento ortodóncico (7).

Con los resultados del ensayo MTT y el conteo celular que se realizó en el presente estudio se observó que el grupo que presentó mayor proliferación celular fue el grupo al que se le aplicaron únicamente vibraciones, se observó mayor proliferación celular respecto a su control. Judex et al. Reportaron de igual manera aumento en la proliferación celular al momento de estimular fibroblastos con vibraciones, este estudio reportó que se logró mayor proliferación celular con el dispositivo VPro 5 en comparación al dispositivo Acceledent, tomando esto como contexto podemos rescatar que el dispositivo Vpro5 es un dispositivo de alta frecuencia al igual que el dispositivo A10 y que sus indicaciones terapéuticas son muy similares (7). Esto podría estar relacionado a las vibraciones de alta frecuencia sin embargo hace falta más investigación con esas frecuencias pues en la actualidad la mayoría de los estudios utilizan vibraciones de baja frecuencia.

El segundo grupo que mostró un aumento en la proliferación celular fue el grupo de Compresión Vibración, Estudios anteriores reportaron que la aplicación de estos dos estímulos no disminuía la proliferación celular (26), sin embargo, en este estudio además de no perder, aumentó el número de células viables, aunque estas no superan al grupo de únicamente vibración. Como ya se había visto en muchas investigaciones las vibraciones por si solas lograban cambios significativos sin embargo la aplicación de compresión da un panorama más certero. El hecho de que el grupo compresión vibración no haya disminuido su viabilidad, pero el grupo solo compresión si, pudiera ser ocasionado porque las vibraciones aumentan la proliferación celular en mayor cantidad a las que la compresión la disminuye por eso el grupo que únicamente recibió compresión no presentó proliferación celular y además mostró disminución en la viabilidad de estas células (33). Benjakul et al. realizó un estudio en 2018 muy similar al aquí planteado, pero en vibraciones de baja frecuencia, en su diseño metodológico realizaron grupos de vibración, compresión y compresión vibración a los cuales se les realizó ensayo MTT para la evaluación de proliferación celular, en este estudio el grupo de únicamente compresión también disminuyó su viabilidad comparada con su control con un 82 %,

mientras que en la presente tesis disminuyó a un 90%. Si comparamos las otras mediciones, en el estudio de Benjakul et al. (2018) El grupo de vibraciones presentó la misma proliferación que el control y el grupo compresión vibración la misma proliferación que el de compresión lo que nos indica que en los experimentos realizados con el dispositivo A10 tuvieron en general un porcentaje mayor de proliferación siendo la diferencia experimental la frecuencia de vibración (26). Sin embargo, ninguno de los grupos presentó cambios morfológicos en las células observadas al microscopio, ni siquiera el grupo de compresión que, aunque disminuyó su viabilidad no murieron no cambiaron las células existentes. En el caso del grupo compresión estudios anteriores reportaron que la compresión por si sola se puede ver afectada al momento de manipular el disco de compresión (46,47), especulando que quizá se pudieron adherir células al disco y con ello disminuir su número, sin embargo, el grupo al que se le aplicó compresión vibración y compresión no presentó disminución en la viabilidad celular.

Llevar a la práctica clínica los resultados presentados con anterioridad es un poco más complejo de lo que aparenta, pues, aunque los resultados son claros con cada uno de los grupos, trasladarlos al contexto del movimiento dental implica contemplar todos los factores que influyen para que este se dé, ya que mientras se da este movimiento diferentes líneas celulares sufren cambios y envían diferentes señales que pueden influir en el proceso (27).

El presente estudio es una aportación a la evaluación de un factor del movimiento dental, los fibroblastos, sin embargo, se requiere realizar más investigaciones con muestras de mayor tamaño, con más repeticiones y empleando diversos métodos de vibración para validar estos descubrimientos y establecer el patrón óptimo de vibración y compresión.

11.-CONCLUSIONES

Se logró caracterizar el dispositivo A10™ del cual no se tenía investigación previa y ahora se conoce su funcionamiento.

Las oscilaciones del dispositivo A10™ son las mismas que reporta el fabricante durante los primeros 5 min lo que podría hacer de su uso algo seguro si se usa en las mismas condiciones.

Se logró calcular y diseñar un dispositivo de compresión para simular la presión ejercida por el tratamiento de ortodoncia a nivel celular lo que puede servir para distintas investigaciones *In Vitro* ya que es replicable y reproducible.

Se obtuvo un cultivo celular primario a partir de un explante en paciente vivo a nivel institucional lo que permite a la facultad cultivar células para fines de investigación.

Las pruebas de MTT sugieren que las vibraciones generan aumento en la viabilidad y proliferación celular, lo que podría tener relación en el recambio óseo, sin embargo, se sugiere ahondar más en el tema antes de sacar afirmaciones concluyentes.

Se recomienda que para futuras investigaciones se realicen pruebas complementarias para caracterización de células cultivadas, se utilicen muestras de mayor tamaño, con más repeticiones y de manera longitudinal, también se recomienda la evaluación de biomarcadores que complementen la información y así poder dilucidar de manera más clara la influencia de las vibraciones sobre los fibroblastos.

12.- BIBLIOGRAFÍA

1. Zou J, Meng M, Law CS, Rao Y, Zhou X. Common dental diseases in children and malocclusion. *Int J Oral Sci.* 2018;10(1):1-7.
2. Graber V, Vanarsdall V. *Ortodoncia. Principios y técnicas actuales.* 4ª ed. Madrid, Barcelona: Elsevier; 2006.
3. Shah A. Use of Vibration in Orthodontics: A Review. *Int J Adv Res Dev.* 2017; 2:26-30.
4. Lala A. Vibration therapy in orthodontics? Realising the benefits. *Ortho.* 2016; 1:24-7.
5. Bilello G, Fazio M, Currò G, Scardina GA, Pizzo G. The Effects of Low-frequency Vibration on Aligner Treatment Duration: A Clinical Trial. *J Int Soc Prev Community Dent.* 2022;12(3):345-352. doi: 10.4103/jispcd.JISPCD_311_21.
6. Nakamura S, Ito T, Okamoto K, Mima T, Uchida K, et al. Acceleration of bone regeneration of horizontal bone defect in rats using collagen-binding basic fibroblast growth factor combined with collagen scaffolds. *J Periodontol.* 2019;90(9):1043-52.
7. 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.
8. Shipley T, Farouk K. Effect of high-frequency vibration on orthodontic tooth movement and bone density. *J Orthod Sci.* 2019;8(15):1-9.
9. Leethanakul C, Suamphan S, Jitpukdeebodindra S, Thongudomporn U, Charoemratrote C. Vibratory stimulation increases interleukin-1 beta secretion during orthodontic tooth movement. *Angle Orthod.* 2016;86(1):74-80.
10. Shapiro E, Roeber FW, Klempner LS. Orthodontic movement using pulsating force-induced piezoelectricity. *Am J Orthod.* 1979;76(1):59-66.
11. Alansari S, Atique MI, Gomez JP, Hamidaddin M, Thirumoorthy SN, Sangsuwon C, et al. The effects of brief daily vibration on clear aligner orthodontic treatment. *J World Fed Orthod.* 2018;7(4):134-40.
12. Wolf M, Lossdörfer S, Abuduwali N, Meyer R, Kebir S, et al. In vivo differentiation of human periodontal ligament cells leads to formation of dental hard tissue. *J Orofac Orthop.* 2013;74(6):494-505.
13. Andrade I, Sousa A, Silva G. New therapeutic modalities to modulate orthodontic tooth movement. *Dent Press J Orthod.* 2014;19(6):123-33.
14. Ducy P, Zhang R, Geoffroy V, Ridall AL, Karsenty G. *Osf2/cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation. *Cell.* 1997;89(5):747-754.
15. Barrère F, Blitterswijk C. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(3):317-32.
16. Fernández T, Hernández G, Alobera G, Del Canto M, Blanco L. Physiological bases of bone regeneration I. Histology and physiology of bone tissue. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2006;11(1):32-6.
17. Domínguez A, Velásquez S. Acceleration of Dental Movement by Photobiomodulation: How Does It Happen? *Photobiomodul Photomed Laser Surg.* 2021;39(6):379-80.

18. Segeritz CP, Vallier L. Cell Culture: Growing Cells as Model Systems In Vitro. *Basic Science Methods for Clinical Researchers*. 2017;151-72.
19. Mishra SK, Chowdhary R, Kumari S. Microleakage at the different implant abutment interface: A systematic review. *J Clin Diagn Res*. 2017;11(6):ZE10-5.
20. Coecke S, Balls M, Bowe G, Davis J, Gstraunthaler G, Hay R, et al. Guidance on Good Cell Culture Practice: A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice. 2005;261-87.
21. Oyeleye O, Ogundeji ST, Ola SI, Omitogun OG. Basics of animal cell culture: Foundation for modern science. *Acad Journals*. 2016;11(May):6-16.
22. Vunjak-Novakovic G, Freshney RI. Basic Principles of Cell Culture. In: *Culture of Cells for Tissue Engineering*. 2006. p. 3-21.
23. Berridge M, Tan A. Characterization of the Cellular Reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): Subcellular Localization, Substrate Dependence, and Involvement of Mitochondrial Electron Transport in MTT Reduction. *Arch Biochem Biophys*. 1993;303(2):474-82.
24. Merck. IR Spectrum Table & Chart. Merck. 2021;1(1).
25. 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.
26. Phusuntornsakul P, Jitpukdeebodintra S, Pavasant P, Leethanakul C. Vibration enhances PGE2, IL-6, and IL-8 expression in compressed hPDL cells via cyclooxygenase pathway. *J Periodontol*. 2018;89(9):1131-41.
27. Kun-Hong Bai, Cheng Hu, Qing-Qing Li FW. Effect of low-magnitude high frequency vibration on osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Shanghai J Stomatol*. 2019;8(5):478-83.
28. Hernández B, Inostroza V, Carrión P, Chaparro P, Quintero H, et al. Proliferation of mesenchymal stem cells from human gingival tissue on chitosan scaffold: an in vitro study. *Rev Clin Periodoncia Implant Rehabil Oral*. 2011;4(2):59-63.
29. Rivero O, Paredes R, Durante I, Rivero A. *Ética en el Ejercicio de la Medicina*. 1a ed. México; 2006.
30. ACELERADOR PARA ORTODONCIA A10 [Internet]. td.admintotal.com. Recuperado de: <https://td.admintotal.com/ecommerce/producto/3310/>
31. OMS Corporation- LaserPoint Laser Doppler Vibrometer -[Internet]. www.omscorporation.com.
32. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res*. 2002;17(2):210-20. doi:10.1359/jbmr.2002.17.2.210.
33. Alexandroff PS. *Combinatorial Topology*. Nueva York: Dover; 1998. p. 99.
34. Zhang C, Zhang L, Zhou Y, Hou W, Quan H, Li X, Chen Y, 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.

35. Raoul B, Rouamba A, Diarra A, Beugré-Kouassi ML, Jordana F, Beugré JB. Culture of Human Gingival Fibroblasts: An Experimental Model. *Cell Biol.* 2020;8(1):8-11. doi:10.11648/j.cb.20200801.12.
36. Bello A, Márquez H, Noris-Suárez K. El grado de glicosilación del colágeno óseo regula la adhesión y la capacidad de biomineralizar de las células óseas. *IFMBE Proc.* 2008;663-6.
37. Celis JE, editor. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*. 3rd ed. San Diego: Academic Press; 2006.
38. Clément K, Mathew A, Mathew J. A comparison of manual and automated cell counting methods for monitoring cell viability and growth in culture. *Cytotechnology.* 2017;69(1):125-34.
39. Ten Cate AR. *Oral histology: development, structure and function*. 5ª ed. Editorial Mosby Inc.; 1998.
40. Ten Cate AR. *Oral histology: development, structure and function*. 5a ed. Editorial Mosby Inc.; 1998.
41. Geneser F. *Histología*. 2a ed. Editorial Médica Panamericana; 1993. p. 153.
42. *Good Cell Culture Practice. A Report of the Second ECVAM Task Force on Good Cell Culture Practice.* 2005;261-87.
43. Baust JM, Buehring GC, Campbell L, Elmore E, Harbell JW, Nims RW, et al. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2017 Aug 14;53(8):669-72.
44. Diar-Bakirly S, El-Bialy T. Human gingival fibroblasts: Isolation, characterization, and evaluation of CD146 expression. *Saudi J Biol Sci.* 2021;28(4):2518-26.
45. Kanzaki H, Chiba M, Shimizu Y, Mitani H. Periodontal ligament cells under mechanical stress induce osteoclastogenesis by receptor activator of nuclear factor kappaB ligand up-regulation via prostaglandin E2 synthesis. *J Bone Miner Res.* 2002 Feb;17(2):210-20. doi: 10.1359/jbmr.2002.17.2.210.
46. Benjakul S, Unat B, Thammanichanon P, Leethanakul C. Vibration synergistically enhances IL-1? and TNF-? in compressed human periodontal ligament cells in the frequency-dependent manner. *J Oral Biol Craniofac Res.* 2020 Oct-Dec;10(4):412-416. doi: 10.1016/j.jobcr.2020.06.005.
47. Nettelhoff L, Grimm S, Jacobs C, Walter C, Pabst A, Goldschmitt J, Wehrbein H. Influencia de la compresión mecánica sobre los fibroblastos y osteoblastos del ligamento periodontal humano. *Investig Clin Oral.* 2016; 20:621-629.
48. Kang YG, Nam JH, Kim KH, Han KS. La vía FAK regula la producción de PGE? en células del ligamento periodontal comprimidas. *Rev Invest Dental.* 2010; 89:1444-1449.

49. ANEXOS

Anexo 1



Nombre del Paciente: _____ Edad: _____
 Teléfono: _____
 Domicilio: _____ Estado: _____
 Municipio: _____

Por el presente autorizo al Residente de maestría en estomatología C.D. Mayra Daniela Carrera González para que lleve a cabo la toma de la muestra de tejido gingival, el cual se encuentra asentado en la Historia Clínica. Estoy consciente que, si surgiera cualquier circunstancia imprevisible durante el proceso en la que se requiera, a su juicio, procedimientos adicionales o diferentes de aquellos que se contemplan en este momento, le autorizó para que proceda de la manera que considere pertinente. El (los) procedimientos (s) indicado (s) antes, lo he platicado con los alumnos y facultativos, así mismo, conozco los riesgos y complicaciones que implican, me han sido explicados y comprendo la naturaleza y consecuencia del (los) procedimiento (s).

Me han explicado que el procedimiento se realiza con el motivo de que las muestras de tejido sean utilizadas en proyectos de investigación, de los cuales se me han explicado los usos, manejo y propósitos del estudio.

Me han explicado que los tratamientos se realizarán bajo anestesia local, la cual, se me va a administrar mediante una o varias inyecciones a fin de bloquear de forma reversible la transmisión del impulso nervioso para realizar la intervención sin dolor. También he sido informado (a) de las posibles consecuencias de colocar cualquier tipo de anestésico (parestesia temporal, irritación o prurito etc.) estoy consciente y sin nadie que me presione, he declarado todos mis antecedentes en el momento. Así mismo autorizó al residente de maestría en estomatología C.D. Jesús Omar Berlanga Castillo para que preserve con fines **científicos, didácticos o para que se disponga de cualquier otra manera los tejidos, partes u órganos extraídos como parte de los procedimientos autorizados previamente. Consiento que se utilicen fotografías, videos, radiografías, presentaciones, acerca de mi caso en particular con fines educativos y de investigación o para publicaciones en revistas científicas, foros, conferencias y ponencias.**

Notifico que me han desglosado y explicado que el procedimiento es con el motivo de que las muestras de tejido sean utilizadas en proyectos de investigación, de los cuales se me han explicado los usos, manejo y propósitos del estudio.

Me comprometo a asistir a todas las citas que se me requiera por parte de la Institución y que se refieran a la preparación, rehabilitación y seguimiento del (os) acto (s) operatorio (s) en cuestión.

De conformidad con lo dispuesto en la ley 21/2000 de 29 de diciembre de Derechos de Información Concernientes a la Salud y la Autonomía del Pacientes y la Documentación Clínica de Ortodoncia de la Maestría de Estomatología con Terminal en Ortodoncia de la Facultad de Estomatología de la BUAP, ubicada en la 31 poniente 304, col. Volcanes de Puebla Pue. Es la responsable de recabar sus datos personales, del uso que se le dé a los mismos y de su protección, haciendo extensiva esta responsabilidad a todos sus empleados y colaboradores.

LUGAR Y FECHA: _____

 NOMBRE Y FIRMA DEL MÉDICO TRATANTE

 NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE

 NOMBRE Y FIRMA DE TESTIGO